

Abschlussbericht Teilprojekt 11.1

Projekttitlel: Der Einfluss von Hepatitis C Virus (HCV) Proteinen auf
Todesrezeptorabhängige und –unabhängige Signalwege bei der
Apoptose

Projektleiter: Prof. Dr. rer. nat. S. Wesselborg
Abteilung Innere Medizin I
Medizinische Klinik
Eberhard-Karls-Universität
Otfried-Müller-Str. 10
72076 Tübingen

Telefon: +49(0) 7071-29 84113

Fax: +49(0) 7071-29 5865

E-Mail: snwessel@med.uni-tuebingen.de

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.01.2005

1. Einleitung

1.1. Aufgabenstellung

Ziel der experimentellen Arbeiten war, den Effekt unterschiedlicher endogen exprimierter HCV Proteine auf die Apoptose zu untersuchen. Gegenstand der Untersuchungen waren dabei sowohl der mitochondrial als auch der Rezeptor vermittelte Apoptoseweg. Zu diesem Zweck wurden funktionelle Studien an stabil transfizierten Zelllinien durchgeführt, die mit einem Tetracyclin-abhängigem System zur Regulation der HCV Protein Expression ausgestattet waren.

1.2. Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

Aufgrund größerer Probleme bei der Besetzung der BAT-IIa/2 Stelle mit einem(r) passenden naturwissenschaftlichen Doktoranden(in) konnte die beantragte Stelle erst ab dem 15. September 2003 besetzt werden. Das Projekt wurde aber seit 01.07.2002 durch die Pharmazeutin Frau Dr. rer. nat. Gerburg Stein mitbetreut, die Dr. med. Stephan Schlosser nach seinem Wechsel an die Arbeitsmedizin (Tübingen) ersetzte. Frau Dr. Stein hat hierbei im Wesentlichen zwei Schwerpunkte in der Forschungssektion für 'Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie' verfolgt. Der Erste ist die Untersuchung der Pathogenese von hepatobiliären Autoimmunerkrankungen. Hierbei steht im Vordergrund die biochemische Identifizierung und Charakterisierung des mit der primären biliären Zirrhose (PBC) assoziierten mitochondrialen M4-Autoantigens. Im zweiten Schwerpunkt untersucht Frau Dr. Stein im geförderten Hep-Net-Projekt den Einfluss von Hepatitis C Virus (HCV) Proteinen in der Aktivierung des Todesrezeptor-Signalweges und des mitochondrialen Apoptoseweges. Zu diesem Thema befindet sich eine Publikation in der Vorbereitung.

Voraussetzung für das Projekt war die Verwendung geeigneter Zelllinien, die stabil und regulierbar die unterschiedlichen HCV Proteine exprimieren. Die verwendeten Zelllinien stammen von Dr. D. Moradpour (Medizinische Abteilung II, Universitätsklinik Freiburg, Freiburg) und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Diese Zelllinien exprimieren unter der Regulation eines Tet-off-Systems die unterschiedlichen HCV Proteine. Bei den Zelllinien, die den ORF (open reading frame; UHCV) oder nur das HCV Core-Protein (UC) exprimieren, wurden jeweils 2 Linien untersucht, die die stabil transfizierten Linien in niedriger oder in hoher

Konzentration exprimierten.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinien	Exprimierte Proteine	Expressionslevel
UGFP	GFP	
UHCV 11	kompletter ORF: alle HCV Proteine	niedrig
UHCV 32	kompletter ORF: alle HCV Proteine	hoch
UC 11.17	Core	niedrig
UC con 39	Core	hoch
UCp7	Core, E1, E2, p7	
UNS3-4A	NS3, NS4A	
UNS4B	NS4B	
UNS5A	NS5A	
UNS5B	NS5B	

1.3. wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Ausgangspunkt zum ersten Projekt war unsere Beobachtung aus der Grundlagenforschung, dass apoptotische Zellen ein lösliches Attraktionssignal (das Phospholipid Lysophosphatidylcholin) sezernieren, welches daraufhin chemotaktisch Phagozyten zu der apoptotischen Zelle lockt und dadurch gewährleistet, dass die apoptotische Zelle rechtzeitig vor dem Auftreten der sekundären (post-apoptotischen) Nekrose internalisiert wird (14). Geschieht die 'Clearance' der apoptotischen Zelle nicht rechtzeitig, dann setzen apoptotische Zellen im Laufe der Sekundärnekrose intrazelluläre Proteine und Faktoren frei, die eine generelle Entzündungsreaktion auslösen. Interessanterweise zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass nicht nur die unzureichende Eliminierung von autoreaktiven Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten beitragen, sondern auch Defekte in der Entsorgung apoptotischer Zellen. Da B-Lymphozyten (im Gegensatz zu T-Zellen) normalerweise nur extrazelluläre Antigene erkennen können, lässt sich die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Antigene (wie nukleäre oder mitochondriale Antigene) folglich nur mit einem 'Molecular Mimicry' bakterieller oder viraler Antigene erklären oder aber durch die unzureichende 'Clearance' von apoptotischen Zellen. Hierbei könnten die sekundär-nekrotischen Zellen eine generelle Entzündungsreaktion auslösen, in deren Verlauf B-Zellen dann intrazelluläre

Antigene (der aufgeplatzten post-apoptotischen Zellen) erkennen und dagegen Autoantikörper generieren.

