

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und
Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor
Sektion für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie
Leiter: Professor Dr. S. Wesselborg

**Untersuchung der apoptotischen
Wirkung antiviraler Substanzen und der
Apoptoseresistenz bei der humanen
Hepatomzelllinie HepG2**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Markus Kajo Schuler

aus Hechingen

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. S. Wesselborg
2. Berichtstatter: Professor Dr. M. Schwarz

INHALT

Inhalt.....	I
Widmung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Virushepatitis.....	1
1.2 Interferon-alpha und Ribavirin.....	3
1.3 Apoptose und Caspasen.....	4
1.4 Apoptose und Hepatitis.....	9
1.5 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	10
1.6 Die humane Hepatomzelllinie HepG2.....	11
1.7 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.1 Herstellerverzeichnis.....	15
2.1.2 Antikörper.....	17
2.1.3 Kultivierung von HepG2-Zellen	17
2.2 Zellstimulation, Caspaseaktivierung und Apoptose-Induktion.....	18
2.3 Methoden zum Nachweis von Apoptose bzw. Caspaseaktivierung..	19
2.3.1 Bestimmung von Caspase-Aktivitäten mithilfe fluorometrischer Verfahren.....	20
2.3.2 Nachweis der Zellvitalität im MTT-Test	21
2.4 Analyse von Proteinen.....	22
2.4.1 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	22
2.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.4.3 Westernblot-Analyse	24
2.4.4 Westernblot-Analyse der Caspase- und Caspase-Substrat-Prozessierung	26
2.5 Zytometrie (FACS).....	27

2.5.1	Zytofluorimetrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen	27
2.5.2	Zytofluorimetrischer Nachweis von hypodiploiden Nuklei	28
2.6	Immunzytochemische Messungen.....	29
2.7	Gelretardationsanalyse (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Induktion von Apoptose.....	31
3.1.1	Ribavirin und Interferon-alpha induzieren Apoptose	31
3.1.2	Ribavirin und Interferon-alpha sensibilisieren gegenüber der anti-CD95 Antikörper induzierten Apoptose	32
3.1.3	Interferon-alpha und Ribavirin aktivieren Caspasen	34
3.1.4	Ribavirin und Interferon-alpha verstärken die anti-CD95 Antikörper induzierte Caspaseaktivität.....	36
3.1.5	Interferon-alpha und Ribavirin verstärken die anti-CD95 Antikörper induzierte Spaltung von PARP.....	37
3.1.6	Immunzytologischer Nachweis der Effektorcaspase-3.....	39
3.1.7	Effekte von Interferon-alpha und Ribavirin auf die Spaltung von Caspasen	41
	<u>Effektorcaspase-3 und -7</u>	41
	<u>Initiatorcaspase-8.....</u>	42
3.2	Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf den NF-κB-Signalweg.....	44
3.2.1	Aktivierung von NF-κB über Todesrezeptoren	44
3.2.2	Effekt von Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf NF-κB	45
3.2.3	Effekt von Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf TNF induzierte NF-κB Aktivität.....	47
3.3	Einfluss von Cycloheximid auf die anti-CD95 Antikörper induzierte Apoptose.....	48
3.3.1	Wirkung von anti-CD95 Antikörper und CHX auf die Caspaseaktivität.....	50

3.3.2	Differentielle Wirkung von anti-CD95 Antikörper und CHX auf die Inhibitoren der Apoptose „X-linked inhibitor of apoptosis“ (XIAP) und Bcl-2.....	52
3.3.3	Einfluss von Cycloheximid auf die NF-κB Aktivierung	53
4	Diskussion.....	56
4.1	Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf Apoptose bei Hepatomzellen.....	56
4.1.1	Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Induktion der Apoptose.....	56
4.1.2	Einflüsse von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB	59
4.2	Einfluss von Cycloheximid und anti-CD95 Antikörper auf Apoptose-Induktion und NF-κB-Aktivierung bei HepG2-Zellen.....	61
4.3	Einfluss von Cycloheximid auf den Transkriptionsfaktor NF-κB.....	63
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichnis.....	67
	Danksagung.....	76
	Lebenslauf.....	77

Für Sarah und Lena

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Aa	Aminosäure(n)
ACD	Zitratdextroselösung (sauer)
AMC	Aminomethylcumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
APO	<i>Apoptosis Antigen</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BA	<i>Bongkrekic Acid</i>
Bad	<i>Bcl-2 Antagonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B Cell Lymphoma/Leukemia-2</i>
Bfl-1	<i>Bcl-2 Homologue Isolated from a Human Fetal Liver</i>
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
Blk	<i>Bik-Like Killer Protein</i>
Bok	<i>Bcl-2-Related Ovarian Killer</i>
Boo	<i>Bcl-2 Homologue of Ovary</i>
BrefA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
Casp	Caspase
Caspase	Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD95	APO-1, Fas
CD95L	CD95 Ligand
CED	<i>Cell Death Protein</i>
CHAPS	(3-([3-Cholamidopropyl]-dimethylammonium)-1-propansulfonat
CHX	Cycloheximid
clAP	<i>Cellular IAP</i>
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat

DD	Todesdomäne (<i>Death Domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>Death Effector Domain</i>)
DEV-D-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcumarin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DISC	Todessignal-Komplex (<i>Death Inducing Signaling Complex</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnase	Desoxyribonukleinsäure-Hydrolase
DR	Todesrezeptor (<i>Death Receptor</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FADD	<i>Fas-Associating Protein with Death Domain</i> (MORT1)
Fas	<i>Fibroblast Associated Antigen</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FLICE	<i>FADD-Like Ice</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FU	<i>Fluorescence Unit</i>
H	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i>
ICE	<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
IFN- α	Interferon-alpha
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mili (10^{-3})
M	Molarität, molar
μ	Mikro (10^{-6})
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
Min	Minute(n)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

Abkürzungen

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TBT	<i>Tributyltin</i> , Tributylzinn
TE	Tris EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Factor</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglycol-p- isooctylphenolether
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Enzymeinheit
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEID-AMC	N-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-Aminomethylcumarin
Vol	Volumeneinheit
W	Watt
X-IAP	<i>X-Linked IAP</i>
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Alex-Asp-fluoromethylketon

1 EINLEITUNG

Hepatitis ist eine Entzündung des Leberparenchyms, die vor allem durch verschiedene Viren verursacht wird. Risikogruppen für die Übertragung der Hepatitis B und C sind Hämodialyse- und Transfusionspatienten, Drogenabhängige sowie Menschen mit häufig wechselnden Sexualpartnern. Die Wirkungsweise der zur Therapie verwendeten Medikamente ist bisher nur unzureichend verstanden. Apoptose und ihre zelluläre Regulation über Caspasen könnte dabei eine wichtige Rolle spielen.

1.1 Virushepatitis

Hepatitis B und C Viren werden parenteral übertragen und sind als Hauptursache von Lebererkrankungen in den USA und Europa bekannt. Eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus ist häufige Ursache für eine Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (Davila, Morgan et al. 2004). Insgesamt handelt es sich dabei um die häufigsten Gründe für Lebertransplantationen. Die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung beträgt in Deutschland ungefähr 0,5-0,6%, von denen es sich bei der Mehrzahl der Betroffenen um chronisch Infizierte handelt (Palitzsch, Hottentrager et al. 1999). Die Gesamtzahl der Personen mit chronischer Hepatitis C in Deutschland wird auf 400 000-500 000 Personen geschätzt (Heintges, Mohr et al. 1994; Niederau and Kapagiannidis 2006).

Unbehandelt nimmt vor allem eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus in der überwiegenden Zahl der Fälle (75% bei Erwachsenen) einen chronischen Verlauf. Die chronische Hepatitis ist mit einer gesteigerten Morbidität (durch Folgeerkrankungen wie Leberzirrhose) und Mortalität (Übergang zum hepatozellulären Karzinom) verbunden (Niederau, Lange et al. 1998).

Die derzeitigen pathophysiologischen Konzepte bei der chronischen Hepatitis gehen in erster Linie von einer Zerstörung von Lebergewebe infolge einer

Immunreaktion aus. Diese wird durch infizierte Zellen ausgelöst und über zytotoxische T-Zellen (CTLs) vermittelt. Im Verlauf einer erfolgreichen Behandlung der chronischen Hepatitis C mit Ribavirin und Interferon-alpha kommt es sogar zur Abnahme proapoptotischer Moleküle wie CD95 und Interleukin-18 (Marin-Serrano, Rodriguez-Ramos et al. 2006). Die Zerstörung von gesundem Lebergewebe kann somit verhindert werden, denn die Zerstörung von Lebergewebe wird in der Hauptsache durch zytotoxische T-Zellen, die über das CD95-Rezeptor-Ligand System Hepatozyten angreifen, verursacht (Galle, Hofmann et al. 1995). Der zelluläre Schaden wird somit weniger durch den Erreger selbst als vielmehr durch die inflammatorische Antwort erzeugt. Diese entsteht durch eine Zytokinfreisetzung und die Mobilisierung von Entzündungszellen (Rehermann, Chang et al. 1996; Cerny and Chisari 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der histologische Grad der Leberschädigung besser mit der Apoptoserate als mit der HCV Serumaktivität korreliert (Calabrese, Pontisso et al. 2000). Diese Tatsache macht man sich bei neuen Testverfahren zu Nutze. Bei Patienten mit aktiver Hepatitis und normalen Transaminasen werden zur Bestimmung der inflammatorischen und fibrotischen Leberschädigung bereits klinische Tests auf der Basis von Caspase-Assays durchgeführt (Bantel, Luger et al. 2004).

Die lymphozytäre Abwehrreaktion ist in der Frühphase der Infektion vermutlich sogar entscheidend für die Chance einer Viruseliminierung durch Kontrolle der Virusreplikation (Rehermann, Lau et al. 1996). Bei der Hepatitis B werden weitaus häufiger Spontanheilungen in der Akutinfektion und ein besseres Therapieansprechen auf die Immuntherapie mit Interferon-alpha in der chronischen Phase beobachtet. Einer der Gründe hierfür ist die sehr starke, polyklonale und multispezifische Antwort der zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese Abwehrreaktion gegenüber den viralen Hüllproteinen (Envelope Proteinen), dem Nukleokapsid und den Polymeraseproteinen persistiert oft noch über Jahrzehnte (Rehermann, Chang et al. 1996).

1.2 Interferon-alpha und Ribavirin

Grundlage der pharmakologischen Therapie der Hepatitis C sind die antiviralen Chemotherapeutika Ribavirin und Interferon-alpha. Durch den Einsatz dieser Medikamente konnten sowohl der Anteil chronischer Verläufe als auch die Folgen der Erkrankungen erheblich reduziert werden (Wedemeyer, Jackel et al. 2004). Entsprechend der aktuellen Studienlage ist dabei zumindest bei der Hepatitis C die Kombinationstherapie mit beiden Substanzen der Therapie mit den Einzelsubstanzen überlegen (Patel, Muir et al. 2006). So gelingt unter einer Monotherapie mit Interferon-alpha die Viruseliminierung nur in ungefähr 15% der Fälle, während die Kombinationstherapie mit Ribavirin bei ungefähr 50% der Patienten zu einer anhaltenden Viruseliminierung führt (McHutchison, Gordon et al. 1998; Poynard, Marcellin et al. 1998) (Davis, Esteban-Mur et al. 1998).

Die pharmakologische Wirkung und die Interaktionen beider Substanzen sind nicht vollständig verstanden und aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Das Guanosinanalogon Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid) wird über natriumabhängige Transportsysteme in alle Zellkompartimente des Körpers transportiert (Glue 1999). Dort wirkt es als Inhibitor der Inosinmonophosphat (IMP)-Dehydrogenase und hat einen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt. Außerdem moduliert Ribavirin die Aktivität verschiedener Zytokine und beeinflusst die Differenzierung von Lymphozyten (Ning, Brown et al. 1998; Tam, Pai et al. 1999). Daneben wurde bei kultivierten Hepatozyten von Mensch und Ratte auch eine Abnahme der Proteinsynthese beobachtet (Ilyin, Langouet et al. 1998). Die genauen molekularen Angriffspunkte von Ribavirin *in vivo* sind dabei aber weiterhin unklar (Patterson and Fernandez-Larsson 1990).

Die Kenntnisse über die antiviralen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Eigenschaften von Interferon-alpha sind insgesamt detaillierter als die

über Ribavirin. Hier erfolgt zunächst die Bindung an den Zelloberflächenrezeptor, der aus den beiden Ketten IFN- α -R1 und IFN- α -R2 besteht. Nachfolgend wird das Signal intrazellulär über Janus Kinasen (JAK) und die „*Signal transducing and activating factor of transcription*“ (STAT) Kaskade vermittelt (Lee, Bluysen et al. 1997; Basu, Yang et al. 1998; Yang, Murti et al. 1998). Hierbei sind direkte zytotoxische und pro-apoptotische Effekte auf verschiedene Zellen oder indirekte Effekte durch Immunmodulation möglich (Basu, Yang et al. 1998; Gale and Katze 1998). So ist für verschiedene Zelllinien auch eine Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit Interferon-alpha alpha beschrieben worden (Yang, Murti et al. 2005). Die Studienlage zu den Effekten von Interferon-alpha alpha und Ribavirin ist jedoch uneinheitlich (Shigeno, Nakao et al. 2003; Yang, Murti et al. 2005).

Aus diesen Erkenntnissen wird ersichtlich, dass zumindest ein Teil des Wirkungsspektrums von Ribavirin und Interferon-alpha alpha durch pro-apoptotische Effekte der beiden Substanzen hervorgerufen wird.

1.3 Apoptose und Caspasen

Apoptose beschreibt ein Selbstmordprogramm, durch das einzelne Zellen gezielt und ohne Belastung des Gesamtorganismus eliminiert werden können. Dieser programmierte Zelltod als aktive Form des Absterbens kann anhand morphologischer und biochemischer Kriterien von der Nekrose als passiver Form des Zelltodes unterschieden werden (Arends and Wyllie 1991; Farber 1994; Kanduc, Mittelman et al. 2002). Als Gegenspieler der Proliferation dient sie zur Regulierung der Zellzahl und Aufrechterhaltung der Homöostase.

Für die Signalwege der Apoptose spielen vor allem der sogenannte extrinsische Todesrezeptorsignalweg, der über Rezeptoren der Zelloberfläche ausgelöst wird, und der intrinsische mitochondriale Signalweg eine Rolle. In der Folge kommt es zur Weiterleitung des Signals durch die proteolytische Prozessierung und Aktivierung von Caspasen (Thornberry and Lazebnik 1998; Budihardjo, Oliver et al. 1999), die gekennzeichnet ist durch eine zunehmende Proteasen-

und Endonukleasenaktivität (Los, Wesselborg et al. 1999; Rathmell and Thompson 1999).

Caspasen sind eine Familie von im Laufe der Evolution in höchstem Maße konservierten Proteasen. Sie tragen einen Cystein-Rest in ihrem aktiven Zentrum und spalten spezifisch auf der Carboxylseite von Aspartatresten. Synthetisiert werden diese Cysteinproteasen zunächst als Zymogene mit nur sehr geringer enzymatischer Aktivität. Im Rahmen ihrer proteolytischen Aktivierung wird diese Proform in eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa) gespalten und die N-terminale Prodomäne entfernt. In ihrer aktiven Form liegen Caspasen in der Regel als Heterotetramere vor, die aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten bestehen. Die Aggregation der jeweiligen Proformen von Caspase-8 und -9 ist dabei unter Ausnutzung der geringen intrinsischen Aktivität der Zymogene möglicherweise ausreichend für deren autokatalytische Aktivierung (Martin, Siegel et al. 1998; Muzio, Stockwell et al. 1998; Srinivasula, Ahmad et al. 1998).

Phylogenetisch lassen sich die bekannten Mitglieder der humanen Caspasenfamilie in zwei Subfamilien einteilen (Alnemri, Livingston et al. 1996; Strasser, O'Connor et al. 2000)(Abb. 1.5). Eine Gruppe, deren Mitglieder zur Reifung der Zytokine beitragen, und eine zweite, die im Rahmen der Apoptose von Bedeutung ist. Diese zweite Gruppe der Apoptose-Caspasen lässt sich weiter differenzieren in Apoptose-Initiatoren und Apoptose-Effektoren.

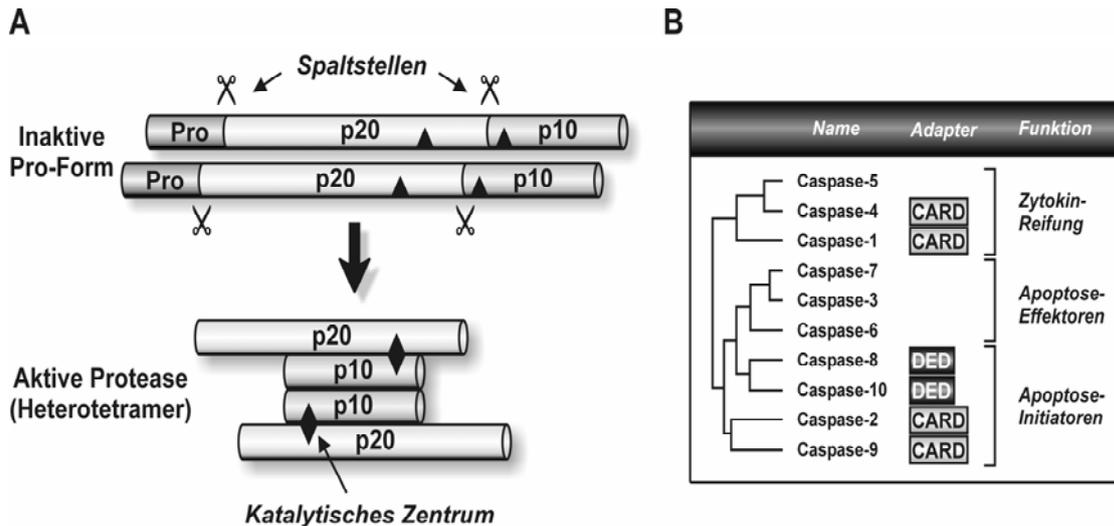


Abb. 1.1: Die humane Caspase-Familie: Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheidet man Caspasen, die an der Zytokin-Reifung beteiligt sind, von jenen, die im Rahmen der Apoptose eine Rolle spielen. Die Gruppe der Apoptose-Caspasen lässt sich weiter unterteilen in Apoptose-Initiatoren und Apoptose-Effektoren. Während die Initiator-Caspasen alle eine große Prodomäne (> 10 kDa) besitzen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Adapterfunktion wichtig für die Aktivierung dieser Caspasen ist, besteht die Prodomäne der Effektor-Caspasen oft nur aus wenigen Aminosäuren (<30 aa). Modifiziert nach Strasser et al. (Strasser, O'Connor et al. 2000).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Apoptose zunächst die Initiator-Caspasen und anschließend die Effektor-Caspasen aktiviert werden (Slee, Adrain et al. 1999).

Der extrinsische Signalweg wird ausgelöst durch die sogenannten Todesrezeptoren, eine Subfamilie der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Für die späteren Untersuchungen dieser Arbeit ist vor allem die Signaltransduktion der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose des CD95-Rezeptor/Ligand-Systems von Bedeutung. Die Stimulation des CD95-Rezeptors durch den CD95-Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors und leitet damit die Bildung des Todessignalkomplexes ein. Über die Bindung des Adaptorproteins FADD und die Rekrutierung der Initiatorcaspase-8 kommt es schließlich zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (Martin, Siegel et al. 1998; Muzio, Stockwell et al. 1998; Srinivasula, Ahmad et al. 1998).

Ausgangspunkt des intrinsischen Signalweges ist das Mitochondrium, aus dem es zur Freisetzung von Zytochrom c kommt (Liu, Kim et al. 1996; Li, Nijhawan et al. 1997). Ausgelöst werden kann dies durch so unterschiedliche proapoptotische Stimuli wie Zytostatika, Staurosporin, Cycloheximid, UV- und γ -Strahlung (Ferrari, Stepczynska et al. 1998; Bantel, Engels et al. 1999; Wesselborg, Engels et al. 1999; Belka, Rudner et al. 2000) Nach seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium bindet Zytochrom c an das Adapterprotein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) und vermittelt dessen Oligomerisierung (Zou, Henzel et al. 1997; Saleh, Srinivasula et al. 1999) und die Aktivierung von Procaspase-9. In beiden Signalwegen werden im Rahmen der Apoptose zunächst die Initiator-Caspasen und anschließend die Effektor-Caspasen aktiviert (Slee, Adrain et al. 1999).

