

Anna Christine Zimmermann

Dr. med.

Der Einfluss des TRAIL/TRAIL-Rezeptorsystems auf Verlauf und Therapieansprechen der chronischen Hepatitis C Infektion in vivo und in vitro

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Tom M. Ganten

Bei der chronischen Hepatitis-C-Virus-Infektion spielt die Apoptose eine wichtige Rolle in der Elimination von infizierten Zellen und scheint einen wichtigen Einfluss auf das Ansprechen auf die antivirale Therapie aus Interferon α und Ribavirin zu haben. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle des TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) und seiner Rezeptoren für die Apoptoseinduktion in HCV-infiziertem Lebergewebe zu untersuchen. Hierzu wurden Leberstanzbiopsien von 116 HCV-infizierten Patienten aus der Lebersprechstunde der Universitätsklinik Heidelberg immunhistochemisch angefärbt und die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1-4, TRAIL, CD95, Caspase 8 und c-Flip als Proteine der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch ein Scoring-System ausgewertet. Die Expression der untersuchten Proteine wurde jeweils mit den klinischen Parametern Genotyp, Ansprechen auf die antivirale Therapie, Steatosegrad des Lebergewebes, Fibrosegrad sowie Zirrhose korreliert.

Zur genaueren Untersuchung der Interaktion von Hepatitis-C-Virus und Wirtszelle wurde weiterhin ein Zellkulturmodell mit der Hepatomazelllinie Huh7 verwendet. Dabei wurden Zelllinien benutzt, die mit subgenomischen HCV-Replikons, die für die HCV-Proteine C-NS2 bzw. NS3- NS5B kodieren, transfiziert wurden. Es wurden die transfizierten Zelllinien Huh7.5 C-NS2, Huh7 Lunet C-NS2, LucUbiNeoET (NS3A- NS5B) und Neo 5A (NS3A- NS5B) mit ihren jeweiligen naiven Kontrollzellen zunächst auf ihr Ansprechen auf TRAIL-Exposition mittels MTT-Vitalitätsassay getestet. Für dieselben Zelllinien wurde außerdem die Expression von TRAIL, den TRAIL-Rezeptoren 1-4 und CD95 durchflusszytometrisch sowie die Expression von Caspase 8 und cFlip mittels Western Blot bestimmt.

Immunhistochemisch konnten wir nachweisen, dass TRAIL-R2 eine vermehrte Expression in chronisch HCV-infiziertem Gewebe aufweist und positiv mit dem Erreichen einer SVR und dem Vorliegen einer HCV-Genotyp 2 Infektion korreliert. Gleichzeitig nimmt die Expression von TRAIL-R2 bei steigendem Steatose- und Fibrosegrad der Leber ab. TRAIL-R3 als Decoy-Rezeptor wird in HCV-infiziertem Lebergewebe herunterreguliert, während TRAIL-R4 eine gleichsinnige Hochregulation mit TRAIL-R2 zeigt. TRAIL, cFlip und Caspase 8 zeigten ein ähnliches Expressionsmuster wie TRAIL-R2. Insgesamt liefern diese Ergebnisse starke Hinweise darauf, dass die TRAIL-vermittelte Apoptose eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der chronischen HCV-Infektion spielt und dass TRAIL-R2 als prognostischer

Marker bei chronisch HCV-infizierten Patienten dienen könnte. Möglicherweise bietet die hohe Expression von TRAIL-R2 in HCV-infizierten Leberzellen auch einen therapeutischen Ansatz für den Einsatz von TRAIL-R2-spezifischen monoklonalen Antikörpern.

Um den Einfluss des Hepatitis C Virus auf die Apoptose weiter zu spezifizieren, wurde die Sensitivität von Replikon-transfizierten Hepatomazelllinien auf TRAIL untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass diese Zelllinien nicht primär für TRAIL sensibel waren, sich jedoch durch die Zugabe von Bortezomib sensitivieren ließen. Eine besonders gute Sensitivierbarkeit zeigte die Zelllinie Neo-5A, die den Genomabschnitt NS3- NS5B enthält. Allerdings wurden zwischen transfizierter Zelllinie und Kontrolle keine signifikanten Unterschiede deutlich, so dass die Sensitivierbarkeit für die TRAIL-vermittelte Apoptose auf einem wirtszelleigenen Mechanismus zu beruhen scheint.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung der transfizierten Zellen zeigte sich eine Hochregulation von TRAIL-R1 und -2, allerdings konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen Replikon-enthaltenden Zellen und deren jeweiliger Kontrolle festgestellt werden. Im Western Blot sahen wir eine verminderte Expression von cFlip in den Zelllinien Huh7 Lunet Core-NS2, Neo 5-A NS3-NS5 und Luc Ubi Neo ET NS3-NS5 gegenüber ihren nicht transfizierten Kontrollzelllinien. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunhistochemie, wo eine sehr deutliche Hochregulation von cFlip in HCV-infiziertem Gewebe gezeigt wurde.

In der Literatur sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte für jedes einzelne HCV-Protein beschrieben. Es scheint also denkbar, dass auch in subgenomischen Replikons schon eine komplexe Interaktion zwischen den HCV-Proteinen untereinander und mit der Wirtszelle stattfindet und es wäre daher sinnvoll, in Zukunft das ganze HCV-Polyprotein und dessen Einfluss auf die Apoptose-Regulation zu untersuchen.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass TRAIL-R2 prätherapeutisch einen prognostisch günstigen Marker darstellt. Dies sollte in prospektiven Studien weiter evaluiert werden.