Folglich haben wir uns in diesem Zusammenhang mit der Identifizierung des mit der primären biliären Zirrhose (PBC) assoziierten mitochondrialen M4-Autoantigens beschäftigt. Mittels Affinitätschromatographie mit Seren von M4-PBC-Patienten konnten zwei Proteine isoliert und mittels N-terminaler Aminosäuresequenzierung als die beiden Untereinheiten E1 α und E1 β des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes identifiziert werden. Diese beiden Autoantigene haben wir daraufhin biochemisch bezüglich des Spezifitätsmusters von PBC-Patientenserum eingehend charakterisiert. Die Ergebnisse werden gerade zur Publikation vorbereitet.

Ausgangspunkt zum zweiten Projekt waren Beobachtungen zum Einfluss unterschiedlicher Viren und ihrer Proteine auf die Apoptose. Es war allgemein bekannt, dass sie die Mechanismen der Apoptose durch Induktion oder Inhibierung für sich ausnutzen können. So sind einige Viren in der Lage, die Apoptose der Wirtszelle durch ihre eigenen neu-synthetisierten Proteine auszulösen (5, 15, 17). Im Gegensatz dazu nutzen andere Viren die anti-apoptotische Wirkung ihrer Proteine, um der Apoptose zu entkommen (4, 9, 19, 22, 33).

Vergleichbare Effekte wurden auch bei der Hepatitis C-Erkrankung beobachtet. Durch Induktion der Apoptose kann das Hepatitis C Virus zur Vernichtung der Hepatitis C-infizierten Hepatozyten führen. Dabei sind CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen an der Entzündungsreaktion und der Zellschädigung von Hepatozyten beteiligt, die für die Induktion der Apoptose durch sezernierte Zytokine und direkte Zytotoxizität sorgen (13). Die Inhibierung der Apoptose kann sich das Hepatitis C Virus zu nutze machen, um die Bedingungen für die Vermehrung in der Wirtszelle zu verbessern (24). Außerdem könnte die Inhibierung der Apoptose eine ausschlaggebende Rolle in der Bildung des Leberzellkarzinoms spielen (12, 21).

Über den genauen Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Rezeptor oder mitochondrial vermittelte Apoptose sind bisher kontroverse Ergebnisse beschrieben worden. Zwar zeigte sich, dass nach endogener Expression insbesondere des *Core*-Proteins die Rezeptor-vermittelte Apoptose leicht inhibiert werden kann (18),

allerdings konnten unterschiedliche Arbeitsgruppen gegensätzliche Effekte auch unter Verwendung derselben Ursprungszelllinie nachweisen, die jeweils mit dem genetischen Material für die Expression des *Core*-Proteins transfiziert wurde (18, 23, 27). Dies zeigt, wie stark unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie z.B. die Verwendung unterschiedlicher Vektoren, unterschiedliche Zeitfenster der Apoptose-Stimulationen oder der Zellkultivierung, das Ergebnis beeinflussen und eine generelle Aussage erschweren können. Daher wurde ein Zellsystem ausgewählt, in dem die Expression der HCV-Proteine nach Belieben quasi an- und ausgeschaltet werden konnte.

1.4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Da das durchgeführte Teilprojekt das einzige Projekt mit einem zellbiologischem Hintergrund ist, bestand eine Kooperation nur außerhalb des HepNets mit der Arbeitsgruppe von Dr. D. Moradpour (Medizinische Abteilung II, Universitätsklinik Freiburg, Freiburg). Von Herrn Dr. D. Moradpour stammen die im Rahmen unseres Projektes verwendeten Zelllinien.