Die Signaltransduktion der Apoptose kann auf mehreren Ebenen durch verschiedene Moleküle kontrolliert und modifiziert werden. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie gehören hier zu den zentralen Regulatoren der Apoptose (Luo, Budihardjo et al. 1998) (Gross, Yin et al. 1999; Zha, Weiler et al. 2000) (Li, Zhu et al. 1998). Sie besteht aus anti-apoptotischen (z.B. Bcl-2 und Bcl-xL) und proapoptotischen Proteinen (z.B. Bax, Bak, Bad, Bid) (Reed, Jurgensmeier et al. 1998; Adams and Cory 2001; Cory, Huang et al. 2003). Die Bcl-2-Familie kontrolliert die apoptotischen Veränderungen vor allem an den Mitochondrien (Green and Reed 1998; Gross, Yin et al. 1999; Wang 2001). Die Bedeutung der Bcl-2-Überexpression bei Apoptoseresistenz in bestimmten Hepatomzelllinien wurde bereits in früheren Studien belegt (Saito, Ebinuma et al. 1998).

Auf der Ebene der Initiatorcaspasen dient ein zu Caspase-8 (FLICE) homologes Protein c-FLIP (*cellular FLICE-Inhibitory Protein*) als wichtiger Apoptoseregulator (Goltsev, Kovalenko et al. 1997; Han, Chaudhary et al. 1997; Hu, Vincenz et al. 1997; Inohara, Koseki et al. 1997; Irmeler, Thome et al. 1997; Shu, Halpin et al. 1997; Srinivasula, Ahmad et al. 1997; Scaffidi, Schmitz et al. 1999). FLIPs binden an den Todesrezeptor/FADD-Komplex und verhindern dadurch die Rekrutierung von Caspase-8 und somit die Weiterleitung des

Apoptosesignals von den Todesrezeptoren (Thome, Schneider et al. 1997) (Bertin, Armstrong et al. 1997; Hu, Vincenz et al. 1997).

Eine weitere Gruppe regulatorischer Proteine, die auf der Ebene der Caspasen in den Signalweg eingreifen, sind die sogenannten IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Diese sind in der Lage die enzymatische Aktivität der Caspasen direkt zu inhibieren (Deveraux and Reed 1999). Die Zielproteine der IAP-Familie sind die Initiator-Caspase-9 und die Effektor-Caspasen-3 und -7.

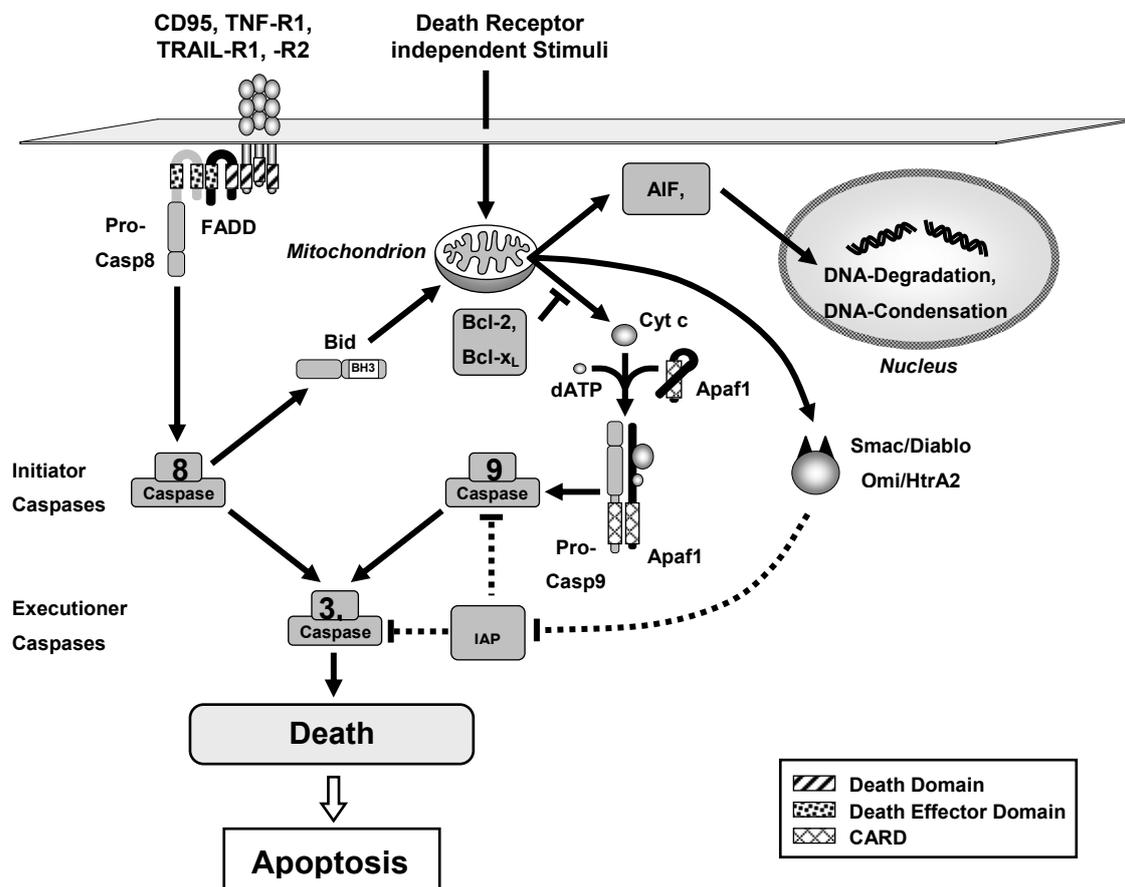


Abb. 1.2: Signalwege der Apoptose:

Der Todesrezeptorsignalweg ermöglicht über das Adapterprotein FADD die Rekrutierung von Procaspase-8 an den CD-95-Rezeptor-Ligand-Komplex (DISC, death inducing signaling complex). Dadurch wird Procaspase-8 autoproteolytisch aktiviert und kann die Caspasekaskade starten. Das initiale Ereignis im mitochondrialen Signalweg ist die Freisetzung von Zytocrom c aus dem Mitochondrium. Im Zytosol löst Zytocrom c die an die Hydrolyse von dATP gekoppelte Ausbildung des Apaf-1/Procaspase-9-Apoptosomkomplexes aus. Dadurch wird Procaspase-9 autoproteolytisch aktiviert und die Caspasekaskade eingeleitet. Die Freisetzung von Zytocrom c aus dem Mitochondrium wird durch die Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert. So induzieren Todesrezeptor-unabhängige Apoptosestimuli, wie Zytostatika, die Synthese proapoptotischer Vertreter dieser Gruppe (Bax, Puma, Noxa), die an das Mitochondrium verlagert werden und dort die Freisetzung von Zytocrom c vermitteln. Antiapoptotische Regulatorproteine, wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, dagegen blockieren diese Freisetzung. Die beiden Signalwege sind verknüpft über das Bcl-2-Familienmitglied Bid, das von Caspase-8 gespalten werden kann und in seiner trinkierten Form in der Lage ist, die Zytocrom-c-Freisetzung zu vermitteln. DD (Todesdomäne), DED (Todeseffektordomäne), CARD (Caspaserekrutierungsdomäne).

1.4 Apoptose und Hepatitis

Der genaue Mechanismus hepatozellulärer Inflammation ist weiterhin unklar. Vermutlich spielen dabei aber direkte zytotoxische und durch T-Lymphozyten verursachte indirekte antivirale und zytopathogene Effekte eine Rolle. Apoptose kommt sowohl bei akuter als auch chronischer Hepatitis vor und wird vermutlich durch den CD95-Liganden vermittelt, der bei der Hepatitis C in Abhängigkeit vom Grad der Inflammation exprimiert wird (Dhillon and Dusheiko 1995; Nasir, Arora et al. 2000). Somit spielt Apoptose mit dem System der Todesrezeptoren eine wesentliche Rolle beim Untergang von Lebergewebe. Weitere Mediatoren der Apoptose sind vermutlich Zytokine wie TNF alpha, die von Entzündungszellen freigesetzt werden.

Für eine insuffiziente Abwehrreaktion des lymphatischen Systems gegenüber der Virusinfektion gibt es verschiedene Gründe. Bei T-Zellen, die das HCV-Kernprotein exprimieren, wurde zum Beispiel eine Sensibilisierung gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose beobachtet. Sie resultiert aus einer verstärkten enzymatischen Aktivierung von Effektorcaspasen oder durch die direkte

Bindung des Kernproteins an die Zytoplasmadomäne des Todesrezeptors, die anschließend zu einer erleichterten Rezeptortrimerisierung führt (Hahn, Cho et al. 2000).

Zellen bestimmter Tumoren scheinen sich ebenfalls vor Angriffen des Immunsystems schützen zu können, indem sie mittels konstitutiv hoher Expression von CD95-Ligand und Kostimulatoren die zur Bekämpfung des Tumors aktivierten Lymphozyten eliminieren (Hahne, Rimoldi et al. 1996; Strand, Hofmann et al. 1996; Dong, Strome et al. 2002).

Zusätzlich beobachtet man bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine verstärkte Expression anti-apoptotischer oder eine reduzierte Expression pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie. Auch die Resistenz verschiedener Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika ist vermutlich auf die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-x_L zurückzuführen (Miyashita and Reed 1993; Bunz 2001; Reed 2002).

Ähnliche Eigenschaften wie Zunahme der Zellproliferation und Blockierung der Apoptose durch Interaktion mit Molekülen der Signaltransduktion sind auch für verschiedene virale Proteine beschrieben worden. So wurde beim Hepatitis B Virus durch Mutationsanalysen des HBX-Proteins entdeckt, dass es durch Kolo-kalisation mit Kinasen aus dem SAPK/JNK Signalweg zur Inhibierung der anti-CD95 vermittelten Apoptose kommt (Diao, Khine et al. 2001).

1.5 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Zellüberleben und -differenzierung wird durch eine Vielzahl verschiedener Gene gesteuert. Das An- und Abschalten der Expression dieser Genprodukte wird von Transkriptionsfaktoren bestimmt. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B gehört zur Familie der Rel/NF- κ B Proteine. Normalerweise wird NF- κ B durch Bindung an den Inhibitor I κ B im Zytosol sequestriert und dadurch seine nukleäre Translokation verhindert. Nach Phosphorylierung und anschließender proteosomaler Degradation von I κ B wird NF- κ B freigesetzt und kann daraufhin in den Zellkern translozieren und transkriptionell aktiv werden.

Die ersten Hinweise einer Beteiligung von NF- κ B beim Schutz vor Zelltod und Apoptose ergaben sich 'Knockout'-Mäuse. Diese starben pränatal und zeigten eine massive apoptotische Degeneration der Leberzellen (Beg, Sha et al. 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass Zellen für die Apoptose-Induktion (u.a. durch TNF, Chemotherapeutika und ionisierende Bestrahlung) sensibilisiert werden konnten, wenn die NF- κ B Aktivierung durch eine dominant-negative I κ B-Mutante blockiert wurde (Van Antwerp, Martin et al. 1996; Wang, Mayo et al. 1996). In einer Rattenhepatozyten-Zelllinie, die sich gegenüber der Stimulation mit TNF Apoptose resistent zeigt, konnte dieser Mechanismus durch Ausschalten der NF- κ B Aktivität rückgängig gemacht werden. Andererseits wird die anti-CD95-induzierte Apoptose durch NF- κ B scheinbar nicht beeinflusst (Van Antwerp, Martin et al. 1996).

Der zelluläre Regulationsmechanismus des anti-apoptotischen Einflusses von NF- κ B läuft dabei unter anderem über die Inaktivierung des Janus-Kinase-Signalwegs. Über diesen Mechanismus wird normalerweise die Cytochrom-c Freisetzung und die Aktivierung von Caspase-3 und -7 vermittelt (Liu, Lo et al. 2002). Über die Existenz weiterer anti-apoptotischer Gene, die durch NF- κ B induziert werden, wird derzeit noch spekuliert.

Auch andere Transkriptionsfaktoren werden durch virale Proteine beeinflusst. Zellen, die mit dem HCV-Kernprotein stabil transfiziert wurden, zeigten eine konstitutive Aktivierung des „*Activating factor-1*“ (AP-1) (Shrivastava, Manna et al. 1998).

1.6 Die humane Hepatomzelllinie HepG2

HepG2 ist eine humane Hepatomzelllinie eines hepatozellulären Karzinoms (ATTC® Nummer HB-8065™). Durch ihre Apoptoseresistenz gegenüber der klassischen anti-CD95 vermittelten Apoptose zeigt sie Charakteristika wie bei einer ineffektiven Abwehrreaktion und fehlender Elimination bösartiger oder infizierter Zellen *in vivo*. Sie dient deshalb als Modell zur Untersuchung medikamentöser Wirkungen (Pinti, Troiano et al. 2003). Die Apoptoseresistenz

von HepG2 ist in einigen Details humanen Hepatozyten, bei denen diese durch Expression verschiedener viraler Proteine vermittelt wird, vergleichbar. So wurde in HepG2-Zellen bei zusätzlicher Expression des Hepatitis C Kernproteins eine Apoptoseresistenz durch verstärkte Expression von Bcl-xL (Otsuka, Kato et al. 2002) festgestellt. Ebenso wurde durch eine direkte Interferenz des Kernproteins die Inhibierung der anti-CD95 vermittelten Apoptose beobachtet (Ray, Meyer et al. 1998). Aus diesem Grunde sollte die Hepatomzelllinie HepG2 als Modell für die späteren Untersuchungen dienen.

Auch für andere viruskodierte Proteine wurden anti-apoptische Effekte beschrieben (Gale, Korth et al. 1997; Erdtmann, Franck et al. 2003; Miyasaka, Enomoto et al. 2003). Hierzu gehört zum Beispiel das Nichtstrukturprotein NS5A des Hepatitis C Virus (Lan, Sheu et al. 2002; Chung, Sheu et al. 2003).

In HepG2-Zellen, die das HCV-Kernprotein exprimieren, konnte außerdem gezeigt werden, dass deren Apoptoseresistenz durch die Aktivierung von NF- κ B verursacht wird (Marusawa, Hijikata et al. 1999). Ebenso wurde eine Korrelation zwischen Schutz vor anti-CD95 vermittelter Apoptose durch Expression des HBX-Proteins und dem Grad der NF- κ B Aktivierung (Pan, Duan et al. 2001) festgestellt.

Somit ist unter anderem NF- κ B sowohl bei Hepatomzelllinien als auch bei virusinfizierten Zellen an der Apoptoseresistenz beteiligt (Pan, Duan et al. 2001; Chiao, Na et al. 2002; Kim, Schwabe et al. 2002).

Zur Durchbrechung der Apoptoseresistenz bei Hepatozyten wurde bereits in früheren Experimenten Cycloheximid als geeignete Substanz für *in vitro* Untersuchungen identifiziert (Hill, Schmidt et al. 1995; Higami, Tanaka et al. 2000). Ab einer Konzentration von 2,5 μ g/ml führt es unter anderem zur Inhibierung der Proteinsynthese (Lemaire, Andreau et al. 1999). Dabei kommt es in Kombination mit den klassischen Apoptosestimuli (TNF, anti-CD95) durch Aktivierung des extrinsischen Todesrezeptorweges zur Apoptose (Tang, Lahti et al. 1999; Wajant, Haas et al. 2000; Kreuz, Siegmund et al. 2001).

In vitro Untersuchungen an immortalisierten Zelllinien sind relativ einfach durchzuführen. Die Interpretation der Ergebnisse und deren Anwendung im Hinblick auf nicht-proliferierende Zellen im Menschen ist aber nur eingeschränkt

möglich, da es sich dort um ein wesentlich komplexeres, organisches System handelt.

1.7 Fragestellung

Apoptose ist sowohl bei der Pathogenese als auch in der Therapie viraler Hepatitiden von entscheidender Bedeutung. In der Therapie von Hepatitis B und C spielen die Medikamente Interferon-alpha alpha beziehungsweise Interferon-alpha alpha in Kombination mit Ribavirin die wichtigste Rolle. Für die Wirkung dieser Substanzen hat der Effekt von Ribavirin und Interferon-alpha alpha auf die Induktion von Apoptose eine große Bedeutung. Die genauen Mechanismen sind derzeit jedoch unklar. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb diese Effekte in HepG2-Zellen genauer untersucht werden.

Die Bedeutung der Caspasen in diesem Zusammenhang wurde bereits in verschiedenen Geweben untersucht. Besonders gut eignen sich hierbei die pathologischen Veränderungen in der Leber, wie sie sich in den einzelnen Schritten von der chronischen Hepatitis über Fibrose bis zur Neoplasie vollziehen (Walsh, Vanags et al. 2004). Bei der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms sind chronische Entzündungsphase und Malignität eng assoziiert (Fattovich, Stroffolini et al. 2004). Daraus lässt sich ableiten, dass bei beiden ähnliche Signalwege von Bedeutung sind (Farinati, Cardin et al. 2004). Deshalb ist aus Sicht des Autors die Untersuchung der zellulären Abläufe bei der Apoptose an HepG2 ein geeignetes Modell zur besseren Charakterisierung der Wirkmechanismen von Interferon-alpha und Ribavirin. Aufgrund von Voruntersuchungen anderer Gruppen zur Beteiligung von Caspasen (Prikhod'ko, Prikhod'ko et al. 2004) sollte darüber hinaus auch deren Bedeutung bei der Aktivierung über den klassischen CD95-Rezeptorsignalweg genauer untersucht werden. HepG2-Zellen sind ähnlich den virusinfizierten Hepatozyten primär resistent gegenüber den klassischen Apoptosestimuli. Deshalb sollte in einem weiteren Schritt versucht werden, verschiedene Inhibitoren der Apoptose, die hierbei eine Rolle spielen, zu identifizieren.

Daneben sind für Interferon-alpha alpha auch Effekte auf die Zellproliferation beschrieben. Im letzten Teil der Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, welche Einflüsse die beiden antiviralen Substanzen auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B haben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Herstellerverzeichnis

Amersham Pharmacia, Freiburg

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("Rainbow Coloured Protein"), SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("LMW"), PVDF-Membranen (Hybond^P-ECL-Membran), Westernblot-ECL-Detection-Kit

Bachem, Heidelberg

Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon (zVAD-fmk)

BD Biosciences, Heidelberg

Anti-Caspase-3-Antikörper, Anti-Caspase-7-Antikörper

BioCHECK, Münster

Agonistischer Anti-CD95-Antikörper, Anti-Caspase-8-Antikörper

Biomol, Hamburg

Fluorogene Caspase-Substrate (DEVD-AMC)

BioRad, München

Biotinylierter Molekulargewichtsmarker, Bradford-Reagens, Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-Anti-Ratte-IgG (H+L)

Boehringer-Mannheim

Kaninchen-Antiserum gegen PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase)

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

HEPES, Penicillin-Streptomycin, DMEM-Medium, RPMI-1640-Medium

Knoll AG, Ludwigshafen

TNF α

Milipore Corporation, Bedford, MA, USA

Millex-Sterilfilter mit 0,2-0,8 μ m Porengröße

MoBiTec, Göttingen

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("BOA")

PAA Laboratories, Cölbe

Fetales Kälberserum (FCS)

Pierce, Rockford, IS (USA)

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Staurosporin

Roth, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid, Ammoniumperoxodisulfat (APS),
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-
tetraessigsäure (EGTA), Ethidiumbromid, Natriumdodecylsulfat (SDS),
Rinderserumalbumin (BSA), Tetraethylmethyldiamin (TEMED), Triton X-100

Sigma, Deisenhofen

Ampicillin, Brefeldin A, Cycloheximid, Ribavirin, 2'-Desoxyadenosin 5'-
triphosphat (dATP), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Glycerin, 3-
(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT),
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS), Natriumpyrophosphat, Nonidet P-40,

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat (PMA), Propidiumiodid (PI), Tween-20, Zitratdextroselösung

Alle übrigen Reagenzien wurden in reinster Form (p.a.), falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller
Anti-CD95	Monoklonaler Maus-Antikörper, der den humanen CD95-Rezeptor erkennt und agonistisch Apoptose induziert	BioCHECK
Anti-Caspase-3	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-p32- und die prozessierte p20/p17-Form der humanen Caspase-3 erkennt (Immunogen: aa 25-145)	BD Biosciences
Anti-Caspase-7	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-p35- und die prozessierte p20-Form der humanen Caspase-7 erkennt (Immunogen: aa 4-126)	BD Biosciences
Anti-Caspase-8	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Voll-Längen-p55/p53- und die prozessierten p43/p41-Intermediärfragmente und die p18-Form der humanen Caspase-8 erkennt	BioCHECK
Anti-XIAP	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die p24-Form von Bcl-2 erkennt (Immunogen: Abschnitt am C-terminalen Ende)	BD Biosciences
Anti-Bcl-2	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die p24-Form von Bcl-2 erkennt (Immunogen: Abschnitt am N-terminalen Ende)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PARP	Kaninchen-Antiserum gegen PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase)	

2.1.3 Kultivierung von HepG2-Zellen

Material

DMEM-Medium (Invitrogen Life Technologies)	
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4

Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt
Nicht-essentielle Aminosäure-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	Die Lösung wurde 1%ig eingesetzt
Fetales Kälberserum (PAA Laboratories)	Vor Gebrauch wurde das Serum für 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Die in dieser Arbeit verwendete eukaryontische Zelllinie war die Hepatomzelllinie HepG2. Zu ihrer Kultivierung wurde DMEM-Medium mit Zusatz von 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und nichtessentielle Aminosäurelösung verwendet. Sie wurde in Kulturflaschen (50-800 ml) oder Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24- oder 96-Well-Format) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet. Die adhärenen Zellen wurden 1-2 mal pro Woche nach Behandlung mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10 passagiert.

Die Kryokonservierung der Zellen wurde mit DMSO als Gefrierschutzmittel durchgeführt. DMSO unterdrückt die Ausbildung von Wasserkristallen während des Einfrierens und verhindert damit die Zerstörung der Zellmembran. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Zellsediment in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert (max. 20-30x10⁶ Zellen/ml) und in 1 ml großen Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden die Zellen zunächst für ca. 48 h bei -80°C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt. Aufgrund der toxischen Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur wurden alle Einfrierschritte rasch und auf Eis durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C erwärmt, einmal mit 20 ml Zellkulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

2.2 Zellstimulation, Caspaseaktivierung und Apoptose-Induktion

Die Zellstimulation mit dem Ziel der Caspaseaktivierung und Apoptoseinduktion erfolgte mittels verschiedener Stimuli.

Material

Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	Supplementiert wie unter 2.2.1 angegeben
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Agonistischer anti-CD95-Antikörper (BioCHECK)	Stocklösung 330 µg/ml in PBS Finalkonzentration 1 µg/ml
Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (Bachem)	Stocklösung 20 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 50-100 µM
Protein-Synthese-Inhibitor Cycloheximid (Sigma)	Stocklösung 1 mg/ml in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 10-30 µg/ml
TNF α (Knoll AG)	Stocklösung 20 ng/µl Finalkonzentration 20 ng/ml
Interferon-alpha alpha	Stocklösung 3 Mio. i.E./ml
Ribavirin (Sigma)	Stocklösung 200 mM

Die Chemikalien wurden wie angegeben gelöst und die Stocklösungen bei -70°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden entweder in Mikrotiterplatten mit 6, 12, 24 oder 96 Vertiefungen oder in Eppendorf-Mikrogefäßen in ihrem jeweiligen Kulturmedium, dem der jeweilige Stimulus zugesetzt worden war, bei 37°C inkubiert.

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 8000G), einmal mit PBS gewaschen, bei 4°C nochmals auf gleiche Weise abzentrifugiert und dann bei -70°C eingefroren.

2.3 Methoden zum Nachweis von Apoptose bzw. Caspaseaktivierung

Apoptose bzw. Caspaseaktivierung lässt sich auf verschiedene Methoden nachweisen. Für den Nachweis von Apoptose bzw. apoptosetypischen Veränderungen wurden die Durchflusszytometrie mit dem Nachweis von Zellschrumpfung (Pallardy, Biola et al. 1999), hypodiploiden Nuklei (Nicoletti, Migliorati et al. 1991), Propidiumiodid-positiven Zellen und/oder dem Nachweis der Externalisierung von Phosphatidylserin eingesetzt.

2.3.1 Bestimmung von Caspase-Aktivitäten mithilfe fluorometrischer Verfahren

Der Nachweis einer Caspaseaktivierung erfolgte anhand typischer aktiver Spaltformen im Westernblot oder mittels fluorometrischer Verfahren. Die im Verlauf der Apoptose auftretende Caspase-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit fluorometrisch bestimmt. Die Grundlage dieses Tests sind fluorogene Tetrapeptid-Substrate, aus denen Caspase-vermittelt das Fluorophor Aminomethylcumarin (AMC) freigesetzt wird. Nur in seiner freien Form weist AMC die typischen Fluoreszenz-Eigenschaften auf. Über eine kinetische Aufzeichnung der Fluoreszenz-Zunahme während der Reaktion lässt sich die relative Caspase-Aktivität aus der Anfangssteigung der Fluoreszenzkurve ermitteln. Der Einsatz verschiedener Tetrapeptid-Substrate ermöglicht eine bedingte Spezifizierung der Caspase-Aktivität (z.B. Ac-DEVD-AMC für Caspase-3 und Caspase-7).

Material

Lysepuffer	20 mM HEPES 84 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 200 µM EDTA 200 µM EGTA 0,5% (v/v) NP-40 1 mM PMSF 1 mM DTT 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 5 µg/ml Aprotinin
1x Reaktionspuffer	37,5 mM HEPES 75 mM Natriumchlorid 7,5% (w/v) D(+)-Sucrose 0,075% (w/v) CHAPS 1,5 mM Calciumchlorid 10 mM DTT 50 µM Ac-DEVD-AMC, Ac-VEID-AMC oder Ac-IETD-AMC (Biomol) pH 7,4

Durchführung

Die jeweilig angegebene Zellzahl pro Vertiefung wurde in 96-well-Platten mit den verschiedenen Apoptose-Stimuli wie unter 2.2 beschrieben für die angegebenen Zeiten behandelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min bei 1200 U/min) und das trockene Zellsediment für 10 min auf Eis in 50 µl Lysepuffer lysiert. Die Caspase-Aktivität wurde in einem finalen Volumen von 200 µl 1x Reaktionspuffer bestimmt. Dazu wurde der Ansatz für die jeweils angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert und die Freisetzung von AMC fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm mit Hilfe des Micro Tek FLI-Fluorometers (Bio-Tek Kontron Instruments) alle 2 min gemessen. Mit der geräteeigenen Software (KC4) wurde die Anfangssteigung der kinetischen Kurve als relatives Maß der Caspase-Aktivität bestimmt.

2.3.2 Nachweis der Zellvitalität im MTT-Test

Die Grundlage dieses Zellvitalitätstests ist die in vitalen Zellen erfolgende Dehydrogenase-vermittelte Reduktion des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) zum blauen Formazan. Diese Reaktion findet statt, wenn die Mitochondrien der Zelle intakt und ausreichend Reduktionsäquivalente in der Zelle vorhanden sind. Demnach ist die Menge des entstehenden blauen Formazans ein relatives Maß für die Zellvitalität. In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test modifiziert nach Heeg et al. (Heeg et al., 1985) durchgeführt.

Material

MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H ₂ O bidest.

Durchführung

1×10^5 Zellen pro Vertiefung (96-well-Format) wurden in einem finalen Volumen von 150 μl wie unter 2.3 angegeben mit verschiedenen Stimuli behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 450 $\mu\text{g/ml}$ MTT-Lösung zugegeben und der Ansatz für weitere 5 h im Brutschrank kultiviert. Das entstandene blaue Formazan wurde durch Zugabe von 4% SDS und weiteren 3 h Inkubation in Lösung gebracht und der Test bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) spektrophotometrisch ausgewertet.

2.4 Analyse von Proteinen**2.4.1 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe (z.B. um eine gleichmäßige Proteinmenge im Rahmen der SDS-PAGE, des Westernblots oder der FPLC und der Enzymaktivitätsmessung zu gewährleisten) wurde die Methode nach Bradford eingesetzt (Bradford 1976). Bei diesem Test lagert sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine an, was eine Veränderung des Absorptionsverhaltens des Farbstoffs bewirkt.

Material

5x Bradford-Lösung (BioRad)	Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:5 in H_2O bidest. verdünnt.
BSA-Eichgerade	50-400 $\mu\text{g/ml}$ BSA (Roth) in PBS

Durchführung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Mikromaßstab in 96-well-Platten durchgeführt. 1-10 μl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 200 μl 1x Bradford Reagens versetzt. Bei jeder Messung wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (50 $\mu\text{g/ml}$ bis 400 $\mu\text{g/ml}$ in) als interner Standard mitgeführt. Der Abgleich erfolgte gegen einen Reagenzienleerwert. Die

Absorptionsmessung wurde im ELISA Reader (Dynatech MR5000) bei 630 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) durchgeführt. Mit Hilfe der geräteeigenen Software wurden die Daten der BSA-Verdünnungsreihe ausgewertet und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.4.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet (Laemmli 1970). Hierbei werden die Proteine mit Hilfe von SDS denaturiert und Disulfidbrücken mit β -Mercapto-Ethanol reduziert. Die Anlagerung des anionischen Detergenz SDS an die Polypeptidkette erfolgt proportional zum Molekulargewicht des Polypeptids. Da jedes angelagerte SDS-Molekül die Polypeptidkette mit einer negativen Ladung versieht, ergibt sich für alle Proteine ein nahezu konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis der SDS-Polypeptid-Aggregate, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel allein von der Größe des Polypeptids abhängig ist. Mit Hilfe von geeigneten Molekulargewichts-Markern ist die Größe eines Polypeptids auf diese Weise leicht zu bestimmen.

Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gel- und Puffersystems mit Sammel- und Trenngel wird das Auflösungsvermögen der SDS-PAGE wesentlich erhöht (Laemmli 1970).

Material

Acrylamid-Lösung (Roth)	29,2% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O bidest.
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O bidest.
TEMED (Roth)	
Sammelgel-Puffer	0,74% (w/v) SDS 1 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8

Trenngel-Puffer	0,384% (w/v) SDS 1,5 M Tris-Hydrochlorid pH 8,8
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS (Roth) 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
1x Elektrodenpuffer	0,1% (w/v) SDS 1,9 M Glycin 250 mM Tris-Hydrochlorid

Durchführung

Aus den Stocklösungen wurden die Gelmischungen hergestellt. Sie enthielten:

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid	5% (w/v)	8-15% (w/v)
Tris-Hydrochlorid pH 6,8	135 mM	-
Tris-Hydrochlorid pH 8,8	-	390 mM
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,1% (w/v)	0,05% (w/v)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 60 min wurde der Alkohol durch Spülen mit H₂O bidest. entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die zu testenden Proteinlösungen wurden mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x Elektrodenpuffer solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront die untere Gelkante erreicht hatte.

2.4.3 Westernblot-Analyse

Dieses Verfahren dient dem selektiven Nachweis einzelner Polypeptide oder Proteine mittels spezifischer Antikörper. Hierfür müssen die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert werden (Blotting). Der Nachweis erfolgt anschließend auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Primärantikörpern und einem

geeigneten Detektorsystem auf der Basis eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers.

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde im Nasstankverfahren durchgeführt und das Peroxidase-basierte „Enhanced-Chemoluminescence“ (ECL)-Detektionssystem verwendet.

Material

PVDF-Membran "Hybond ^P -ECL" (Amersham-Pharmacia)	
Filter-Papier (GB002; Schleicher und Schüll)	
Transfer-Apparatur (BioRad)	
Transfer-Puffer	2,93 g/l Glycin 5,28 g/l Tris Base 20% (v/v) Methanol
5% Milchpulver-Lösung	5% (v/v) fettarmes Milchpulver 10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02% (v/v) Triton X-100 pH 8,0
1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100	10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02% (v/v) Triton X-100 pH 8,0
Primärantikörper-Lösung	0,5-2 µg/ml in 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärantikörper-Stocklösung, Peroxidase-gekoppelt (BioRad) 1:4000 verdünnt in 5% Milchpulver
Westernblot-ECL-Detection Kit (Amersham-Pharmacia)	
Hyperfilm-ECL (Amersham-Pharmacia)	

Durchführung

Der Zusammenbau des Blots erfolgte in kaltem Transfer-Puffer. Hierzu wurde die Transferkassette geöffnet und ein Transferschwamm auf die anodengerichtete Seite der Kassette gelegt. Darauf wurden ein Filter-Papier, die PVDF-Membran, das Gel, zwei Lagen Filterpapier und der zweite Transferschwamm gelegt. Die Kassette wurde geschlossen, in den Transfertank überführt und dieser mit kaltem Transfer-Puffer aufgefüllt. Der Transfer wurde für 90-120 min bei 0,5 A und 4°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch

einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver-Lösung bei Raumtemperatur blockiert und der Blot zweimal mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörper-Lösung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Danach wurde die Membran fünfmal für 3 min mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde der Blot weitere sechsmal für 10 min mit 1x TBS 0,02% (v/v) Triton X-100 gewaschen. Zur Detektion wurden gleiche Volumina der Detektionsreagenzien A und B (Westernblot-ECL-Detection-Kit, Amersham-Pharmacia) gemischt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in der Dunkelkammer ECL-Filme (Hyperfilm-ECL, Amersham-Pharmacia) für verschiedene Expositionszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.4.4 Westernblot-Analyse der Caspase- und Caspase-Substrat-Prozessierung

Die proteolytische Prozessierung der Caspasen und Caspase-Substrate (z.B. PARP) wurde in der vorliegenden Arbeit durch Westernblot-Analyse nachgewiesen.

Material

PBS	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Lysepuffer	50 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 200 µM EDTA 200 µM EGTA 20 mM Natriumpyrophosphat 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumvanadat 3 µg/ml Pepstatin A 3 µg/ml Aprotinin 3 µg/ml Leupeptin 2 mM PMSF 1% (v/v) Triton X-100

4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8% (v/v) Glycerin 8,2% (w/v) SDS 0,04% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercapto-Ethanol
-----------------------	--

Durchführung

Angegeben Zellzahlen wurden wie unter 2.2 beschrieben mit den verschiedenen Apoptose-Stimuli behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen gesammelt, in kaltem PBS gewaschen und bei -70°C eingefroren. Zur Analyse wurden sie auf Eis für 10 min in 50 μ l Lysepuffer lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 G sedimentiert und der klare Überstand mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt. Die so präparierten Zell-Extrakte wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein 6-15%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 2.4.2). Die Westernblot-Analyse erfolgte mit den unter 2.1.2 angegebenen Primärantikörpern.

2.5 Zytometrie (FACS)

Verwendetes Durchflusszytometer war ein FACSCalibur der Firma Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg. Zur Analyse der Daten kam die CellQuest-Analyse-Software zur Anwendung.

2.5.1 Zytofluorimetrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen

Der Nachweis der Zellmembranintegrität erfolgte mittels Propidiumiodid-Färbung der Zellen. Tote Zellen weisen eine permeable Zellmembran auf, durch die Propidiumiodid in die Zelle eindringen und sich an die nukleäre DNA anlagern kann. Die resultierende rote Fluoreszenz lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen. Diese Methode lässt jedoch keine

Unterscheidung zwischen Nekrose und der im Rahmen der Apoptose spät auftretenden sekundären Nekrose zu.

Material

Propidiumiodid-Färbelösung	5 µg/ml Propidiumiodid in 1x PBS
----------------------------	-------------------------------------

Durchführung

Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min 200 g), in der Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) bei 585 nm analysiert. Die Zellen mit gestörter Membranintegrität ließen sich im FL2-Histogramm als Population mit erhöhter roter Fluoreszenz rechts der gesunden Kontrollpopulation prozentual erfassen.

2.5.2 Zytofluorimetrischer Nachweis von hypodiploiden Nuklei

Während der Apoptose wird die zelluläre DNA durch DNasen internukleosomal gespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch die Kernporen den Zellkern verlassen, so dass dieser sukzessive DNA verliert. Dieses Phänomen kann man als Messparameter der Apoptose heranziehen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Apoptose anhand der hypodiploiden Nuklei nach der Methode von Nicoletti et al. (Nicoletti, Migliorati et al. 1991). Hierbei werden die Nuklei durch hypotone Zellyse freigesetzt und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Die Quantifizierung der nukleären DNA-Menge erfolgt durchflusszytometrisch und alle Zellkerne mit weniger als dem diploiden DNA-Gehalt (G_0/G_1 -DNA-Gehalt) werden als apoptotisch betrachtet.

Material

Hypotoner Lysepuffer	1% (w/v) Natriumcitrat 0,1% (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Propidiumiodid in H ₂ O bidest.
----------------------	---

Durchführung

Jeweils $3-5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well-Platten (bzw. 2×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-well-Platten) für 18-24 h mit den angegebenen Apoptose-Stimuli behandelt. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen in hypotonem Lysepuffer für 5 min lysiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz der Zellkerne bei 585 nm im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) analysiert. Die apoptotischen, hypodiploiden Zellkerne mit reduzierter roter Fluoreszenz ließen sich im FL2-Histogramm links der diploiden G₀/G₁-Population prozentual erfassen.

2.6 Immunzytochemische Messungen

Die Zellen wurden durch Zugabe von 4%-igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte viermaliges Waschen mit PBS und Blockung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch 2% Kälberserum für 20 min bei Raumtemperatur. Aktive Caspase-3 wurde nachgewiesen durch Inkubation mit einem polyklonalen anti-Caspase-3 Antikörpers (1:2.000; R&D Systems, Wiesbaden) für 1 h. Danach wurden die Zellen mit 3%-igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten inkubiert. Nach mehrereren Waschgängen mit PBS wurde biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin G (1:200; Linaris, Wiesbaden) für 30 min als Zweitantikörper verwendet. Nach 4 Waschsritten erfolgte die Detektion gebundener Antikörper mit Hilfe einer Standard-Peroxidase Methode (Vectastain ABC Kit; Vector, Burlingame, Kalifornien).

2.7 Gelretardationsanalyse (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Äquivalente Proteinmengen (3 - 5 µg Kernextrakt, 10 - 20 µg Gesamtzelleextrakt) wurden mit dem ³²P-markierten NF-κB spezifischen Oligonukleotid 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindungsreaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt der aus 2 - 4 µl Extrakt, 4 µl 5 x Bindungspuffer (20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5 mM MgCl₂, 20% Ficoll), 2 µg Poly(dI-dC) als unspezifischer DNA, 2 µg BSA und 3.000-10.000 cpm Cerenkov (der radioaktiven DNA-Probe) bestand. Nach der Inkubation wurden die Proben auf ein 4%-iges Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer pH 8,0 aufgetragen. Die Spezifität der DNA-Proteinbindung wurde durch radioaktive mutierte Oligonukleotide oder einem 100-fachen Überschuß unmarkierter DNA-Probe kontrolliert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und bei -70°C auf einem Kodak-X-OMAT Film exponiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Induktion von Apoptose

3.1.1 Ribavirin und Interferon-alpha induzieren Apoptose

Die molekularen Wirkungsmechanismen der zur Therapie der chronischen Hepatitis C verwendeten Substanzen Interferon-alpha (IFN- α) und Ribavirin sind bisher nur unzureichend bekannt. Ein möglicher Mechanismus beruht auf der pro-apoptotischen Wirkung beider Substanzen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die beiden antiviralen Substanzen jeweils einzeln oder in Kombination Apoptose zu induzieren. Hierzu wurde eine Titration beider Substanzen durchgeführt und zusätzlich zur Titration von Ribavirin 10 kU/ml Interferon-alpha zugegeben. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte durch die durchflusszytometrische Bestimmung von hypodiploiden Kernen im FACS.

IFN- α in höherer Dosierung (100 kU/ml) führte bei 25% der Zellen zur Apoptose (siehe Abb. 3.1a). Ribavirin in einer Dosierung von 250 μ M induzierte in 20% der Zellen Apoptose (Abb. 3.1b). Die gleichzeitige Gabe beider Substanzen führte zur Apoptose von 40% der Zellen (Abb. 3.1c). Diese Effekte konnten durch die Gabe des Breitspektrum Caspaseinhibitors zVAD inhibiert werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3.1

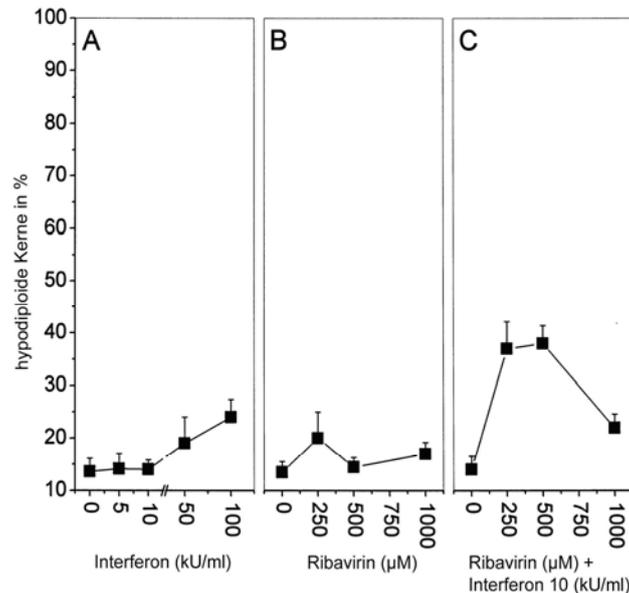


Abb.3.1: Apoptose-Induktion durch Interferon-alpha und Ribavirin.