2. Ergebnisse

2.1. Einfluss von endogen exprimierten HCV Proteinen auf die Viabilität – Apoptose-Induktion

Zunächst wurde in der UHCV Zelllinie kontrolliert, ob das HCV *Core*-Protein – als Markerprotein für die Expression des HCV Genoms – nach Tetracyclin (TC) Entfernung aus dem Medium tatsächlich exprimiert wird (Expression unter Tet-off Bedingung). Western Blot Analysen zeigten dabei, dass bereits nach 6 h das HCV *Core*-Protein nachgewiesen werden konnte, das Maximum der Expression nach einem Tag auftrat und während der gesamten Kulturdauer auch noch nach 7 Tagen detektiert werden konnte (Abbildung 1). Auch die Detektion von NS3A mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers im Western Blot bestätigt, dass der ORF translatiert wurde. Die Expression des *Core*-Proteins wurde in den Zelllinien UC und UCp7 und mittels Western Blot ebenfalls bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Ausgehend von der Fragestellung, ob die HCV Proteine *in vitro* in Abhängigkeit von

der Zelldichte einen unterschiedlichen Einfluss auf die Apoptose ausüben können, wurden zunächst Analysen zur Apoptose-Induktion durchgeführt, in denen die Zelllinien UHCV, UC und UCp7 in unterschiedlicher Zellzahl ausgesät wurden. Die Apoptose wurde anhand der hypodiploiden Nuclei im Durchflusszytometer (FACS; Methode nach Nicoletti) in Kinetik-Analysen gemessen. Abbildung 2 belegt dabei für das *Core*-Protein einen eindeutigen Effekt: unabhängig von der Zelldichte induzierte die Expression des *Core*-Proteins in der Zelllinie UC die Apoptose. Ob der auch in der Zelllinie UCp7 induzierte apoptotische Effekt, der sich ebenfalls nur nach Entfernen des TC beobachten ließ, auf das *Core*-Protein zurückzuführen ist, ist sehr wahrscheinlich. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass auch die weiteren in dieser Zelllinie exprimierten Proteine E1, E2 und/oder p7 an dem Effekt beteiligt sind.

Die Analyse der übrigen Zelllinien UNS3-4A, UNS4B, UNS5A, UNS5B ergab keinen Hinweis auf eine spezifische HCV Protein induzierte Apoptose (Abbildung 3). Die nach 7 Tagen Kulturdauer erhöhte Apoptoserate in der Zelllinie UNS5B ist unspezifisch und wahrscheinlich auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen, da kein Unterschied zwischen den Zellen zu beobachten ist, die in Ab- oder Anwesenheit von TC kultiviert wurden.

Bei der Analyse der Induktion der Apoptose durch die verschiedenen HCV Proteine ist zu berücksichtigen, dass die Stärke der spezifischen Proteinexpression eine Rolle spielt. Abbildung 4 zeigt, dass nur in den Zellen mit hohem Expressionslevel des *Core*-Proteins (UC con 39) eine Reaktion zu beobachten war. Gleichzeitig konnte keine Reaktion in den Zelllinien, die den gesamten ORF exprimieren (UHCV 11 und UHCV 32), auch bei hoher Expression in der Zelllinie UHCV 32 aus.

2.2. Einfluss der Expression des HCV Core-Proteins auf den Rezeptor- und den mitochondrial vermittelten Apoptoseweg

Um einen Einblick in die Wirkungsweise des HCV *Core*-Proteins zu erhalten, wurde analysiert, ob der mitochondrial durch Mitomycin C oder Etoposid induzierte oder der durch anti-CD95 oder TRAIL induzierte Rezeptor vermittelte (6, 30, 34) Apoptoseweg beeinflussbar sind. Abbildung 5 stellt am Beispiel der Zelllinie UHCV anhand von

Kinetikexperimenten dar, dass durch die Expression des HCV *Core*-Proteins diese beiden Wege zumindest in dem gewählten experimentellen System nicht signifikant beeinflusst werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Zelllinien UHCV 32 (Abbildung 6), UNS3-4A, UNS4B und UNS 5A (Daten nicht gezeigt) erzielt. Gleichzeitig geht aus der Abbildung 6 hervor, dass die Apoptose-Induktion durch die diversen Stimuli mit dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor in Anwesenheit von TC, also bei nicht exprimierten HCV Proteinen, gehemmt werden kann. Bei Anschalten der Expression der HCV Proteine durch Entfernen des TC aus der Zellkultur kann die durch das HCV *Core*-Protein induzierte Apoptose jedoch nicht komplett durch zVAD gehemmt werden.

2.3. Charakterisierung der Apoptose-Induktion durch das HCV *Core*-Protein

Für die genauere Charakterisierung der Apoptose-Induktion durch das HCV *Core*-Protein wurden weitere experimentelle Ansätze ausgewählt, die die unterschiedlichen charakteristischen Parameter analysieren, die während der Apoptose auftreten und unterschiedliche Signalwege betreffen können.

2.3.1. Membrane-Blebbing

Die morphologische Charakterisierung der Zellen erfolgte anhand mikroskopischer Analysen der Zelllinien unter Verwendung verschiedener typischer apoptotischer Stimuli als Positivkontrolle. Abbildung 7a zeigt nach Anfärbung des Zytoplasmas der Zellen mit Calcein ein typisches Bild der Zellkultur mit konfluierenden Zellen, das auch durch zVAD Zugabe nicht verändert wird. Mitomycin C und TRAIL führen zu einer drastischen Reduktion der Zellzahl, die Zellen lösen sich ab, z.T. wird ein typisches 'Blebbing' an der Oberfläche der Zellen sichtbar. Dieser Effekt ist bei TRAIL Stimulation durch zVAD hemmbar, bei Mitomycin C jedoch nur partiell. Die Zellkultur nach Expression des HCV *Core*-Proteins zeigt ebenso einen aufgelösten Zellrasen, stattdessen können einzelne Zellen beobachtet werden, die z.T. die typischen Oberflächenausstülpungen zeigen, oder auch sog. 'ghosts', also Zellreste, bei denen das Kernmaterial bereits entfernt ist. Dieser Effekt ist durch zVAD nur bedingt hemmbar.

Abbildung 7b zeigt anhand von dichter ausgesäten Zellen einen ähnlichen Effekt.

Hier wurden die Zellen im Phasenkontrast ohne Anfärbung studiert, das Blebbing ist etwas deutlicher zu erkennen, während die Auflösung des Zellrasens durch Expression des HCV Core -Proteins wenig zu erkennen ist.

2.3.2. Expression von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche

Während der Apoptose wird Phosphatidylserin (PS) von der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere Seite transportiert. Dies kann durch Bindung von markiertem Annexin V nachgewiesen werden. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen an den Zelllinien UC con 39 und UHCV 32. Da die Externalisierung von PS ein frühes Event in der Apoptosekaskade ist, wurden die Untersuchungen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt: nachdem 24 Stunden lang die Expression der HCV Proteine durch Entfernen des TC gestartet wurde, wurden die Zellen für 6 h oder 24 h unter Zusatz von verschiedenen Stimuli, die jeweils als Positivkontrolle dienten, weiterkultiviert. Während nach 6 h nur bei der Stimulation mit TRAIL eine PS Externalisierung gemessen werden kann, die bei UC Zellen deutlicher ausgeprägt ist als bei UHCV Zellen, ist der Effekt nach 24 h so stark, dass bereits eine Sekundärnekrose eingesetzt hat, was durch die gleichzeitige Färbung mit PI belegt wird. Außer nach Stimulation mit Mitomycin C ist der Effekt auch hier in der Zelllinie UC deutlich stärker als in der Zelllinie UHCV.

Nach insgesamt 48-stündiger Zellkultur ohne TC Zusatz lässt sich auch eine leicht verstärkte HCV Core-Protein induzierte PS Externalisierung im Vergleich zu den Zellen unter TC Zusatz detektieren. Hinsichtlich der Stimulation mit Mitomycin C, Etoposid, TRAIL und anti-CD95, lässt sich in den enthemmten Zellen eine leichte Steigerung in der PS Expression nachweisen im Vergleich zum Effekt der Stimuli auf die reprimierten Zellen. Dies könnte auf einen leicht additiven Effekt hindeuten, der sich jedoch im Nachweis der hypodiploiden Nuclei nicht widerspiegelt.

2.3.3. TUNEL Assay – DNA-Fragmentierung

Ein typisches Merkmal der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch internucleosomale Spaltung in kleine Bruchstücke, Vielfache von ca. 180 Basenpaaren (bp). Der TUNEL (terminale desoxynuceotyl transferase dUTP nick end labeling) Assay markiert durch enzymatisches Anhängen von dUTP, das z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sein kann, die entstandenen Enden. Dies kann

dann z.B. flowzytometrisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Positivkontrollen ergaben eine deutliche Färbung der Zellen; der Effekt konnte durch zVAD gehemmt werden. Ein Einfluss durch die Expression des HCV *Core*-Proteins ließ sich hingegen nicht nachweisen. Allerdings scheint diese Methode nicht so sensitiv zu sein, wie die Bestimmung der hypodiploiden Nuclei. Ein typisches 'DNA-laddering' ließ sich mit diesen Zellen unter Verwendung der üblichen Protokolle nicht nachweisen, während bei der Apoptose von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) je nach Apoptosestimulus eine deutliche Fragmentierung zu erkennen war (Daten nicht gezeigt). Hier könnte die Durchführung einer 'pulsed field' Gelelektrophorese zum Nachweis größerer DNA-Fragmente hilfreich sein.

2.3.4. Caspase-Aktivierung

An der Apoptose sind in der Regel Caspasen beteiligt. Daher sollte im nächsten Ansatz geklärt werden, ob sich durch die Expression des HCV *Core*-Proteins eine Aktivierung von Caspasen induzieren lässt.