HepG2-Zellen wurden für 36 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Zellkerne mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Zahl der hypodiploiden Kerne wurde dabei als Indikator für Apoptose gewertet. Es wurden je 8.000 Ereignisse zum jeweiligen Zeitpunkt ausgewertet und der prozentuale Anteil apoptotischer (hypodiploider) Zellen graphisch aufgetragen.

Inkubation mit IFN- α (A), Ribavirin (B) und 10 kU IFN- α pro ml plus Ribavirin (C). Die Messwerte sind als Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen angegeben.

3.1.2 Ribavirin und Interferon-alpha sensibilisieren gegenüber der anti-CD95 Antikörper induzierten Apoptose

Ribavirin und Interferon-alpha sind schwache Apoptose-Induktoren. Es stellt sich die Frage, ob durch eine Vorbehandlung mit Ribavirin und Interferon-alpha eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber anderen pro-apoptischen Stimuli erreicht werden kann.

In vivo zerstören aktivierte CTLs ihre Zielzellen über verschiedene Mechanismen wie den Perforin-Granzyme B Weg und die CD95-Ligand/Rezeptor Interaktion. Die CD95-Ligand/Rezeptor Interaktion stellt dabei das Minimalmodell für den T-Zell-Angriff auf virusinfizierte Zellen dar.

In einem weiteren Teil der Studie wurde daher am Beispiel der Stimulation mit dem anti-CD95 Antikörper untersucht, ob eine Vorbehandlung mit Ribavirin und Interferon-alpha zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber diesem pro-apoptotischen Stimulus führt.

Eine zwölfstündige Stimulation mit anti-CD95 Antikörper allein führte zur Apoptose von 25% der untersuchten Zellen (Abb. 3.2a). Vorstimulation mit IFN- α allein sensibilisierte die Zellen gegenüber der anti-CD95-Antikörper vermittelten Apoptose in einer dosisabhängigen Weise (48% Apoptose, Abb. 3.2a). In ähnlicher Weise sensibilisierte auch Ribavirin HepG2-Zellen (47% Apoptose, Abb. 3.2b). Wenn die zwei Substanzen in Kombination zur Vorinkubation eingesetzt wurden, kam es zu einer deutlich stärkeren Apoptoserate (70%, Abb. 2c). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Ribavirin als auch Interferon-alpha in HepG2-Zellen die anti-CD95 Antikörper vermittelte Apoptose verstärken. Die Kombination der beiden Substanzen bei der Vorinkubation führt zu einer Verstärkung dieses Effekts (Abb. 3.2c).

Abbildung 3.2

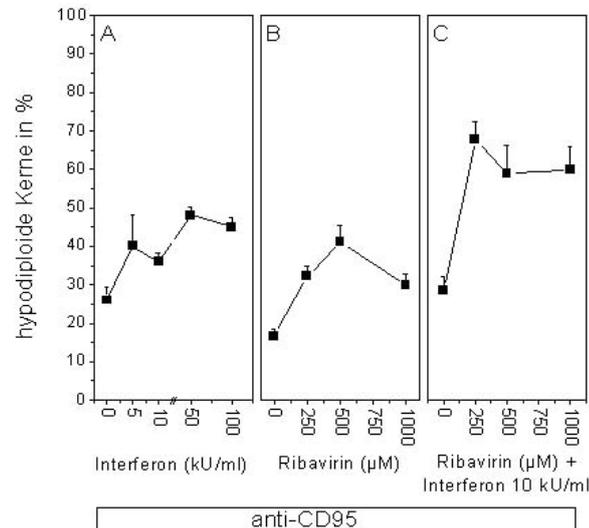


Abb. 3.2. Effekt von Interferon-alpha und Ribavirin auf die durch anti-CD95 Antikörper vermittelte Apoptose.

Interferon-alpha und Ribavirin verstärken die anti-CD95 Antikörper-induzierte Apoptose in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden über 24 Stunden mit den genannten Stimuli vorbehandelt und danach für weitere 12 Stunden mit 0,25 µg/ml anti-CD95 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Zellkerne durch hypotone Lyse isoliert, mit Propidium-Iodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. 8.000 Ereignisse zum jeweiligen Zeitpunkt wurden ausgewertet und sind graphisch prozentual aufgetragen.

Inkubation mit anti-CD95 Antikörper und IFN- α (A), Ribavirin (B) und mit 10 kU Interferon-alpha pro ml plus Ribavirin (C) wie auf der Abszisse angegeben. Die Zahlen sind Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus drei repräsentativen Experimenten.

3.1.3 Interferon-alpha und Ribavirin aktivieren Caspasen

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine geringe Apoptoseinduktion durch IFN- α und Ribavirin allein und eine verstärkte Sensibilisierung durch diese Substanzen für die anti-CD95 Antikörper vermittelte Apoptose beobachtet. Der Prozess der Apoptose geht mit einer Aktivierung von Caspasen einher. Zur genaueren Charakterisierung der pro-apoptischen Effekte der verwendeten Substanzen wurde daher untersucht, ob die jeweiligen

Behandlungen mit einer verstärkten Caspaseaktivierung korrelieren. Die Bestimmung der Caspaseaktivität erfolgte über die Messung der Freisetzung von fluoreszierendem Aminomethylkumarin (AMC) aus DEVD-AMC, einem Substrat der Effektorcaspase-3. Bei alleiniger Gabe über 24 Stunden induzierte IFN- α eine 2,4-fache und Ribavirin eine 2,2-fache Steigerung der Caspaseaktivität (Abb.3.3a und b). Zusammen bewirkten sie einen fünffachen Anstieg der Caspaseaktivität. Diese Resultate zeigen, dass der proapoptische Effekt von Ribavirin und Interferon-alpha über eine Aktivierung von Caspasen vermittelt wird.

Abbildung 3.3

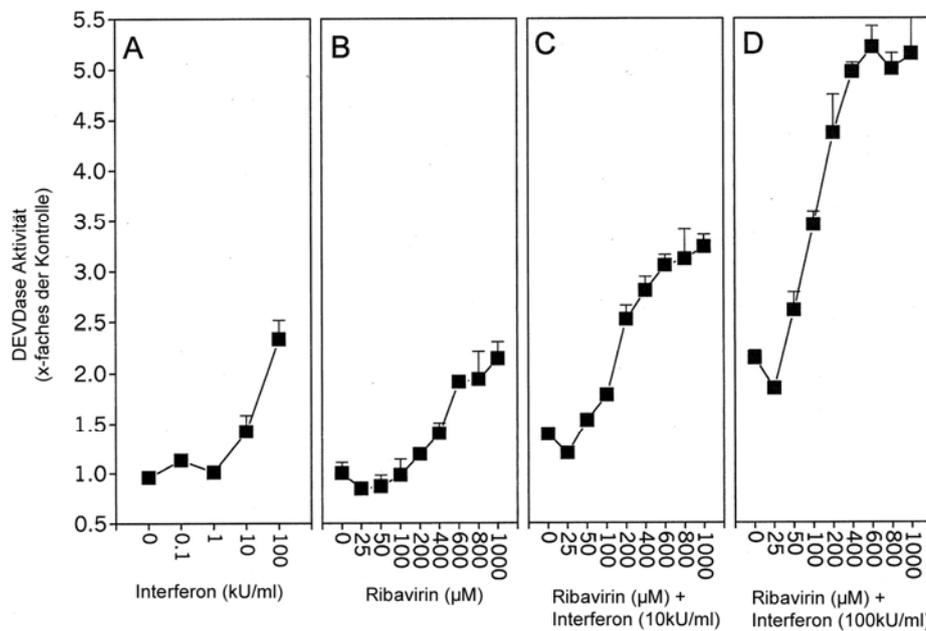


Abb. 3.3: Interferon-alpha und Ribavirin induzieren die Aktivierung von Caspasen in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Stimuli inkubiert und anschließend die Caspaseaktivität anhand der Spaltung von DEVD-AMC fluorimetrisch gemessen und als Vielfaches der AMC-Freisetzung in unstimulierten Zellen angegeben. (A) IFN- α alleine; (B) Ribavirin alleine; (C) 10 kU IFN- α /ml plus Ribavirin in steigender Dosierung (siehe Abszisse). Die Zahlen sind Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus drei repräsentativen Experimenten.

3.1.4 Ribavirin und Interferon-alpha verstärken die anti-CD95 Antikörper induzierte Caspaseaktivität

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, führt bereits die alleinige Behandlung der Zellen mit IFN- α und Ribavirin zu einer leichten Zunahme der Caspaseaktivität. In diesem Teil der Studie sollte der Effekt von Ribavirin und IFN- α auf die durch eine Behandlung mit anti-CD95 Antikörper ausgelöste Zunahme der Caspaseaktivität untersucht werden.

Die alleinige Stimulation mit anti-CD95 Antikörper über 4 Stunden verursachte einen achtfachen Anstieg der Caspaseaktivität (Abb. 3.4a (IFN- α 0 kU/ml) und Abb. 3.4b (Ribavirin 0 μ M)). Vorinkubation mit IFN- α sensibilisierte die Zellen gegenüber der anti-CD95 Antikörper vermittelten Caspaseaktivierung dosisabhängig. Dies resultierte in einer 25-fachen Verstärkung der Caspaseaktivität (Abb. 3.4a). In ähnlicher Weise führte auch die Vorbehandlung mit Ribavirin alleine zu einer bis maximal 35-fachen Verstärkung der Caspaseaktivität (Abb. 3.4b). Wenn beide Substanzen bei der Vorinkubation gemeinsam verwendet wurden, war der Effekt deutlich ausgeprägter. Zum Erreichen einer bestimmten Caspaseaktivität genügten bei der Kombination bereits niedrigere Dosierungen der Einzelsubstanzen (Abb. 3.4c und 3.4d). 25 μ M Ribavirin erzeugte einen 15-fachen Anstieg bei der anti-CD95 Antikörper vermittelten Caspaseaktivierung, während bereits eine Kombination mit 10 kU/ml IFN- α einen 37-fachen Anstieg bewirkte (Abb. 3.4c). In Kombination mit 100 kU/ml IFN- α war der Anstieg 39-fach (Abb. 3.4d). Ribavirin führt in HepG2-Zellen in Konzentrationen, die im Patientenserum gemessenen Plasmakonzentrationen vergleichbar sind, zu einer deutlichen Caspaseaktivierung (Ilyin, Langouet et al. 1998). Auch IFN- α ist hierzu in der Lage. In der Kombination ist dieser Effekt noch ausgeprägter. Für die nachfolgenden Experimente wurden diese Dosierungen deshalb als Standard gewählt, weil durch sie maximale Effekte erzielt wurden.

Abbildung 3.4

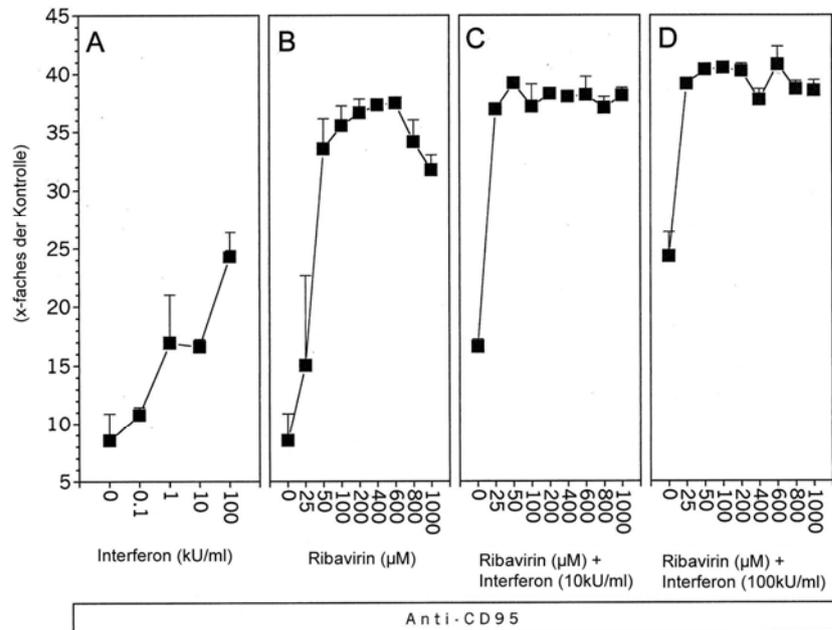


Abb. 3.4: IFN- α und Ribavirin verstärken die anti-CD95 vermittelte Caspaseaktivität in HepG2-Zellen.

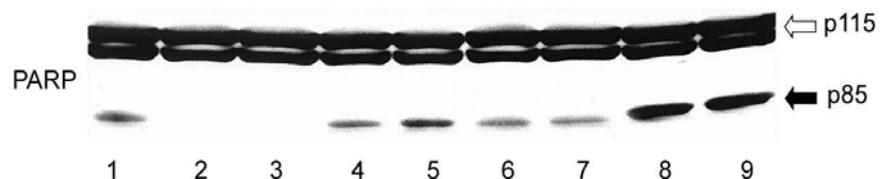
Lysate von HepG2-Zellen wurden untersucht auf Caspase-3-artige Aktivität durch DEVD-AMC Messung nach Inkubation über 24h mit den angegebenen Stimuli und anschließende Stimulation mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD95 Antikörper. Der Anteil der AMC Freisetzung wurde fluorometrisch gemessen und als Vielfaches der AMC Freisetzung in unstimulierten Zellen angegeben. (A) IFN- α alleine; (B) Ribavirin alleine; (C) 10 kU IFN- α pro ml plus Ribavirin in steigender Dosierung (siehe Abszisse). Die Zahlen sind Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus drei repräsentativen Experimenten.

3.1.5 Interferon-alpha und Ribavirin verstärken die anti-CD95 Antikörper induzierte Spaltung von PARP

Um die funktionelle Bedeutung der Caspaseaktivität zu belegen, wurden neben fluorometrischen Methoden auch Westernblots zum Nachweis von Caspasesubstratspaltprodukten durchgeführt. Das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) diente hierbei als klassisches Caspasesubstrat.

Eine alleinige Stimulation mit IFN- α , Ribavirin oder deren Kombination führte nicht zu einer PARP-Spaltung (Ergebnisse nicht abgebildet). Auch bei alleiniger anti-CD95 Antikörper Behandlung war kein PARP-Spaltprodukt nachweisbar (Abb. 3.5, Spur 2). Dies entspricht der bekannten Resistenz von HepG2-Zellen gegenüber anti-CD95. Bei den gleichzeitig mit anti-CD95 Antikörper und IFN- α bzw. Ribavirin behandelten Zellen ließen sich dagegen PARP-Spaltprodukte nachweisen (Spur 4 bis 7). Eine Kombination beider antiviraler Substanzen führte auch hier zu einer Verstärkung des Effektes (Spur 8 und 9). Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass eine gleichzeitige Stimulation der Zellen mit IFN- α und/oder Ribavirin mit anti-CD95 Antikörper zu einer Aktivierung von Caspasen führt.

Abbildung 3.5



Vorinkubation 24h	Ribavirin (μM)				10^2	10^3			10^2	10^3
	Interferon-alpha (U/ml)						10^4	10^5	10^4	10^5
Stimulation 4h	Anti-CD95	+	+		+	+	+	+	+	+
	CHX	+								

Abb. 3.5: Eine Vorbehandlung mit IFN- α und Ribavirin verstärkt die anti-CD95 Antikörper vermittelte Spaltung von PARP.

HepG2-Zellen wurden über 24 Stunden mit Medium (Spur 1 bis 3), Ribavirin (Spur 4 und 5), IFN- α (Spur 6 und 7) oder in Kombination (Spur 8 und 9) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen über 4 Stunden mit Medium (Spur 3), 0,25 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD95 Antikörper (Spur 1,2 und 4 bis 9) oder anti-CD95 Antikörper plus CHX (Spur 1) als Positivkontrolle stimuliert. Zelllysate wurden im Westernblot auf PARP-Spaltprodukte untersucht. Ungespaltenes PARP wird durch leere Pfeile und das Spaltprodukt durch die ausgefüllten markiert.

3.1.6 Immunzytologischer Nachweis der Effektorcaspase-3

Die Messung von Caspasenaktivität anhand der AMC Freisetzung ist eine sehr sensitive und leicht quantifizierbare Methode. Eine Identifizierung der einzelnen beteiligten Caspasen ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Um die fluorometrisch erhobenen Daten auch anhand einer weiteren Nachweismethode zu bestätigen, wurden immunzytologische Färbungen mit einem spezifischen Caspase-3-Antikörper durchgeführt. Caspase-3 ist die wichtigste und gleichzeitig zentrale Effektorcaspase, weil verschiedene Aktivierungswege dort zusammenführen. Sobald sie durch Spaltung aktiviert wird, schneidet Caspase-3 verschiedene zelluläre Substrate (z.B. PARP), was schließlich zu den charakteristischen Veränderungen bei der Apoptose führt. Repräsentative Übersichtsaufnahmen sind in Abbildung 3.6 dargestellt und in Abbildung 3.7 semiquantitativ zusammengefasst. Stimulation mit anti-CD95 Antikörper induzierte nur bei 10 Zellen pro Gesichtsfeld eine Caspase-3 Aktivierung (Abb. 3.6a und 3.7). Die Anzahl positiver Zellen konnte durch Vorinkubation mit IFN- α auf 30 Zellen pro Gesichtsfeld (Abb. 3.6b und 3.7) und durch Ribavirin auf 55 Zellen pro Gesichtsfeld erhöht werden. Die Kombination beider Substanzen steigerte die Zahl der positiven Zellen sogar auf 60 pro Gesichtsfeld (Abb. 3.6d und 3.7).

Mit diesem immunzytologischen Experiment konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung der Zellen mit anti-CD95 Antikörper und IFN- α und/oder Ribavirin zu einer Aktivierung der zentralen Effektorcaspase-3 führt.

Abbildung 3.6

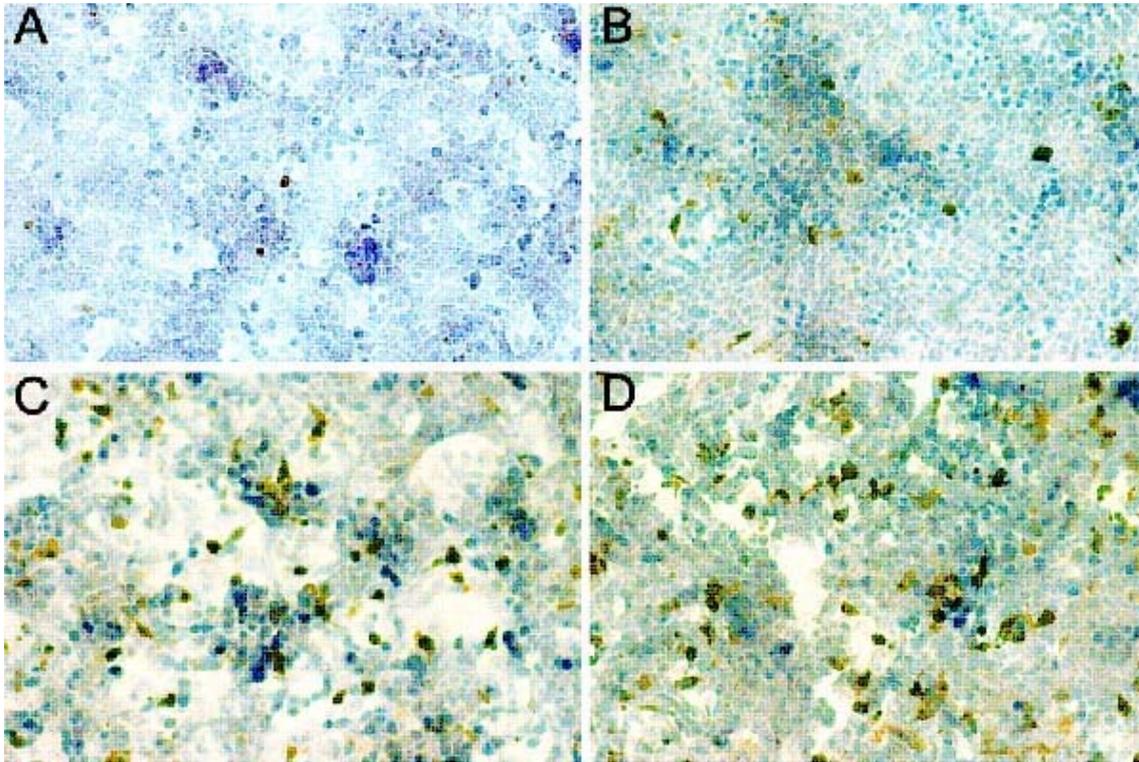


Abb. 3.6: Vorstimulation mit IFN- α und Ribavirin verstärkt die anti-CD95 Antikörper vermittelte Aktivierung von Caspase-3.