Dazu wurde zunächst ein Aktivitätsassay durchgeführt, bei dem das Substrat (Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethylcoumarin)) durch aktive Caspasen gespalten wird. Dies kann fluorometrisch anhand einer Enzymkinetik analysiert werden. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, sind zwar unterschiedliche Stimuli in der Lage, die Aktivität von Caspasen zu induzieren, ein Effekt konnte aber weder für das HCV *Core*-Protein, noch für die gesamten durch den ORF codierten Proteine nachgewiesen werden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen ist der Nachweis von Substraten und deren Spaltprodukten im Western Blot. Ein Beispiel ist das PARP Protein (Poly-ADP-Ribose-Polymerase). In der Zelllinie UC con 39 (Abbildung 12) ließ sich ebenso wie in den Zelllinien UCp7 und UHCV 32 (Daten nicht gezeigt) keine HCV-Protein spezifische PARP-Spaltung detektieren. Nach Stimulation der Zellen mit den als Positivkontrollen verwendeten Substanzen Mitomycin C, TRAIL und anti-CD95 ließ sich sowohl eine Abnahme der Vollängenform (116 kDa) als auch eine Zunahme der Spaltprodukte bei 85 kDa zeigen, die jeweils durch zVAD gehemmt werden konnte.

Ebenso ließ sich eine Aktivierung von Caspase 3 oder Caspase 8 nur durch die

Kontrollen induzieren. Ein HCV Protein spezifischer Effekt konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 12).

2.3.5. Einfluss von Calpain und Cathepsin-Inhibitoren

Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass weder zVAD, noch der Calpain-Inhibitor II (ALLM), noch der Cathepsin-Inhibitor Ca 074-Me die HCV Core-Protein induzierte Apoptose verminderte. Auch der Calpain-Inhibitor I (ALLN) blieb ohne Effekt (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss dieser Inhibitoren ließ sich auch in der UHCV 32 Linie nicht detektieren (Daten nicht gezeigt).

3. Diskussion unter Einbeziehung des Nutzens der erzielten Ergebnisse und des aktuellen Standes der Literatur

3.1. Apoptose-Induktion durch unterschiedliche HVC Proteine

Zunächst wurde sichergestellt, dass die mit dem genetischen Material für unterschiedliche HCV Proteine transfizierten Zelllinien auch die entsprechenden Proteine produzieren. Anschließend konnten Untersuchungen zur Funktion dieser Proteine im Rahmen von apoptotischen Prozessen durchgeführt werden.

Da in der Literatur bisher wenig über die Induktion der Apoptose allein durch HCV-Proteine zu finden ist (8, 10), sollte zunächst dieser Aspekt näher beleuchtet werden. Anhand von durchflusszytometrischen Analysen nach Nicoletti konnte reproduzierbar nachgewiesen werden, dass das HCV Core-Protein sowie das in der Zelllinie UCp7 exprimierte Protein (core, E1, E2 und p7) eindeutig einen pro-apoptotischen Einfluss in dem zur Verfügung stehenden Zellsystem besitzt. Dabei wurde eine Abhängigkeit der Apoptose-Induktion in der Zelllinie UC von der Konzentration des HCV Core-Proteins demonstriert. Die Induktion der Apoptose konnte nicht nur anhand der hypodiploden Nuclei sondern auch anhand mikroskopischer Untersuchungen, die z. B. den Verlust eines intakten Zellverbandes oder die Bildung von Membranausstülpungen ('Blebbing') bestätigt werden. Auch eine leichte Stimulation der Phosphatidylexternalisierung deutet auf den pro-apoptotischen Effekt des HCV Core-Proteins hin. In anderen Testverfahren wie dem DNA-laddering, dem TUNEL-Assay oder im Western Blot zum Nachweis von ICAD (Inhibitor of Caspase-dependent DNases; Daten nicht gezeigt) konnten hingegen keinerlei Hinweise auf

die Stimulation dieser Apoptoseparameter gewonnen werden.

Zum Einfluss von endogen exprimierten HCV Proteinen auf die Apoptose gibt es unterschiedliche Publikationen, die anhand unterschiedlicher Zelllinien durchgeführt wurden. Kalkeri *et al.* (11) und Moorman *et al.* (20) wiesen die Induktion der Apoptose in mit dem genetischen Material für das Volllänge HCV-Protein transfizierten HepG2 Zellen oder das HCV Core-Protein exprimierenden Jurkat T-Zellen nach. Auch Sung *et al.* (32) beobachteten eine vermehrte Apoptose in infizierten B-Zellen von chronisch HCV-infizierten Patienten mit Non-Hodgkin Lymphom. Giannini *et al.* (7) konnten jedoch keinen Einfluss des HCV Core-Proteins in stabil transfizierten B-Zelllinien belegen, während Goh *et al.* (8) typische Zeichen der Apoptose in COS-7 Zellen fanden, die das HCV Core-Protein exprimierten. Ciccaglione *et al.* (2) wiesen einen Anstieg der Apoptoserate in Sf9 Insektenzellen nach, die das HCV-E1 Protein exprimierten, während Arima *et al.* (1) und Polyak *et al.* (25) eine Inhibierung des Zellwachstums belegen konnten in murinen NIH3T3, humanen HeLa und humanen UNS4A Zellen, die das NS5A Protein exprimierten.