Repräsentative Übersichtsaufnahmen von HepG2-Zellen nach Inkubation mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD95 Antikörper über 4 Stunden und anschließende immunhistochemische Färbung für Caspase-3. (A) keine Vorbehandlung; (B) Vorbehandlung mit 10 kU/ml IFN- α über 24 Stunden; (C) Vorbehandlung mit 100 μM Ribavirin über 24 Stunden; (D) Vorbehandlung mit 10 kU/ml IFN- α und 100 μM Ribavirin über 24 Stunde.

Abbildung 3.7

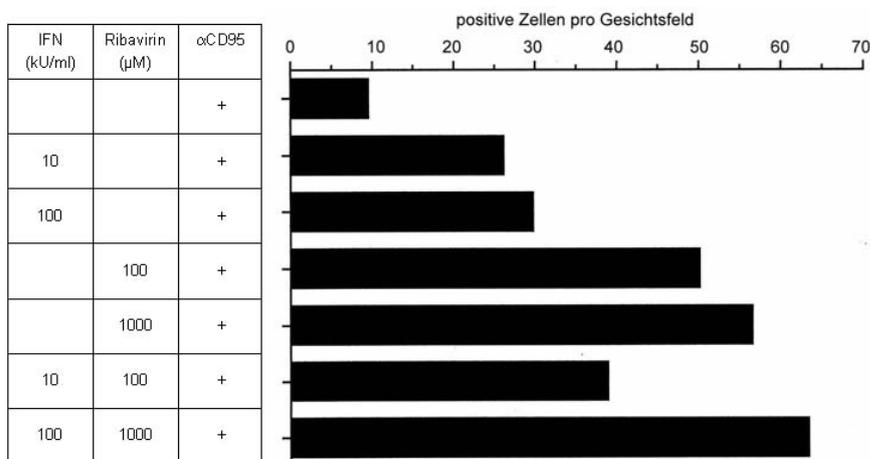


Abb. 3.7: Semiquantitative Auszählung positiver Zellen nach Stimulation der Zellen mit den genannten Substanzen (siehe Abb. 3.6) und immunhistochemische Färbung mit Caspase-3 Antikörper (die Werte beziehen sich auf die Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld).

3.1.7 Effekte von Interferon-alpha und Ribavirin auf die Spaltung von Caspasen

Effektorcaspase-3 und -7

Der verstärkende Effekt von IFN- α und Ribavirin auf die Caspase-3 Aktivierung wurde anschließend durch Westernblotanalysen bestätigt (Abb. 3.8a). Ungespaltene Procaspase-3 wird als 32 kDa Protein nachgewiesen. Nach Aktivierung wird zunächst die kleine 12 kDa-Untereinheit abgespalten, wodurch ein im Westernblot nachweisbares 20 kDa Intermediärfragment mit geringer Aktivität entsteht. Nach Abspaltung der Prodomäne ist dann die 17 kDa große katalytische Untereinheit mit voller proteolytischer Aktivität im Westernblot detektierbar. Interferon, Ribavirin, deren Kombination (nicht abgebildet) und die alleinige Stimulation mit anti-CD95 Antikörper (Abb. 3.8a, Spur 2) führten nicht zu einer proteolytischen Prozessierung von Caspase-3 und -7.

Die Vorinkubation mit IFN- α mit anschließender Gabe des anti-CD95 Antikörpers führte zur Spaltung von Caspase-3 in das 17 kDa Fragment (Spur 6 und 7). Ribavirin verursachte hier eine Spaltung in die 17 kDa und 20 kDa Untereinheiten (Spur 4 und 5). In der Kombination zeigte sich eine selektive Vermehrung des 20 kDa Fragments (Spur 8 und 9).

Bei Caspase-7 handelt es sich um eine weitere Effektorcaspase, welche die DEVD Tetrapeptidsequenz erkennt und deshalb für eine Caspase-3-ähnliche Aktivität in fluorometrischen Tests verantwortlich sein könnte. In den nach Caspase-7 gefärbten Westernblots wird sie in ihrer ungeschnittenen Form als 35 kDa Fragment erkannt. Die Aktivierung erfolgt über das 32 kDa Zwischenprodukt zum 19 kDa Endprodukt. Entsprechend den Ergebnissen für Caspase-3 führte anti-CD95 Antikörperbehandlung zu einer moderaten Spaltung in das 32 kDa Spaltprodukt (Abb. 3.8b, Spur 2). Vorinkubation mit IFN- α verstärkte die Caspase-7 Spaltung in die 32 kDa und 19 kDa Fragmente

(Spur 6 und 7). Ribavirin führte vor allem zu einer vermehrten Spaltung in das 32 kDa Fragment (Spur 4 und 5). Vorstimulation mit IFN- α und Ribavirin gemeinsam erzeugte mehr aktive Caspase-7 als die jeweilige Einzelsubstanz (Spalte 8 und 9).

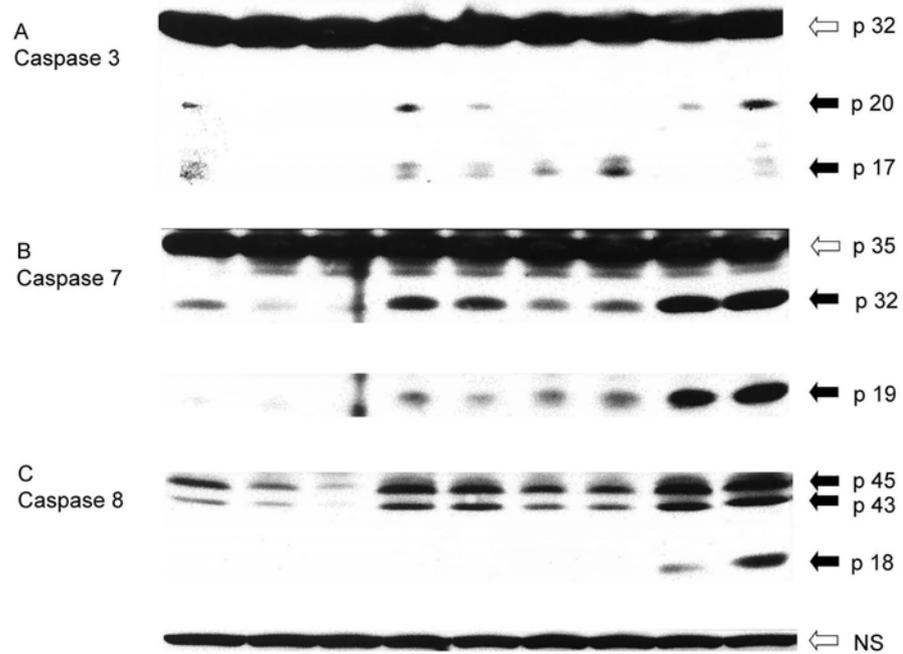
Diese Resultate zeigen, dass die anti-CD95 Antikörper vermittelte Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 durch Vorstimulation mit IFN- α , Ribavirin oder deren Kombination verstärkt wird.

Initiatorcaspase-8

Eine Stimulation des CD95-Rezeptors führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Initiator-Procaspase-8. Die aktive Form der Caspase-8 schneidet eine Reihe anderer Caspasen einschließlich der Effektorcaspasen Procaspase-3 und Procaspase-7. Deshalb wurde in Westernblot Experimenten untersucht, ob das Ausmaß der Caspase-8 Spaltung durch Inkubation mit IFN- α und Ribavirin beeinflusst wird. Ungeschnittene Procaspase-8 wird darin als 53/55 kDa Protein erkannt. Nach Aktivierung entsteht das prozessierte Intermediärfragment als 41/43 kDa Protein, das anschließend in ein 18 kDa Fragment gespalten wird. Stimulation mit anti-CD95 Antikörper alleine führte zu einer moderaten Aktivierung von Caspase-8 (Abb. 3.8c, Spur 2). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Caspase-3 und Caspase-7 verstärkte die Zugabe von CHX die Prozessierung von Caspase-8 (Spur 1). Vorinkubation mit IFN- α und Ribavirin gemeinsam führte zu einem verstärkten Auftreten des Intermediärproduktes p41/p43 (Spur 4 bis 7) und der aktiven Form p18 (Spur 8 und 9). Ohne Zusatz von anti-CD95 Antikörper zeigte sich nach Inkubation mit IFN- α und Ribavirin keine Spaltung von Caspase-8 (Ergebnisse nicht abgebildet).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 nach anti-CD95 Stimulation durch Vorinkubation mit IFN- α oder Ribavirin verstärkt wird und die Wirkung durch die Kombination weiter zunimmt. Darüber hinaus kommt es auch zur Aktivierung der Effektorcaspasen Caspase-3 und -7. Diese Vorgänge korrelieren mit einer verstärkten Spaltung des Caspasen-Substrates PARP und mit einer Zunahme der Apoptose.

Abbildung 3.8



Vorinkubation 24h	Ribavirin (μM)				10^2	10^3			10^2	10^3
	Interferon-alpha (U/ml)						10^4	10^5	10^4	10^5
Stimulation 4h	Anti-CD95	+	+		+	+	+	+	+	+
	CHX	+								

Abb. 3.8:

Vorstimulation mit IFN- α und Ribavirin verstärkt die anti-CD95 Antikörper vermittelte Aktivierung von Caspase-3, -7 und -8. HepG2-Zellen wurden über 24 Stunden mit Medium (Spur 1 bis 3), Ribavirin (Spur 4 und 5), IFN- α (Spur 6 und 7) der Kombination (Spur 8 und 9) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation über 4 Stunden mit Medium (Spur 3), 0,25 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD95 Antikörper (Spalte 1,2 und 4 bis 9) oder anti-CD95 Antikörper plus 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX (Spur 1) als Postivkontrolle. Zelllysate wurden im Westernblot untersucht nach Caspase-3 (A), Caspase-7 (B) und Caspase-8 (C). Ungespaltene Procaspasen werden durch leere Pfeile, Spaltprodukte durch die ausgefüllten markiert. Eine unspezifische Bande („NS“) dient als interne Ladungskontrolle.

3.2 Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf den NF- κ B-Signalweg

Neben ihren pro-apoptotischen Einflüssen über Caspasen können IFN-A alpha und Ribavirin auch andere für die Apoptose bedeutsame zelluläre Mechanismen modulieren (Ning, Brown et al. 1998; Yang, Murti et al. 1998; Tam, Pai et al. 1999). Diese Effekte werden zum Teil über die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren vermittelt. Von besonderer Bedeutung ist hier der Transkriptionsfaktor NF- κ B. In Abhängigkeit des untersuchten Modells sind dabei sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte von NF- κ B beschrieben worden (Beg and Baltimore 1996; Kuhnel, Zender et al. 2000; Kim, Schwabe et al. 2002). Im folgenden Teil der Arbeit soll daher die Bedeutung von NF- κ B für die Wirkung von Ribavirin und Interferon-alpha alpha auf HepG2-Zellen untersucht werden.

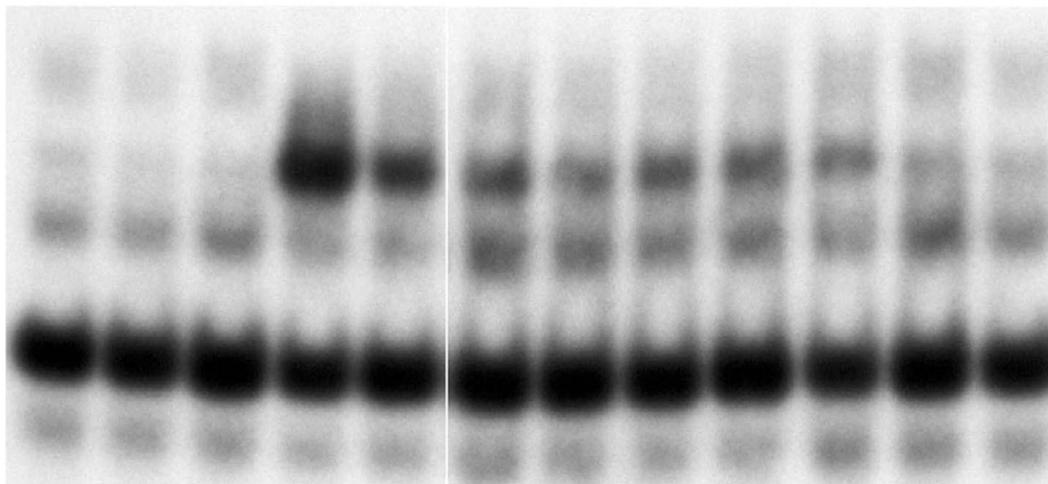
3.2.1 Aktivierung von NF- κ B über Todesrezeptoren

Zunächst sollte die Frage einer möglichen konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in HepG2-Zellen geklärt werden. Die Messung der Aktivität von NF- κ B wurde dabei mittels Gelretardationsanalyse (EMSA) durchgeführt. In einem weiteren Teil des Experiments sollte dann die Stimulierbarkeit des NF- κ B Signalweges in HepG2 untersucht werden. Dazu wurden HepG2-Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit TNF alpha behandelt. TNF alpha wurde gewählt, weil dessen Signalmechanismus genau definiert ist.

Dabei zeigte sich, dass unter Ruhebedingungen keine konstitutive Aktivierung von NF- κ B in HepG2 besteht. Bei Stimulation mit TNF alpha konnte bereits nach 30 Minuten eine starke Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden, welche bis zur Stunde 8 auf maximalem Niveau bestehen blieb und in geringerem Ausmaß noch bis nach 14 Stunden detektiert werden konnte.

Demzufolge kann NF- κ B in HepG2-Zellen über einen klassischen Stimulus wie TNF alpha aktiviert werden. Die frühe Aktivierung bereits nach 30 Minuten ist gut vereinbar mit der bekannten kurzen Latenz bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Als Stimulationszeit für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb als Standard eine Stunde Stimulationsdauer gewählt.

Abbildung 3.9



Kontrolle (h)			Stimulation mit TNF alpha in Stunden (h)								
1	3	6	0,5	1	3	4	6	8	14	24	48

Abb. 3.9: Aktivierung von NF- κ B durch Stimulation mit TNF alpha.

HepG2-Zellen wurden über verschiedenen Zeiträume (30 Minuten bis 24 Stunden) mit TNF in einer Konzentration von 20 ng/ml stimuliert. Anschließend wurde die DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors durch Gelshiftanalyse untersucht. Gleiche Mengen Kernextrakt stimulierter und unstimulierter Zellen wurden dabei mit 32 P-markierten Oligonukleotiden inkubiert. Die DNA-Proteinkomplexe wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die p65 Untereinheit von NF- κ B ist über der unspezifischen Ladungskontrolle dargestellt.

3.2.2 Effekt von Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf NF- κ B

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NF- κ B in HepG2-Zellen über den klassischen Stimulus TNF alpha aktiviert werden kann. Anschließend sollte für die antiviralen Substanzen allein und in Kombination

untersucht werden, ob sie in der Lage sind, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren.

Hierzu wurden zuerst HepG2-Zellen über 24 Stunden mit Interferon-alpha alpha inkubiert. Im EMSA wurde dann die NF- κ B Bindung untersucht. Es zeigte sich, dass nach Interferon-alpha-behandlung in verschiedenen Dosierungen keine NF- κ B Aktivierung nachweisbar war (Spur 3 bis 6). Auch die Inkubation mit Ribavirin oder die Kombination beider Substanzen führte nicht zur Aktivierung von NF- κ B (nicht abgebildet). Die Vorbehandlung mit den antiviralen Substanzen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die maximale Aktivität von NF- κ B, die durch die Standardstimulation mit TNF erreicht wurde (Spur 7 bis 10).

Abbildung 3.10

Stimulation mit TNF (1 h)	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Vorstimulation mit IFN-A (24 h)	-	-	5	10	50	100	5	10	50	100

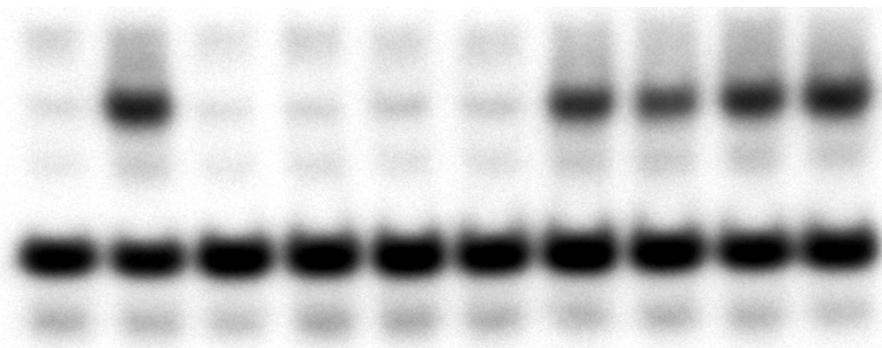


Abb. 3.10: Effekt von Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf NF- κ B in von HepG2-Zellen

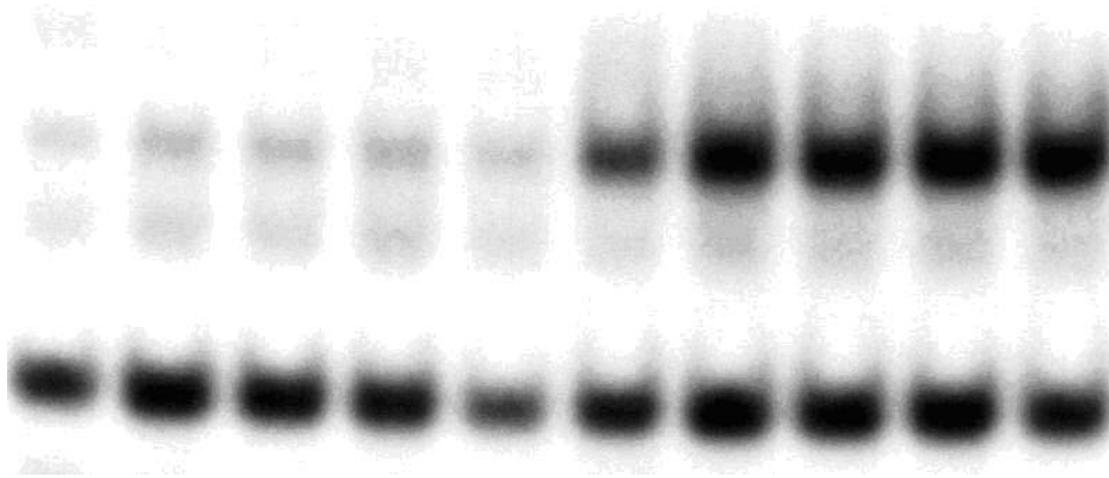
HepG2-Zellen wurden zunächst mit Interferon-alpha alpha in verschiedenen Konzentrationen ($\times 10^3$ U/ml) über 24 Stunden vorbehandelt (Spur 3 bis 10) und danach mit TNF alpha (20 ng/ml) stimuliert (Spur 7 bis 10). Anschließend wurde die DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors durch Gelshiftanalyse untersucht. Gleiche Mengen Kernextrakt stimulierter und unstimulierter Zellen wurden dabei mit 32 P-markierten Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Proteinkomplexe durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die p50 Untereinheit von NF- κ B ist über der unspezifischen Ladungskontrolle dargestellt.

3.2.3 Effekt von Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf TNF induzierte NF-κB Aktivität

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation durch Ribavirin in verschiedenen Dosierungen (nicht abgebildet) und in Kombination mit Interferon-alpha alpha nicht zu einer Aktivierung von NF-κB führt. Frühere Studien zeigten hingegen eine modulierende Wirkung von IFN-α auf die Signaltransduktionskaskade von TNF alpha. So konnte zum Beispiel an IFN-α behandelten HepG2-Zellen eine Abnahme der NF-κB Aktivität infolge Herunterregulation des TNF-Rezeptors nachgewiesen werden (Aggarwal and Pandita 1994). Im folgenden Teil der Studie sollte daher der Einfluss von IFN-α und Ribavirin auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB in TNF alpha vorstimulierten Zellen untersucht werden. Dazu wurden HepG2-Zellen für eine Stunde mit einer TNF alpha Lösung in einer Konzentration von 20 ng/ml vorbehandelt und im Anschluss für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ribavirin und IFN-α behandelt. Bei der Untersuchung der mit TNF alpha vorstimulierten Zellen fand sich in der Gelshiftanalyse kein Hinweis für eine modulierende Wirkung von IFN-α auf die Aktivität von NF-κB. Äquivalente Resultate fanden sich auch bei der Monotherapie mit Ribavirin (nicht abgebildet). Eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit einer Maximaldosis IFN-α (100000 U/ml) und unterschiedlichen Mengen Ribavirin führte bereits bei der niedrigsten Ribavirindosierung von 250 μM zu einer deutlichen Zunahme der NF-κB Aktivität. Diese konnte durch eine weitere Erhöhung nicht gesteigert werden.

Für HepG2-Zellen muss gefolgert werden, dass nur bei Kombination der beiden antiviralen Substanzen ein Einfluss auf den Aktivitätszustand des Transkriptionsfaktors NF-κB besteht. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Aktivitätszunahme, so dass die Resultate dieses Experiments die Erkenntnisse von Aggarwal et al. nicht bestätigen konnten.

Abbildung 3.11



Stimulation mit TNF (1 h)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Vorstimulation mit IFN- α (24 h)	100000 U/ml									
Vorstimulation mit Rib (24 h)	0	250	500	1000	5000	0	250	500	1000	5000

Abb. 3.11: Zunahme der TNF alpha induzierten Aktivität von NF- κ B durch Stimulation mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin in HepG2.

HepG2-Zellen werden nach einstündiger Vorinkubation mit TNF alpha (20 ng/ml) mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin in verschiedenen Konzentrationen über 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors durch Gelshiftanalyse untersucht. Gleiche Mengen Kernextrakt stimulierter und unstimulierter Zellen wurden dabei mit 32 P-markierten Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Proteinkomplexe durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die p65 Untereinheit von NF- κ B ist über der unspezifischen Ladungskontrolle dargestellt.

3.3 Einfluss von Cycloheximid auf die anti-CD95 Antikörper induzierte Apoptose

Die Hepatomzelllinie HepG2 ist nur wenig sensitiv gegenüber der Stimulation des Todesrezeptors mit anti-CD95 Antikörper alleine. Aus früheren Studien ist bekannt, dass diese Apoptoseresistenz durch die gleichzeitige Gabe des

Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid durchbrochen werden kann (Hill, Schmidt et al. 1995). In den folgenden Experimenten sollten diese Mechanismen der Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Todesrezeptorsignalweg untersucht werden. In einem ersten Versuch wurde deshalb zunächst der pro-apoptotische Effekt der Kombinationsbehandlung von anti-CD95 und CHX an HepG2-Zellen untersucht.

Die Zellen wurden jeweils für bis zu 48 Stunden mit Cycloheximid (10 µg/ml), anti-CD95 Antikörper (0,25 µg/ml) oder der Kombination beider Agenzien inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität im MTT Assay (Abb. 3.9A) und die Apoptoserate durch den Nachweis hypodiploider Nuclei im FACS gemessen. Dabei zeigte sich bereits nach 6 Stunden bei der Kombination von CHX und anti-CD95 Antikörper eine Zunahme der Apoptoserate auf 20%. Nach 12 Stunden war die Apoptoserate bei alleiniger Stimulation mit CHX oder anti-CD95 gegenüber unstimulierten Zellen nicht erhöht. Bei der Kombination zeigte sich jedoch zu diesem Zeitpunkt eine Apoptoserate von 90%.

Abbildung 3.12

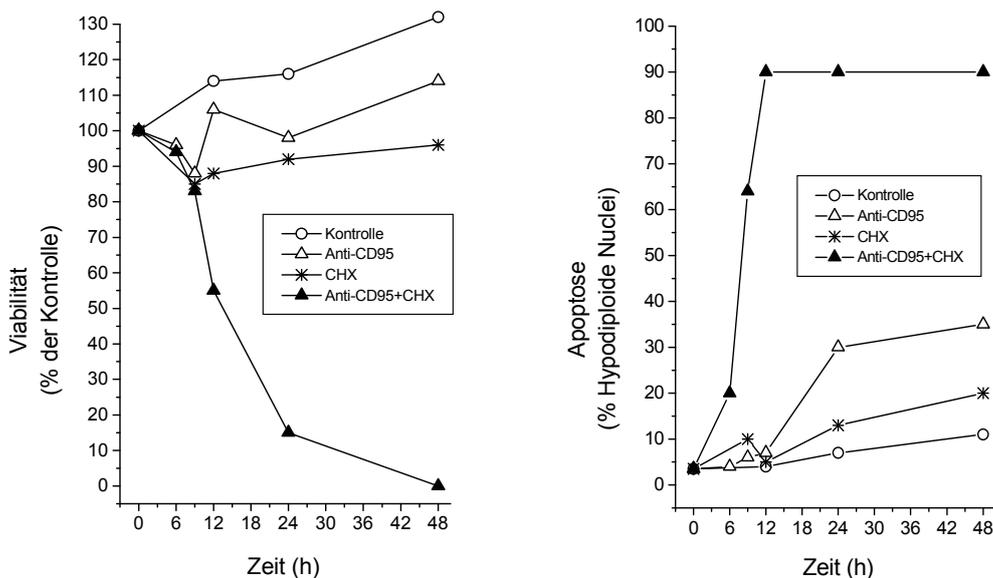


Abb.3.12: HepG2-Zellen wurden für 0-48 h mit den angegebenen Substanzen inkubiert.

A) Bestimmung der Viabilität der HepG2-Zellen im MTT-Assay.

B) Zunahme der Apoptose durch die Kombination von Cycloheximid und anti-CD95 Antikörper.

HepG2-Zellen wurden bis zu 48 Stunden mit den genannten Substanzen (10 µg/ml Cycloheximid, 0,25 µg/ml anti-CD95 Antikörper) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch hypotone Lyse isoliert, mit Propidium-Iodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. 8.000 Ereignisse zum jeweiligen Zeitpunkt wurden ausgewertet und sind graphisch prozentual aufgetragen. Die Zahlen sind Mittelwerte mit einer Standardabweichung aus drei repräsentativen Experimenten.

3.3.1 Wirkung von anti-CD95 Antikörper und CHX auf die Caspaseaktivität

Durch die Kombination von anti-CD95 Antikörper und CHX wurde eine Steigerung der Apoptoserate erzielt. Es sollte anschließend weiter untersucht werden, ob die Zunahme der Apoptoserate mit einer gesteigerten Caspaseaktivität verbunden ist. Dazu wurden die Zellen für 1 bis 6 Stunden mit anti-CD95 Antikörper und CHX inkubiert und anschließend die Caspaseaktivität fluorometrisch gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von CHX und anti-CD95 Antikörper zu einer verstärkten Caspaseaktivität führt (Abb. 3.13),

In einem zweiten Schritt wurde versucht, verschiedene Caspasen, die an diesem Vorgang beteiligt sind, zu identifizieren. Exemplarisch wurden deshalb als zentrale Initiatorcaspase Caspase-8 und als Effektorcaspase Caspase-3 im Westernblot untersucht.

Dabei zeigte sich durch den Nachweis der aktiven Spaltprodukte im Westernblot (Abb. 3.14), dass durch die Kombinationsbehandlung beide Caspasen aktiviert werden.

Abbildung 3.13

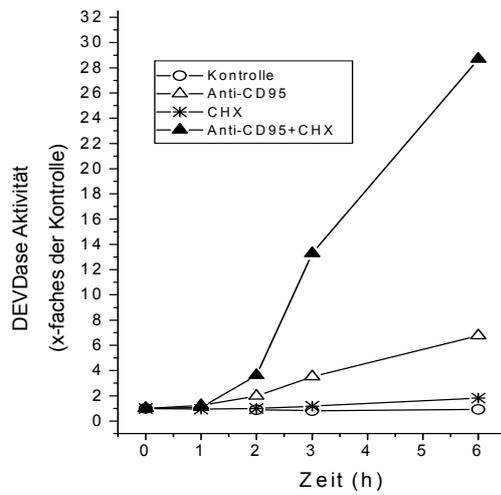


Abbildung 3.14

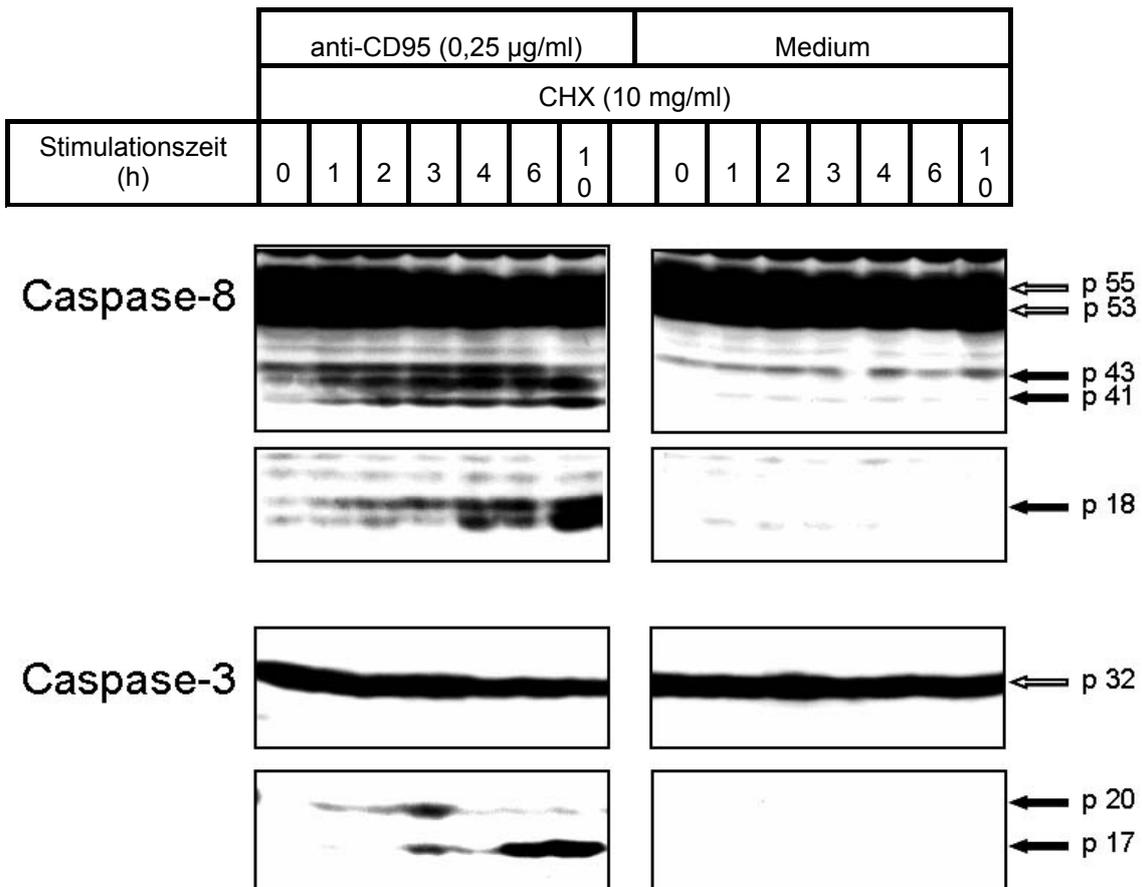


Abb.3.13+14: HepG2-Zellen wurden für 0-24 h mit den angegebenen Substanzen inkubiert.

3.13: Lysate von HepG2-Zellen wurden untersucht auf Caspase-3-artige Aktivität durch DEVD-AMC Messung nach Inkubation über verschiedene Zeiträume mit den angegebenen Stimuli (10 µg/ml Cycloheximid, 0,25 µg/ml anti-CD95 Antikörper). Der Anteil der AMC Freisetzung wurde fluorometrisch gemessen und als Vielfaches der AMC Freisetzung in unstimulierten Zellen angegeben.

3.14: Inkubation von HepG2-Zellen über verschiedene Zeiträume mit 10 µg/ml CHX, 0,25 µg/ml anti-CD95 Antikörper oder der Kombination beider Agenzien. Zelllysate werden im Westernblot auf Caspase-3 und -8 untersucht. Ungespaltene Procaspasen werden durch weissen Pfeile, Spaltprodukte durch die schwarzen markiert. Eine unspezifische Bande dient als interne Ladungskontrolle.

3.3.2 Differentielle Wirkung von anti-CD95 Antikörper und CHX auf die Inhibitoren der Apoptose „X-linked inhibitor of apoptosis“ (XIAP) und Bcl-2

Verschiedene Ergebnisse zur Expression von Apoptose-inhibierenden Substanzen unter der Behandlung mit CHX liegen bereits vor. Zu diesen Inhibitoren gehören unter anderem XIAP und Bcl-2. In einer anderen Studie wurde in einer B-lymphatischen Zelllinie XIAP als CHX-sensitiver Inhibitor identifiziert (Kang, Kisenge et al. 2003).

In dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Kombination von CHX und anti-CD95 Antikörper bei der Induktion von Apoptose in HepG2-Zellen auf einer Abnahme der Synthese von Apoptoseinhibitoren (XIAP und Bcl-2) beruht. Dazu wurden die Zellen für verschiedene Zeiten mit anti-CD95 Antikörper, CHX oder der Kombination behandelt und die Expression von XIAP und Bcl-2 mittels Westernblot-Analyse untersucht.

Es stellte sich dabei heraus, dass CHX alleine die Bcl-2-Expression nach 8 Stunden fast vollständig unterdrückt, während die XIAP-Expression allenfalls leicht reduziert ist. Stimulation mit anti-CD95 Antikörper lässt die Bcl-2-Expression unverändert.

Im Gegensatz hierzu war die XIAP-Expression nach 8 h Stimulation mit anti-CD95 Antikörper deutlich reduziert und nach 24 h fast vollständig

verschwunden. Eine Reduktion der Expression von Bcl-2 durch die Behandlung von HepG2 mit anti-CD95 erfolgte nicht.

Die Kombination von anti-CD95 Antikörper mit CHX führte hingegen sowohl zu einer Abnahme der Expression von Bcl-2 als auch von XIAP. Zusätzlich ist die XIAP-Abnahme beschleunigt (nach 8 Stunden fast komplett gegenüber 24 Stunden mit anti-CD95 Antikörper alleine).

Abbildung 3.15

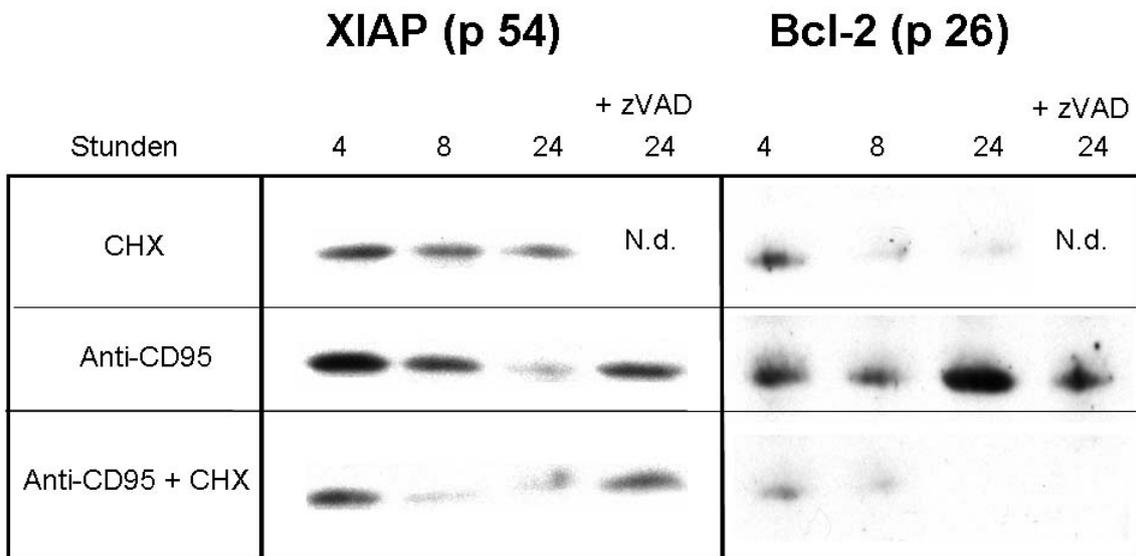


Abb. 3.15: HepG2-Zellen wurden für 4-24 h mit den angegebenen Stimuli inkubiert.

Nachweis der Expression von XIAP und Bcl-2 im Westernblot. zVAD = pharmakologischer Breitspektrum-Caspaseninhibitor.

3.3.3 Einfluss von Cycloheximid auf die NF- κ B Aktivierung

Die Resultate der Untersuchungen zum Apoptoseverhalten der HepG2-Zellen zeigten eine Resistenz der Zellen gegenüber einer alleinigen Aktivierung des Todesrezeptorweges durch Inkubation mit einem anti-CD95 Antikörper. Im Gegensatz dazu führt eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid zu einer starken Induktion von Apoptose (eigene Resultate und (Santiago, Galindo et al. 2004)). Die Mechanismen, die zum Durchbrechen der Apoptoseresistenz führen, sind nicht genau

charakterisiert. Im folgenden Teil der Arbeit sollte die Wirkung der Kombinationsbehandlung mit anti-CD95 Antikörper und Cycloheximid auf die Aktivität von NF- κ B untersucht werden. Dazu wurden die Zellen für 4 Stunden mit anti-CD95 Antikörper (0,25 μ g/ml) und mit CHX (10 μ g/ml) behandelt.

Frühere Studien zeigten in verschiedenen Zelllinien eine Beteiligung von Caspase-8 bei der Aktivierung von NF- κ B (Jun, Chung et al. 2005). In einem weiteren Telexperiment wurde daher der Einfluss des Breitspektrum-Caspaseninhibitors zVAD-fmk bei der Aktivierung von NF- κ B durch anti-CD95 Antikörper und Cycloheximid untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass eine Stimulation des Todesrezeptors mit anti-CD95 Antikörper in HepG2-Zellen nicht zur Aktivierung von NF- κ B führt. Eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit anti-CD95 Antikörper und CHX bewirkte dagegen eine deutliche Zunahme der Aktivität von NF- κ B. Die Größenordnung dieser Stimulation lag dabei im Bereich der durch Behandlung mit TNF alpha erreichten Werte (nicht abgebildet). Die gleichzeitige Inkubation mit dem Breitspektrum-Caspaseninhibitor zVAD-fmk führte nicht zu einer Abschwächung der Aktivität von NF- κ B.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Kombination pro-apoptotischer Stimuli in HepG2-Zellen zu einer Aktivierung des Proliferationssignals NF- κ B führt. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von aktivierten Caspasen.

Abbildung 3.16

CHX (10 µg/ml)		+	+		+
anti-CD95 (0,25 µg/ml)	+	+	+	+	
zVAD (100 µM)			+	+	

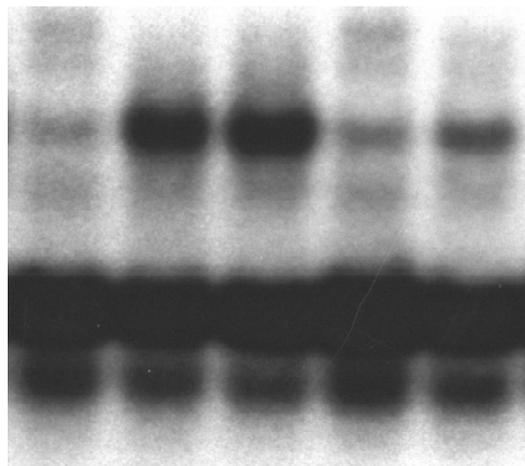


Abb. 3.16: NF-κB Aktivierung durch Stimulation mit anti-CD95 und Cycloheximid.

HepG2-Zellen werden über 4 Stunden mit anti-CD95, CHX und zVAD-fmk stimuliert. Anschließend wurde die DNA Bindungskapazität des Transkriptionsfaktors durch Gelshiftanalyse untersucht. Gleiche Mengen Kernextrakt stimulierter und unstimulierter Zellen wurden dabei mit ³²P-markierten Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Proteinkomplexe durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Die p65 Untereinheit von NF-κB ist über der unspezifischen Ladungskontrolle dargestellt.