Die Beobachtung, dass auch in der Zelllinie UCp7 nach Expression der entsprechenden HCV Proteine ein apoptotischer Effekt nachgewiesen werden konnte, schließt nicht aus, dass auch die Proteine E1, E2 und/oder p7 einen apoptotischen Effekt ausüben. Dies konnte von Ciccaglione *et al.* (3) für das E1 Protein und von Zhu *et al.* (35) für das E2 Protein gezeigt werden. Die komplette Hemmbarkeit der Apoptose-Auslösung in den UCp7 Zellen durch zVAD (nicht gezeigt) deutet darauf hin, dass sich die einzelnen Proteine in einem komplexen Zusammenhang in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen können.

Noch besser sichtbar wird dieser Effekt in der Zelllinie UHCV, in der apoptotische Eigenschaften weder direkt, noch im Hinblick auf die Beeinflussung exogen zugefügter Zelltod-Stimuli (mitochondrial/Rezeptor-vermittelte Apoptose) beobachtet werden konnte. Ein Grund dafür könnte auch in der Überlagerung vielschichtiger Effekte durch die unterschiedlichen Proteine liegen. Für das Protein NS5A ließen sich z.B. anti-apoptotische Eigenschaften *via* Aktivierung von Akt/PKB belegen (31).

3.2. Zum Mechanismus der Apoptose-Induktion durch das HVC Core-Protein

Der Mechanismus der Apoptose-Induktion durch das HCV Core-Protein in unserem System ist noch weitgehend unklar. Aufgrund der nur partiellen Inhibierung der

Apoptose-Induktion durch Zusatz des Breitspektrum-Caspase Inhibitors zVAD, sowie der fehlenden spezifisch induzierten Spaltung des Caspase-Substrates PARP und einer fehlenden Aktivierung verschiedener Caspasen (Aktivitätsassay, Western Blot) muss davon ausgegangen werden, dass die HCV Core-Protein assoziierte Apoptose-Induktion weitgehend Caspase unabhängig verläuft. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sekundär, wie es von Ruggieri et al. (28) beschrieben wurde, die Expression des FasL induziert wurde, dessen Effekt sich wiederum durch Caspasen hemmen lässt. Untersuchungen zur Expression des FasL in unserem Zellsystem stehen noch aus, sind aber eher von untergeordneter Bedeutung.

Der größte Teil oft widersprüchlicher Publikationen beschäftigt sich mit transient transfizierten Zellen. Meistens wurde auch nur ein einzelnes Protein, in der Regel das HCV Core-Protein, ausgewählt. Unsere Daten hingegen liefern Ergebnisse zu einem breiten Spektrum der HCV Proteine mit dem Vorteil der Regulation der Expression.

Der Effekt endogen exprimierter HCV Proteine auf den Rezeptor vermittelten Apoptoseweg (Fas/CD95 oder TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) assoziiert) wurde in verschiedenen Publikationen untersucht. So beobachteten Marusawa et al. (18) eine Inhibierung der CD95 oder TNFR1 vermittelten Apoptose in unterschiedlichen Zellen (HepG2, HeLa, Jurkat, MCF-7), die entweder das HCV Core-Protein oder E2, p7, NS2 oder das gesamte HCV Polyprotein exprimierten. Im Gegensatz dazu fanden Zhu *et al.* (36) und Ruggieri *et al.* (27) einen Anstieg der TNF-R1 und CD95-induzierten Apoptose. Auch ein Serumentzug führte zu uneinheitlichen Ergebnissen (Honda, Takamatsu).

Im Gegensatz zu Sacco et al. (29) konnten wir keinen Hinweis für eine Aktivierung von ICAD finden. Anders als bei diesen Autoren gab es in unserem Testsystem auch keinen Anhaltspunkt für eine signifikante Beeinflussung der durch den mitochondrialen (Mitomycin C, Etoposid oder, nicht gezeigt, auch durch Staurosporin induziert) oder den Rezeptor-vermittelten (TRAIL, agonistischer anti-CD95 Antikörper) Weg stimulierten Apoptose.