4 DISKUSSION

4.1 Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf Apoptose bei Hepatomzellen

Die Kombinationstherapie aus Ribavirin und Interferon-alpha stellt gegenwärtig die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C dar. Verglichen mit der Monotherapie mit Interferon-alpha alpha hat die Kombination zur Zunahme der Viruseliminierung von 15% auf ungefähr 50% geführt. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind derzeit nur teilweise verstanden. Bisherige Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung von programmiertem Zelltod (Apoptose) hin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkung dieser Substanzen zu liefern. Dazu wurde der Effekt der Einzelsubstanzen beziehungsweise der Kombination auf die Hepatomzelllinie HepG2 untersucht.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde die durch diese Substanzen in HepG-2 Zellen induzierte Apoptose mittels Durchflusszytometrie untersucht. In den folgenden Teilen der Arbeit wurden die apoptotischen Vorgänge auf der Ebene der Caspasen und Apoptoseinhibitoren genauer charakterisiert. Anschließend wurde ein möglicher Einfluss von Apoptose, ausgelöst durch klassische Stimuli sowie die antiviralen Substanzen Interferon-alpha und Ribavirin, auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht.

4.1.1 Einfluss von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Induktion der Apoptose

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit der Kombination mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin zu Apoptose führt und in stärkerem Maße Hepatomzellen gegenüber anti-CD95 Antikörper vermittelter Apoptose sensibilisiert. Anhand der sehr sensitiven fluorometrischen Daten wurde deutlich, dass es auch ohne die gleichzeitige Stimulation mit anti-CD95 Antikörper zur Aktivierung von Caspasen kommt. Die Aktivität war größer, wenn

Interferon-alpha alpha und Ribavirin bei der Stimulation gemeinsam verwendet wurden. Trotz der moderaten Caspaseaktivierung kam es aber weder nach alleiniger Stimulation noch in Kombination zum Auftreten eines ihrer Spaltprodukte im Westernblot. Auch Messungen zur Zellviabilität zeigten keine Zunahme der Apoptose. Diese Daten werden durch Ergebnisse anderer Gruppen zum Effekt von Interferon-alpha alpha auf Hepatomzellen bestätigt (Legrand, Vadrot et al. 2004).

Stimulation mit anti-CD95 Antikörper alleine führte ebenfalls nur zu einer geringen Zunahme von Apoptose und Caspaseaktivität, die zwar fluorometrisch aber nicht im Westernblot nachgewiesen werden konnte. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass eine funktionelle Relevanz in Bezug auf den Übergang der Zelle in die Apoptose zumindest angezweifelt werden muss. Für die zellulären Abläufe bedeutet dies, dass die Caspaseaktivierung durch die antiviralen Substanzen alleine zur Induktion von Apoptose nicht ausreicht.

Dagegen wurde nach Vorstimulation mit Interferon-alpha, Ribavirin oder deren Kombination und die anschließende Gabe des anti-CD95 Antikörpers eine deutliche Steigerung der Caspaseaktivität beobachtet werden. Auch im Westernblot gelang dabei der Nachweis der funktionell aktiven Spaltprodukte. Hier ebenfalls vor allem bei der Kombination von Interferon-alpha und Ribavirin. Die verstärkenden Effekte von Interferon-alpha und Ribavirin auf die Caspasenspaltung und -aktivität korrelierten mit einer Zunahme der Spaltung des Caspasensubstrates PARP und mit einer Zunahme der Apoptoserate.

In der Gegenwart von zVAD-fmk, einem Breitband-Caspaseinhibitor, wurden weder Caspaseaktivität noch Apoptose nachgewiesen. Somit könnte eine moderate Caspaseaktivität, wie sie durch Interferon-alpha und Ribavirin verursacht wird, durch Zusammenspiel mit einem zweiten Caspasenaktivator wie dem anti-CD95 Antikörper zur Induktion von Apoptose führen.

Wenn Ribavirin zur Vorinkubation eingesetzt wurde, kam es bereits bei der niedrigsten Dosierung (25 μ M) zu einer deutlichen Verstärkung der Caspaseaktivität bei anschließender Stimulation mit anti-CD95 Antikörper. Bereits die niedrigsten der verwendeten Dosierungen entsprechen den

Serumkonzentrationen, wie sie in verschiedenen Untersuchungen in Patienten gemessen wurden (Khakoo, Glue et al. 1998; Tsubota, Hirose et al. 2003; Uchida, Hamada et al. 2004). Weil Ribavirin aktiv in die Zelle transportiert wird, liegen die intrazellulären Konzentrationen vermutlich noch höher (Glue 1999).

Für die Zellkultorexperimente mit Interferon-alpha alpha wurden höhere Konzentrationen als die in Patientenkollektiven gemessenen verwendet. Ein Grund dafür könnte die geringere Dichte und Sensitivität der IFN- α Rezeptoren unter Kulturbedingungen sein. Längere Inkubationszeiten könnten diesen Effekt möglicherweise aufheben.

In der Folge wurden einzelne Caspasen, die an dem klassischen Todesrezeptorweg beteiligt sind, untersucht. Dabei konnten die aktiven Spaltprodukte mehrerer Caspasen der Caspasenkaskade, darunter die der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspasen-3 und -7, im Westernblot nachgewiesen werden. Die Aktivierung von Caspase-8 legt den Schluss nahe, dass die Initiation von Apoptose nach Vorbehandlung mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin auf Rezeptorebene ausgelöst wird und mit der Aktivierung der zentralen Effektorcaspase-3 einhergeht (extrinsischer Signalweg). Die Ergebnisse bestätigen die Daten anderer Arbeitsgruppen, die für Interferon-alpha alpha eine Todesrezeptor-abhängige Apoptoseinitiation belegen konnten (Balachandran, Roberts et al. 2000).

Anhand von klinischen Daten, die durch Gewebeuntersuchung von Hepatitis C Patienten gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass bei Therapierespondern im Verlauf der Behandlung mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin der lösliche CD95-Ligand in den Hepatozyten schwächer exprimiert wird. Hiernach wäre dann der Apoptose-induzierende Effekt der Therapie und die damit verbundene Gewebeschädigung auf infizierte Zellen und deren Umgebung limitiert (Marin-Serrano, Rodriguez-Ramos et al. 2006). Wenn die Anzahl infizierter Hepatozyten schrittweise abnimmt und weniger CD95-Ligand exprimiert wird, führt eine Stimulation mit Interferon-alpha alpha und Ribavirin alleine nicht mehr zum Zelluntergang. Gesundes Gewebe würde auf diese Weise geschont. Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung des Todesrezeptorsignalweges bei der Apoptose durch die untersuchten antiviralen

Substanzen und bieten einen möglichen Erklärungsansatz für die synergistische Wirkung von anti-CD95 und Ribavirin und IFN- α .

4.1.2 Einflüsse von Ribavirin und Interferon-alpha auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Verschiedene humane Hepatomzelllinien sind resistent gegenüber den typischen Todesrezeptorsignalen TNF und *TNF-Related Apoptosis Inducing Factor* (TRAIL). Als Ursache wurde für TNF eine durch NF- κ B Aktivierung verursachte Blockierung des Jun-Kinase-Signalweges in Hepatozyten beschrieben (Liu, Lo et al. 2002). Umgekehrt konnte bei der Resistenz gegenüber TRAIL durch Blockierung der I κ B Kinase, die zur Aktivierung von NF- κ B führt, der Mechanismus der Apoptoseresistenz direkt ausgeschaltet werden (Kim, Schwabe et al. 2002).

Es sollte deshalb zunächst geklärt werden, ob die Apoptoseresistenz gegenüber anti-CD95 Antikörper in HepG2 durch eine konstitutive NF- κ B Aktivierung vermittelt wird.

Dabei konnte in den Gelshiftuntersuchungen gezeigt werden, dass in HepG2 Hepatomzellen eine konstitutive NF- κ B Aktivierung nicht vorliegt. Eine Aktivierung über den klassischen Weg der TNF-Rezeptorfamilie ist aber möglich. Die Behandlung von HepG2-Zellen mit Interferon-alpha und Ribavirin alleine oder in Kombination führte nicht zu einer Aktivierung von NF- κ B. In verschiedenen Dosierungen der beiden Substanzen wurde auch nach 24 Stunden Stimulation keine Aktivierung von NF- κ B beobachtet.

Daneben wurde auch der Effekt der antiviralen Substanzen auf HepG2 nach vorheriger NF- κ B Aktivierung untersucht. Diese könnte unter dem Gesichtspunkt verschiedener Interaktionen zwischen Erreger und Wirt *in vivo* interessant sein. So wird allgemein angenommen, dass es infolge der Expression verschiedener viraler Proteine in den infizierten Zellen zum Schutz vor Elimination zur anti-apoptischen Reaktion kommt. Dies erfolgt durch die Aktivierung von NF- κ B (Marusawa, Hijikata et al. 1999; Pan, Duan et al. 2001). Eine weitere Erklärung für die persistierende Aktivierung von NF- κ B könnte in

der Interaktion viraler Proteine mit dem Todesrezeptorkomplex bestehen (Honda, Hatano et al. 2000). Außerdem können virusinfizierte Hepatozyten im Rahmen ihres Überlebensmechanismus über die Aktivierung von NF- κ B und die damit verbundene verstärkte Expression von CD95 mRNA bei den angreifenden Lymphozyten Apoptose induzieren (Kuhnel, Zender et al. 2000).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten fanden sich nach Stimulation mit TNF und anschließender Inkubation mit Interferon-alpha alpha in der Gelretardationsanalyse keine Hinweise dafür, dass die gewählte Substanz in den verschiedenen Dosierungen zu einer Abschwächung oder Verstärkung der NF- κ B Aktivität führt.

Gibt man jedoch Interferon-alpha und Ribavirin, nachdem NF- κ B über TNF aktiviert wurde, in Kombination auf die Zellen, findet sich eine Zunahme der NF- κ B Aktivität bereits in der niedrigsten Dosierung von Ribavirin (250 μ M). Für HepG2 muss folglich postuliert werden, dass nur bei Kombination der beiden antiviralen Substanzen ein Einfluss auf den Aktivitätszustand des Transkriptionsfaktors NF- κ B besteht. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Zunahme der NF- κ B Aktivität bei verschiedenen Zelllinien fanden (Yang, Murti et al. 2000).

Es sollte aber erwähnt werden, dass Arbeiten anderer Arbeitsgruppen hier unterschiedliche Resultate bei Hepatomzellen zeigten. Durch die Behandlung mit Interferon-alpha wurde zum Beispiel bei HUH-7 Zellen eine verminderte Aktivität von NF- κ B (Shigeno, Nakao et al. 2003) oder bei HepG2-Zellen eine Abnahme der NF- κ B Aktivität durch Herunterregulation des TNF-Rezepors beobachtet (Aggarwal and Pandita 1994). Vermutlich hängt die Aktivität von NF- κ B von mehreren Faktoren ab. In einem virusinfizierten Zellkultursystem wurden von der Phase der Virusinfektion mit starker Aktivität von NF- κ B bis zur Eliminierung mit gleichzeitiger Abnahme der NF- κ B Aktivität unterschiedliche Aktivierungszustände beobachtet (Clarke, Meintzer et al. 2003).

4.2 Einfluss von Cycloheximid und anti-CD95 Antikörper auf Apoptose-Induktion und NF- κ B-Aktivierung bei HepG2-Zellen

In Thymozyten und B-Lymphozyten von Mäusen wurde festgestellt, dass die Wirkung von CHX stark konzentrationsabhängig ist (nach 24 Stunden Inkubation bei 10 μ g/ml Steigerung und bei 0,1 μ g/ml Abnahme der Apoptoseempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Stimuli). Gleichzeitig kam es zu einer unterschiedlichen Abnahme der Proteinsynthese zwischen 90% (>2,5 μ g/ml) und 15% (<0,1 μ g/ml) (Lemaire, Andreau et al. 1999). In fetalen Rattenhepatozyten verhinderte Cycloheximid in einer Dosierung von 0,5 μ g/ml durch transforming growth factor-beta (TGF-beta) induzierte Apoptose (Sanchez, Alvarez et al. 1997). Dagegen bewirkte die Substanz in höherer Dosierung auch in Rattenhepatozyten Apoptose (Blom, de Bont et al. 1999; Higami, Tanaka et al. 2000). In den Experimenten dieser Arbeit wurde CHX in einer inhibitorischen Konzentration von 5 μ g/ml eingesetzt.

Apoptose kann in HepG2-Zellen über anti-CD95 nur durch Kostimulation mit Cycloheximid ausgelöst werden. Diese Beobachtung steht ein Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen bei der TNF-vermittelten Apoptose in diesen Zellen (Hill, Schmidt et al. 1995). In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es in HepG2 nach alleiniger Stimulation mit dem anti-CD95 Antikörper nach 24 Stunden zu einer Apoptoserate von 35% beziehungsweise 20% bei CHX kommt. Werden die Zellen gleichzeitig mit beiden Substanzen stimuliert, beträgt die Apoptoserate hingegen 90%. In den fluorometrischen Messungen zur Caspaseaktivität zeigte sich für anti-CD95 Antikörper und CHX ein 2- beziehungsweise 4-facher Anstieg und für die Kombination ein 30-facher Anstieg. Die Kostimulation mit beiden Substanzen führte somit zu einer Potenzierung des Apoptosesignals.

Durch den Nachweis der aktiven Spaltprodukte von Caspase-3 und -8 konnte weiterhin belegt werden, dass es sich um ein Signal handelt, das über den Todesrezeptorweg vermittelt wird.

Über die zusätzlichen Effekte, die durch Kostimulation mit CHX vermittelt werden, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Der Einfluss von CHX und anderen Inhibitoren der Translation auf die Apoptose in Hepatozyten ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Wirkung auf die Expression einzelner Mitglieder des Todesrezeptorsignalweges und deren Mediatoren ist in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich. In T-Zellen (FLIP) und Gliomzellen (XIAP, Bcl-2, Bcl-xl, FLIP) wurde keine Abnahme der Proteinexpression bestimmter Apoptoseinhibitoren beobachtet (Glaser, Wagenknecht et al. 2001; Youn, Kim et al. 2001). Im Gegensatz dazu kommt es bei Fibroblasten (FLIP) zu einer Abnahme bei Kostimulation mit CHX (Santiago, Galindo et al. 2004). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Suppression von Apoptoseinhibitoren auf der Todesrezeptorebene stattfinden muss (Tang, Lahti et al. 1999). Später stellte sich dann heraus, dass CHX in syntheseinibitorischer Konzentration über die Suppression von FLIP zur Apoptoseinduktion beiträgt (Wajant, Haas et al. 2000). Die hieraus resultierenden Effekte sind auch *in vivo* pro-apoptotisch und Voraussetzung für die anti-CD95 Antikörper vermittelte Apoptose in primären Maus- und Rattenhepatozyten.

Bei B-lymphatischen Leukämiezellen wurde durch CHX eine Abnahme der XIAP Konzentration beobachtet (Kang, Kisenge et al. 2003). Deshalb sollte in dieser Arbeit in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob auch in HepG2-Zellen durch CHX die Expression verschiedener Apoptoseinhibitoren abnimmt.

Hier zeigte sich, dass durch CHX die Bcl-2 Expression nach 8 h fast vollständig verschwindet, während die XIAP-Expression allenfalls leicht reduziert ist. Anti-CD95 Antikörper hingegen hatte keinen Einfluss auf die Bcl-2-Expression. Im Gegensatz hierzu ist die XIAP-Expression nach 8 h anti-CD95 deutlich reduziert und nach 24 h fast vollständig verschwunden. Die Kombination von anti-CD95 mit CHX induzierte eine Abnahme der Expression von Bcl-2 und XIAP. Zusätzlich ist die XIAP-Abnahme beschleunigt (nach 8 h fast komplett vs. 24 h mit anti-CD95 alleine).

Somit ist bei HepG2-Zellen eine verminderte Expression einzelner Apoptoseinhibitoren (Bcl-2) neben der Stimulation des Todesrezeptors durch

anti-CD95 Antikörper lediglich mit einer Apoptoserate von 30% verbunden, während die Kostimulation mit konsekutiver Abnahme mehrerer Apoptosinhibitoren (Bcl-2 und XIAP durch Kombination von CHX und anti-CD95) zu einer Apoptoserate von 90% der Zellen führt.

Mit XIAP und Bcl-2 wurden in dieser Arbeit zwei Inhibitoren bei HepG2-Zellen identifiziert. In zukünftigen Experimenten sollte die Expression weiterer Apoptosinhibitoren untersucht werden, um deren Zusammenspiel besser zu verstehen. Außerdem bleibt zum jetzigen Zeitpunkt offen, ob weitere, noch nicht untersuchte Moleküle oder Signalwege, durch CHX oder anti-CD95 zusätzlich ausgeschaltet werden.

Außerdem sollten weitere Untersuchungen zeigen, ob Interferon-alpha und Ribavirin ebenfalls durch Reduzierung anti-apoptotischer Moleküle im Zusammenspiel mit anti-CD95 Antikörper zum Durchbrechen der Apoptoseresistenz führen.

4.3 Einfluss von Cycloheximid auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

Verschiedene Aktivatoren des Todesrezeptorkomplexes wie TNF und TRAIL aktivieren NF- κ B in einigen Zelllinien, die gegenüber diesen Substanzen eine Apoptoseresistenz zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass die anti-apoptotische Wirkung dabei an die Expression von FLIP gekoppelt ist. NF- κ B spielt hierbei eine Rolle, da diese Zellen sowohl durch CHX als auch durch Überexpression einer inaktiven I κ B Kinase wieder sensitiv gegenüber diesen Substanzen werden (Kreuz, Siegmund et al. 2001). Die pro-apoptotische Wirkung von CHX ist somit durch Suppression von FLIP ein Promoter der Apoptose.

Im Unterschied dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die alleinige Stimulation mit anti-CD95 Antikörper bei HepG2-Zellen nicht zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Es konnte aber gezeigt werden, dass NF- κ B durch CHX aktiviert wird. In Kombination mit anti-CD95 kommt es zu einem noch stärkeren Effekt. Gleichzeitig wurde auch eine Zunahme der

Caspaseaktivität gemessen. Eine Aktivierung von NF- κ B über den Todesrezeptorweg wird dadurch nicht bewiesen, scheint aber möglich. So könnte es sich bei dem CHX sensitiven Induktor von NF- κ B tatsächlich um FLIP handeln, wie andere Arbeitsgruppen in Jurkat Zellen bereits zeigen konnten (Kreuz, Siegmund et al. 2001; Kreuz, Siegmund et al. 2004).

Die Hemmung der Caspasen mit dem pan-Caspaseninhibitor zVAD führt nicht zu einer Schwächung der NF- κ B Aktivierung. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen, nach denen Caspase-8 als Initiator einer noch unbekanntem Signalkette zur Aktivierung von NF- κ B führt (Jun, Chung et al. 2005), nicht jedoch zu den Ergebnissen, bei denen Caspase-8 lediglich in enzymatisch nicht aktiver Form vorhanden sein muss.

Die Bedeutung dieser Aktivierung bleibt unklar und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Interferon-alpha alpha und Ribavirin werden seit vielen Jahren erfolgreich zur Therapie der chronischen Hepatitis eingesetzt. Die genauen molekularen Mechanismen ihrer Wirkung sind aber weiterhin unbekannt.

Zur Untersuchung der zellulären Vorgänge wurde deshalb als Modell die Hepatomzelllinie HepG2 herangezogen. Sie gilt als geeignetes *in vitro* System zur Untersuchung medikamentöser Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass durch die antiviralen Substanzen Caspasen aktiviert werden. Durch sie kommt es im Zusammenspiel mit einem Kostimulus (anti-CD95) zur Apoptose. Sie wird verstärkt durch die Kombination von Interferon-alpha und Ribavirin. Durch den Nachweis aktiver Caspase-8 und -3 ist anzunehmen, dass die Aktivierung über den klassischen Todesrezeptorweg erfolgt.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Apoptoseresistenz in HepG2 nicht durch die Verstärkung von Überlebenssignalen über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt wird. Dagegen kommt es durch Vorstimulation mit der Kombination beider Substanzen zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Welche funktionelle Bedeutung dies für die primären Apoptoseresistenz gegenüber den antiviralen Substanzen hat, bleibt derzeit aber noch unklar.