In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise auf Caspase-unabhängige Formen der Apoptose (16). Um einen Aspekt zu dieser Fragestellung abzuklären, wurden die Zellen der Zelllinie UC mit Inhibitoren von Calpainen und Cathepsin B vorbehandelt, bevor die HCV Protein Expression einsetzte. Aber auch in diesen Experimenten ergab sich kein Hinweis auf die Involvierung dieser Proteasen. Ein möglicher Ansatz

für weitere Untersuchungen könnte darin liegen, nicht nur die Expressionslevel von unterschiedlichen IAPs (inhibitors of apoptosis) zu analysieren sondern auch weitere Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. den Akt/PKB Weg oder den Einfluss von PKR zu beleuchten. So konnte kürzlich von Realdon et al. (26) der Beleg für die Involvierung der PKR bei der HCV Core-Protein assoziierten Apoptose.

4. Darstellung der geplanten Veröffentlichung der Ergebnisse

Die im Rahmen des Abschlussberichtes dargestellten Ergebnisse befinden sich zur Zeit in der Vorbereitungsphase für eine Publikation. Da es sich also um bisher unveröffentlichte Ergebnisse handelt, bitten wir Sie, die Daten vertraulich zu behandeln. Die im Rahmen des HepNet Projektes geförderten Publikationen sind Punkt 5 zu entnehmen.

5. Zitierungen der Publikationen die durch das HepNet-Projekt gefördert wurden

		IF 2003
1.	<u>Schlosser SF, Schuler M, Berg CP, Lauber K, Schulze-Osthoff K, Schmahl FW, Wesselborg S (2003)</u> Ribavirin and interferon- α enhance death receptor-mediated apoptosis and caspase activation in human hepatoma cells. Antimicrob. Agents Chemother. , 47: 1912-1921	4,246
2.	<u>Berg CP, Rothbart A, Lauber K, Stein GM, Engels IH, Belka C, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2003)</u> Tributyltin (TBT) induces ultra-rapid caspase activation independent of apoptosome formation in human platelets. Oncogene , 22: 775-780	6,495
3.	<u>Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S (2003)</u> Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3 mediated release of a lipid attraction signal. Cell , 113: 717-730	26,626
4.	<u>Nencioni A, Lauber K, Grünebach F, van Parijs L, Denzlinger C, Wesselborg S, Brossart P (2003)</u> Cyclopentenone prostaglandins induce lymphocyte apoptosis by activating the mitochondrial apoptosis pathway independent of external death receptor signaling. J. Immunol. , 171:5148-5156	6,702
5.	<u>Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S (2004)</u> Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Mol. Cell , 10: 1463-1470	16,835
6.	<u>Wesselborg S, Lauber K (2004)</u> Mechanisms of anticancer drug action. In: "Apoptotic pathways as target for novel therapies of cancer and other diseases" edited by M. Los & S.B Gibson; Kluwer Academic Press, (2005), ISBN: 0-387-23384-9	
7.	<u>Stein GM, Papadakis C, Moradpour D, Neukirchen DKH, Waibel M, Schlosser SF, Wesselborg S (2004)</u> The influence of hepatitis C virus (HCV) proteins on death receptor-dependent and -independent signaling pathways of apoptosis. Hep-Net Symposium, Hannover, 5./6. März 2004	

6. Literatur

1. **Arima, N., C. Y. Kao, T. Licht, R. Padmanabhan, and Y. Sasaguri.** 2001. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* **276**:12675-84.
2. **Ciccaglione, A. R., C. Marcantonio, A. Costantino, M. Equestre, and M. Rapicetta.** 2003. Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: effects on cell viability and apoptosis induction. *Intervirology* **46**:121-6.
3. **Ciccaglione, A. R., C. Marcantonio, E. Tritarelli, M. Equestre, F. Magurano, A. Costantino, L. Nicoletti, and M. Rapicetta.** 2004. The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death. *Virus Res* **104**:1-9.
4. **Crook, N. E., R. J. Clem, and L. K. Miller.** 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**:2168-74.
5. **Desaintes, C., C. Demeret, S. Goyat, M. Yaniv, and F. Thierry.** 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *Embo J* **16**:504-14.
6. **Engels, I. H., A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzer, H. Wajant, R. U. Janicke, A. G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff, and S. Wesselborg.** 2000. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* **19**:4563-73.
7. **Giannini, C., P. Caini, F. Giannelli, F. Fontana, D. Kremsdorf, C. Brechot, and A. L. Zignego.** 2002. Hepatitis C virus core protein expression in human B-cell lines does not significantly modify main proliferative and apoptosis pathways. *J Gen Virol* **83**:1665-71.
8. **Goh, P. Y., Y. J. Tan, S. P. Lim, S. G. Lim, Y. H. Tan, and W. J. Hong.** 2001. The hepatitis C virus core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* **290**:224-36.
9. **Gratama, J. W., M. A. Oosterveer, F. E. Zwaan, J. Lepoutre, G. Klein, and I. Ernberg.** 1988. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8693-6.
10. **Honda, M., S. Kaneko, T. Shimazaki, E. Matsushita, K. Kobayashi, L. H. Ping, H. C. Zhang, and S. M. Lemon.** 2000. Hepatitis C virus core protein induces

- apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* **31**:1351-9.
11. **Kalkeri, G., N. Khalap, R. F. Garry, C. D. Fermin, and S. Dash.** 2001. Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* **282**:26-37.
 12. **Kountouras, J., C. Zavos, and D. Chatzopoulos.** 2003. Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepat* **10**:335-42.
 13. **Koziel, M. J.** 1997. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **4 Suppl 2**:31-41.
 14. **Lauber, K., E. Bohn, S. M. Krober, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler, and S. Wesselborg.** 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* **113**:717-30.
 15. **Levine, B., Q. Huang, J. T. Isaacs, J. C. Reed, D. E. Griffin, and J. M. Hardwick.** 1993. Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* **361**:739-42.
 16. **Lockshin, R. A., and Z. Zakeri.** 2004. Caspase-independent cell death? *Oncogene* **23**:2766-73.
 17. **Marcellus, R. C., J. G. Teodoro, T. Wu, D. E. Brough, G. Ketner, G. C. Shore, and P. E. Branton.** 1996. Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* **70**:6207-15.
 18. **Marusawa, H., M. Hijikata, T. Chiba, and K. Shimotohno.** 1999. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* **73**:4713-20.
 19. **Miura, M., R. M. Friedlander, and J. Yuan.** 1995. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8318-22.
 20. **Moorman, J. P., D. Prayther, D. McVay, Y. S. Hahn, and C. S. Hahn.** 2003. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology* **312**:320-9.
 21. **Muratori, L., and D. Gibellini.** 2001. A new route to apoptosis in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **35**:814-5.
 22. **Neilan, J. G., Z. Lu, G. F. Kutish, M. D. Sussman, P. C. Roberts, T. Yozawa,**

- and D. L. Rock.** 1993. An African swine fever virus gene with similarity to bacterial DNA binding proteins, bacterial integration host factors, and the Bacillus phage SPO1 transcription factor, TF1. *Nucleic Acids Res* **21**:1496.
23. **Otsuka, M., N. Kato, H. Taniguchi, H. Yoshida, T. Goto, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2002. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* **296**:84-93.
24. **Patel, T., C. J. Steer, and G. J. Gores.** 1999. Apoptosis and the liver: A mechanism of disease, growth regulation, and carcinogenesis. *Hepatology* **30**:811-5.
25. **Polyak, S. J., D. M. Paschal, S. McArdle, M. J. Gale, Jr., D. Moradpour, and D. R. Gretch.** 1999. Characterization of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell lines and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* **29**:1262-71.
26. **Realdon, S., M. Gerotto, F. Dal Pero, O. Marin, A. Granato, G. Basso, M. Muraca, and A. Alberti.** 2004. Proapoptotic effect of hepatitis C virus CORE protein in transiently transfected cells is enhanced by nuclear localization and is dependent on PKR activation. *J Hepatol* **40**:77-85.
27. **Ruggieri, A., T. Harada, Y. Matsuura, and T. Miyamura.** 1997. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* **229**:68-76.
28. **Ruggieri, A., M. Murdolo, and M. Rapicetta.** 2003. Induction of FAS ligand expression in a human hepatoblastoma cell line by HCV core protein. *Virus Res* **97**:103-10.
29. **Sacco, R., T. Tsutsumi, R. Suzuki, M. Otsuka, H. Aizaki, S. Sakamoto, M. Matsuda, N. Seki, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Suzuki.** 2003. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. *Virology* **317**:24-35.
30. **Stepczynska, A., K. Lauber, I. H. Engels, O. Janssen, D. Kabelitz, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff.** 2001. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* **20**:1193-202.
31. **Street, A., A. Macdonald, K. Crowder, and M. Harris.** 2004. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* **279**:12232-41.
32. **Sung, V. M., S. Shimodaira, A. L. Doughty, G. R. Picchio, H. Can, T. S. Yen,**

- K. L. Lindsay, A. M. Levine, and M. M. Lai.** 2003. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* **77**:2134-46.
33. **Tewari, M., W. G. Telford, R. A. Miller, and V. M. Dixit.** 1995. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **270**:22705-8.
34. **Wesselborg, S., I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los, and K. Schulze-Osthoff.** 1999. Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* **93**:3053-63.
35. **Zhu, L. X., J. Liu, Y. H. Xie, Y. Y. Kong, Y. Ye, C. L. Wang, G. D. Li, and Y. Wang.** 2004. Expression of hepatitis C virus envelope protein 2 induces apoptosis in cultured mammalian cells. *World J Gastroenterol* **10**:2972-8.
36. **Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M. M. Lai.** 1998. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* **72**:3691-7.