In den Experimenten zur Überwindung der Apoptoseresistenz konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung von Cycloheximid und anti-CD95 Antikörper zur Apoptose über den klassischen Rezeptormechanismus mit Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspase-3 führt. Einer der Gründe für die Apoptoseresistenz ist die verstärkte Expression von Apoptoseinhibitoren. In HepG2-Zellen korrelierte eine Abnahme von XIAP und Bcl-2 mit einer Zunahme der Apoptoserate durch Kombination eines klassischen Apoptosestimulus (anti-CD95 Antikörper) mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid.

Für Ribavirin ist unter Kulturbedingungen von Rattenhepatozyten ebenfalls eine Abnahme der Proteinsynthese beobachtet worden (Ilyin, Langouet et al. 1998). In zukünftigen Experimenten sollte deshalb untersucht werden, ob es bei einer zellulären Abwehrreaktion durch zytotoxische T-Lymphozyten mit verstärkter Expression des CD95-Liganden durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Interferon-alpha und Ribavirin zur Abnahme von Apoptoseinhibitoren auf zellulärer Ebene kommt.

Es ist bekannt, dass eine frühe zelluläre Abwehrreaktion in der Akutphase der Erkrankung zur Eliminierung infizierter Zellen führt. In der chronischen Phase der Entzündung und nach maligner Transformation hingegen haben die (infizierten) Zellen eine verbesserte Überlebenschance durch die Entwicklung einer Apoptoseresistenz. Aus dem Synergismus einer zellulären Abwehrreaktion und der Therapie mit den antiviralen Substanzen entsteht möglicherweise ein selektiver Angriff auf die befallenen oder entarteten Hepatozyten, da die medikamentöse Wirkung nicht ubiquitär, sondern nur im Zusammenspiel mit dem lokalen Angebot von Apoptoseinduktoren entfaltet wird. Dies wäre eine Erklärung für klinische Ergebnisse, die belegen, dass bei einer erfolgreichen medikamentösen Behandlung der zelluläre Schaden in der Leber gleichzeitig vergleichsweise gering ist.

Die Übertragung der Ergebnisse dieser Arbeit auf das humane System ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da in komplexen Organismen viele verschiedene Einflüsse und Faktoren konkurrieren. Somit handelt es sich beim Zellkulturmodell zwangsläufig um eine starke Reduktion der Abläufe. Deshalb sollten zunächst weitere Untersuchungen folgen, bei denen verschiedene virale Proteine von Hepatomzellen exprimiert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. M. and S. Cory (2001). "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family." **Trends Biochem Sci** 26(1): 61-6.
- Aggarwal, B. B. and R. Pandita (1994). "Both type I and type II interferons down-regulate human tumor necrosis factor receptors in human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Role of protein kinase C." **FEBS Lett** 337(1): 99-102.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." **Cell** 87(2): 171.
- Arends, M. J. and A. H. Wyllie (1991). "Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology." **Intern. Rev. Exp. Pathol.** 32: 223-254.
- Balachandran, S., P. C. Roberts, et al. (2000). "Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway." **J Virol** 74(3): 1513-23.
- Bantel, H., I. H. Engels, et al. (1999). "Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis." **Cancer Res** 59(9): 2083-90.
- Bantel, H., A. Luger, et al. (2004). "Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury." **Hepatology** 40(5): 1078-87.
- Basu, L., C. H. Yang, et al. (1998). "The antiviral action of interferon is potentiated by removal of the conserved IRTAM domain of the IFNAR1 chain of the interferon alpha/beta receptor: effects on JAK-STAT activation and receptor down-regulation." **Virology** 242(1): 14-21.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." **Science** 274(5288): 782-4.
- Beg, A. A., W. C. Sha, et al. (1995). "Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B." **Nature** 376(6536): 167-70.
- Belka, C., J. Rudner, et al. (2000). "Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis." **Oncogene** 19(9): 1181-90.
- Bertin, J., R. C. Armstrong, et al. (1997). "Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(4): 1172-6.
- Blom, W. M., H. J. de Bont, et al. (1999). "Prevention of cycloheximide-induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors." **Biochem Pharmacol** 58(12): 1891-8.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." **Anal Biochem** 72: 248-54.
- Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 15: 269-90.
- Bunz, F. (2001). "Cell death and cancer therapy." **Curr Opin Pharmacol** 1(4): 337-41.
- Calabrese, F., P. Pontisso, et al. (2000). "Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels." **Hepatology** 31(5): 1153-9.
- Cerny, A. and F. V. Chisari (1999). "Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence." **Hepatology** 30(3): 595-601.
- Chiao, P. J., R. Na, et al. (2002). "Role of Rel/NF-kappaB transcription factors in apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells." **Cancer** 95(8): 1696-705.
- Chung, Y. L., M. L. Sheu, et al. (2003). "Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma." **Int J Cancer** 107(1): 65-73.
- Clarke, P., S. M. Meintzer, et al. (2003). "Two distinct phases of virus-induced nuclear factor kappa B regulation enhance tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in virus-infected cells." **J Biol Chem** 278(20): 18092-100.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." **Oncogene** 22(53): 8590-607.
- Davila, J. A., R. O. Morgan, et al. (2004). "Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study." **Gastroenterology** 127(5): 1372-80.
- Davis, G. L., R. Esteban-Mur, et al. (1998). "Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group." **N Engl J Med** 339(21): 1493-9.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." **Genes Dev** 13(3): 239-52.
- Dhillon, A. P. and G. M. Dusheiko (1995). "Pathology of hepatitis C virus infection." **Histopathology** 26(4): 297-309.
- Diao, J., A. A. Khine, et al. (2001). "X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway." **J Biol Chem** 276(11): 8328-40.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." **Nat Med** 8(8): 793-800.

- Erdtmann, L., N. Franck, et al. (2003). "The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis." **J Biol Chem** 278(20): 18256-64.
- Farber, E. (1994). "Programmed cell death: necrosis versus apoptosis." **Mod Pathol** 7(5): 605-9.
- Farinati, F., R. Cardin, et al. (2004). "Up and down regulation of apoptosis in hepatitis C virus-related liver damage." **J Hepatol** 41(5): 883-5; author reply 885-6.
- Fattovich, G., T. Stroffolini, et al. (2004). "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors." **Gastroenterology** 127(5 Suppl 1): S35-50.
- Ferrari, D., A. Stepczynska, et al. (1998). "Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis." **J Exp Med** 188(5): 979-84.
- Gale, M., Jr. and M. G. Katze (1998). "Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase." **Pharmacol Ther** 78(1): 29-46.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." **Virology** 230(2): 217-27.
- Galle, P. R., W. J. Hofmann, et al. (1995). "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage." **J Exp Med** 182(5): 1223-30.
- Glaser, T., B. Wagenknecht, et al. (2001). "Identification of p21 as a target of cycloheximide-mediated facilitation of CD95-mediated apoptosis in human malignant glioma cells." **Oncogene** 20(35): 4757-67.
- Glue, P. (1999). "The clinical pharmacology of ribavirin." **Semin Liver Dis** 19 Suppl 1: 17-24.
- Goltsev, Y. V., A. V. Kovalenko, et al. (1997). "CASH, a novel caspase homologue with death effector domains." **J Biol Chem** 272(32): 19641-4.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." **Science** 281(5381): 1309-12.
- Gross, A., X. M. Yin, et al. (1999). "Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death." **J Biol Chem** 274(2): 1156-63.
- Hahn, C. S., Y. G. Cho, et al. (2000). "The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line." **Virology** 276(1): 127-37.
- Hahne, M., D. Rimoldi, et al. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." **Science** 274(5291): 1363-6.
- Han, D. K., P. M. Chaudhary, et al. (1997). "MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(21): 11333-8.

- Heintges, T., L. Mohr, et al. (1994). "[Epidemiology and clinical features of chronic viral hepatitis]." **Dtsch Med Wochenschr** 119(40): 1365-70.
- Higami, Y., K. Tanaka, et al. (2000). "Intravenous injection of cycloheximide induces apoptosis and up-regulates p53 and Fas receptor expression in the rat liver in vivo." **Mutat Res** 457(1-2): 105-11.
- Hill, D. B., J. Schmidt, et al. (1995). "In vitro tumor necrosis factor cytotoxicity in Hep G2 liver cells." **Hepatology** 21(4): 1114-9.
- Honda, A., M. Hatano, et al. (2000). "HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis induced by an injection of anti-Fas antibody in mice." **J Hepatol** 33(3): 440-7.
- Hu, S., C. Vincenz, et al. (1997). "I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis." **J Biol Chem** 272(28): 17255-7.
- Ilyin, G. P., S. Langouet, et al. (1998). "Ribavirin inhibits protein synthesis and cell proliferation induced by mitogenic factors in primary human and rat hepatocytes." **Hepatology** 27(6): 1687-94.
- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1997). "CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(20): 10717-22.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." **Nature** 388(6638): 190-5.
- Jun, J. I., C. W. Chung, et al. (2005). "Role of FLASH in caspase-8-mediated activation of NF-kappaB: dominant-negative function of FLASH mutant in NF-kappaB signaling pathway." **Oncogene** 24(4): 688-96.
- Kanduc, D., A. Mittelman, et al. (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)." **Int J Oncol** 21(1): 165-70.
- Kang, J., R. R. Kisenge, et al. (2003). "Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines." **Br J Haematol** 123(5): 921-32.
- Khakoo, S., P. Glue, et al. (1998). "Ribavirin and interferon alfa-2b in chronic hepatitis C: assessment of possible pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions." **Br J Clin Pharmacol** 46(6): 563-70.
- Kim, Y. S., R. F. Schwabe, et al. (2002). "TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells." **Hepatology** 36(6): 1498-508.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2004). "NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP." **J Cell Biol** 166(3): 369-80.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." **Mol Cell Biol** 21(12): 3964-73.

- Kuhnel, F., L. Zender, et al. (2000). "NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis." **J Biol Chem** 275(9): 6421-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature** 227(259): 680-5.
- Lan, K. H., M. L. Sheu, et al. (2002). "HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis." **Oncogene** 21(31): 4801-11.
- Lee, C. K., H. A. Bluysen, et al. (1997). "Regulation of interferon-alpha responsiveness by the duration of Janus kinase activity." **J Biol Chem** 272(35): 21872-7.
- Legrand, A., N. Vadrot, et al. (2004). "Study of the effects of interferon a on several human hepatoma cell lines: analysis of the signalling pathway of the cytokine and of its effects on apoptosis and cell proliferation." **Liver Int** 24(2): 149-60.
- Lemaire, C., K. Andreau, et al. (1999). "Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/caspase-3." **Biochem Pharmacol** 58(1): 85-93.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." **Cell** 94(4): 491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." **Cell** 91(4): 479-89.
- Liu, H., C. R. Lo, et al. (2002). "NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun." **Hepatology** 35(4): 772-8.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." **Cell** 86(1): 147-57.
- Los, M., S. Wesselborg, et al. (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." **Immunity** 10(6): 629-39.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." **Cell** 94(4): 481-90.
- Marin-Serrano, E., C. Rodriguez-Ramos, et al. (2006). "Modulation of the anti-inflammatory interleukin 10 and of proapoptotic IL-18 in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha and ribavirin." **J Viral Hepat** 13(4): 230-4.
- Martin, D. A., R. M. Siegel, et al. (1998). "Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal." **J Biol Chem** 273(8): 4345-9.

- Marusawa, H., M. Hijikata, et al. (1999). "Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation." **J Virol** 73(6): 4713-20.
- McHutchison, J. G., S. C. Gordon, et al. (1998). "Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group." **N Engl J Med** 339(21): 1485-92.
- Miyasaka, Y., N. Enomoto, et al. (2003). "Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in Huh7 cells." **J Infect Dis** 188(10): 1537-44.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1993). "Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line." **Blood** 81: 151-7.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." **J Biol Chem** 273(5): 2926-30.
- Nasir, A., H. S. Arora, et al. (2000). "Apoptosis and pathogenesis of viral hepatitis C--an update." **In Vivo** 14(1): 297-300.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." **J Immunol Methods** 139(2): 271-9.
- Niederrau, C. and C. Kapagiannidis (2006). "[Epidemiology of hepatitis C in Germany.]" **Med Klin (Munich)** 101(6): 448-57.
- Niederrau, C., S. Lange, et al. (1998). "Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study." **Hepatology** 28(6): 1687-95.
- Ning, Q., D. Brown, et al. (1998). "Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response." **J Immunol** 160(7): 3487-93.
- Otsuka, M., N. Kato, et al. (2002). "Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression." **Virology** 296(1): 84-93.
- Palitzsch, K. D., B. Hottentrager, et al. (1999). "Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population." **Eur J Gastroenterol Hepatol** 11(11): 1215-20.
- Pallardy, M., A. Biola, et al. (1999). "Assessment of apoptosis in xenobiotic-induced immunotoxicity." **Methods** 19(1): 36-47.
- Pan, J., L. X. Duan, et al. (2001). "Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B." **J Gen Virol** 82(Pt 1): 171-82.
- Patel, K., A. J. Muir, et al. (2006). "Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection." **Bmj** 332(7548): 1013-7.
- Patterson, J. L. and R. Fernandez-Larsson (1990). "Molecular mechanisms of action of ribavirin." **Rev Infect Dis** 12(6): 1139-46.

- Pinti, M., L. Troiano, et al. (2003). "Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient?" **J Biol Regul Homeost Agents** 17(2): 166-71.
- Poynard, T., P. Marcellin, et al. (1998). "Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT)." **Lancet** 352(9138): 1426-32.
- Prikhod'ko, E. A., G. G. Prikhod'ko, et al. (2004). "The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities." **Virology** 329(1): 53-67.
- Rathmell, J. C. and C. B. Thompson (1999). "The central effectors of cell death in the immune system." **Annu Rev Immunol** 17: 781-828.
- Ray, R. B., K. Meyer, et al. (1998). "Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein." **J Biol Chem** 273(4): 2256-9.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." **Nat Rev Drug Discov** 1(2): 111-21.
- Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier, et al. (1998). "Bcl-2 family proteins and mitochondria." **Biochim. Biophys. Acta** 1366: 127-37.
- Rehermann, B., K. M. Chang, et al. (1996). "Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients." **J Virol** 70(10): 7092-102.
- Rehermann, B., D. Lau, et al. (1996). "Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection." **J Clin Invest** 97(7): 1655-65.
- Saito, H., H. Ebinuma, et al. (1998). "Loss of butyrate-induced apoptosis in human hepatoma cell lines HCC-M and HCC-T having substantial Bcl-2 expression." **Hepatology** 27(5): 1233-40.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, et al. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." **J. Biol. Chem.** 274: 17941-5.
- Sanchez, A., A. M. Alvarez, et al. (1997). "Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture." **Hepatology** 26(4): 935-43.
- Santiago, B., M. Galindo, et al. (2004). "Intracellular regulation of Fas-induced apoptosis in human fibroblasts by extracellular factors and cycloheximide." **J Immunol** 172(1): 560-6.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." **J Biol Chem** 274(3): 1541-8.

- Shigeno, M., K. Nakao, et al. (2003). "Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappa B inactivation." **Oncogene** 22(11): 1653-62.
- Shrivastava, A., S. K. Manna, et al. (1998). "Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors." **J Virol** 72(12): 9722-8.
- Shu, H. B., D. R. Halpin, et al. (1997). "Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis." **Immunity** 6(6): 751-63.
- Slee, E. A., C. Adrain, et al. (1999). "Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis." **Cell Death Differ** 6(11): 1067-74.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." **Mol Cell** 1(7): 949-57.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1997). "FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis." **J Biol Chem** 272(30): 18542-5.
- Strand, S., W. J. Hofmann, et al. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" **Nat Med** 2(12): 1361-6.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." **Annu. Rev. Biochem.** 69: 217-45.
- Tam, R. C., B. Pai, et al. (1999). "Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile." **J Hepatol** 30(3): 376-82.
- Tang, D., J. M. Lahti, et al. (1999). "Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism." **J Biol Chem** 274(11): 7245-52.
- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." **Nature** 386(6624): 517-21.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." **Science** 281(5381): 1312-6.
- Tsubota, A., Y. Hirose, et al. (2003). "Pharmacokinetics of ribavirin in combined interferon-alpha 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection." **Br J Clin Pharmacol** 55(4): 360-7.
- Uchida, M., A. Hamada, et al. (2004). "Assessment of adverse reactions and pharmacokinetics of ribavirin in combination with interferon alpha-2b in patients with chronic hepatitis C." **Drug Metab Pharmacokinet** 19(6): 438-43.
- Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, et al. (1996). "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB." **Science** 274(5288): 787-9.
- Wajant, H., E. Haas, et al. (2000). "Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or

- upstream of Fas-associated death domain protein (FADD)." **J Biol Chem** 275(32): 24357-66.
- Walsh, M. J., D. M. Vanags, et al. (2004). "Steatosis and liver cell apoptosis in chronic hepatitis C: a mechanism for increased liver injury." **Hepatology** 39(5): 1230-8.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." **Science** 274(5288): 784-7.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." **Genes Dev** 15(22): 2922-33.
- Wedemeyer, H., E. Jackel, et al. (2004). "Whom? When? How? Another piece of evidence for early treatment of acute hepatitis C." **Hepatology** 39(5): 1201-3.
- Wesselborg, S., I. H. Engels, et al. (1999). "Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction." **Blood** 93(9): 3053-63.
- Yang, C. H., A. Murti, et al. (1998). "STAT3 complements defects in an interferon-resistant cell line: evidence for an essential role for STAT3 in interferon signaling and biological activities." **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(10): 5568-72.
- Yang, C. H., A. Murti, et al. (2005). "IFN induces NIK/TRAF-dependent NF-kappa B activation to promote cell survival." **J Biol Chem**.
- Yang, C. H., A. Murti, et al. (2000). "IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B." **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(25): 13631-6.
- Yang, C. H., A. Murti, et al. (2005). "Interferon alpha activates NF-kappaB in JAK1-deficient cells through a TYK2-dependent pathway." **J Biol Chem** 280(27): 25849-53.
- Youn, B. S., Y. J. Kim, et al. (2001). "Blocking of c-FLIP(L)--independent cycloheximide-induced apoptosis or Fas-mediated apoptosis by the CC chemokine receptor 9/TECK interaction." **Blood** 98(4): 925-33.
- Zha, J., S. Weiler, et al. (2000). "Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis." **Science** 290(5497): 1761-5.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." **Cell** 90(3): 405-13.

DANKSAGUNG

Ich möchte zunächst den Personen danken, die mich bei der Fertigstellung der Dissertation maßgeblich unterstützt haben:

Herrn Professor Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung und die fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. med. Stephan Schlosser für die Betreuung im Labor, die Einführung in methodische Aspekte und die Motivation in allen Belangen des Lebens.

Frau Dr. rer. nat. Kirsten Lauber für ihre Geduld, positive Präsenz und ihre Hilfestellung in vielen biochemischen und experimentellen Fragestellungen und der praktischen Auswertung.

Frau Birsen Yirbas für die Mitarbeit bei Western Blots und den immuzytochemischen Färbungen.

Andreas, Carlos, Christoph, Christopher, Helga, und Ingo für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre im Labor.

Manfred Gossen, Thomas Benter und Ulrike Schmelz für Anregungen in Schrift und Komposition.

Besonderer Dank gilt auch den Menschen, deren Verdienst sich nicht in Form von Abbildungen und Tabellen ausdrücken lässt.

Hier an allererster Stelle Alexander Paliege für Glaube und Beharrlichkeit und Andreas Rothbart für den Beginn einer unschätzbaren Freundschaft.

Außerdem danke ich nicht zuletzt meiner Mutter für die Geduld, die sie mit mir hat.

LEBENS LAUF

Markus Schuler

		geb. am 09.06.1971 in Hechingen als Sohn von Gabriele Schuler geb. Daiker und Klaus Schuler
Schulbildung	1977-1980	Grundschule Hechingen
	1980-1991	Gymnasium Hechingen Allgemeine Hochschulreife
	1988-1989	San Lorenzo Valley High School (Kalifornien) Honorary Diploma
Zivildienst	1991-1992	Mitarbeit in einem Wohnheim für straffällige Jugendliche
Studium		Universität Stuttgart Eberhard-Karls-Universität Tübingen Humboldt-Universität zu Berlin
	1992-1994	Physik
	1994-2001	Humanmedizin
	03/1996	Ärztliche Vorprüfung
	08/1997	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
	10/2000	2. Teil der Ärztlichen Prüfung
	01/11/2001	3. Teil der Ärztlichen Prüfung
	Forschung	1999-2000
2000-2001		Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Arbeitsgruppe Dr. M. Gossen „Kontrolle der DNA-Replikation“
Berufstätigkeit	seit 01/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie Robert-Rössle-Klinik im Helios Klinikum Berlin Charité Campus Berlin