

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Ernährung und Immunologie

## Mechanismen der Insulin Resistenz in chronischer HCV-Infektion

Julia Marina Graf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 01.08.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.04.2014 angenommen.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. HEPATITIS C</b>	<b>1</b>
1.1.1. DAS HEPATITIS C VIRUS: AUFBAU, KLASSIFIZIERUNG UND REPLIKATION	1
1.1.2. EPIDEMIOLOGIE, VERLAUF DER HCV INFEKTION UND MÖGLICHKEITEN DER THERAPIE	7
1.1.3. MODELSYSTEME DER HCV INFEKTION	10
<b>1.2. DIE LEBER ALS ZENTRALES STOFFWECHSELORGAN</b>	<b>13</b>
<b>1.3. INSULIN RESISTENZ IN CHRONISCHER HCV INFEKTION</b>	<b>20</b>
<b>1.4. ZELLDIFFERENZIERUNG VS. PROLIFERATION IN DER LEBER</b>	<b>24</b>
1.4.1. DIE DIFFERENZIERTERTE LEBERZELLE	24
1.4.2. ZELLPROLIFERATION IN DER LEBER	26
1.4.3. WACHSTUMSFAKTOREN IN DER GESUNDEN UND KRANKEN LEBER	27
1.4.4. ZELLULÄRE DIFFERENZIERUNGSSTATUS UND VIRALE INFEKTIONEN	32
<b>1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>35</b>
<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>2.1. ETABLIERUNG EINES MODELLS ZUR UNTERSUCHUNG VON VERÄNDERUNG IM STOFFWECHSEL VON HEPATOZYTEN</b>	<b>36</b>
<b>2.2. INFEKTION UND VIRUSREPLIKATION IN DIFFERENZIERTEN HUH7.5 ZELLEN</b>	<b>42</b>
<b>2.3. INSULIN-SENSITIVITÄT VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION</b>	<b>46</b>
<b>2.4. DIFFERENZIERUNGSSTATUS VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION</b>	<b>50</b>
<b>2.5. UNTERSUCHUNG DER PRODUKTION VON WACHSTUMSFAKTOREN VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION</b>	<b>56</b>
<b>2.6. BESTIMMUNG DER KERNZAHL HCV-INFIZIERTER HEPATOZYTEN</b>	<b>60</b>
<b>2.7. GLUCOSEAUFNAHMEFÄHIGKEIT VON HEPATOZYTEN NACH HCV INFEKTION</b>	<b>63</b>
<b>2.8. ÜBERPRÜFUNG DER BEOBACHTUNGEN IN OPTIMIERTEM VERSUCHSAUFBAU</b>	<b>65</b>
<b>3. DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>3.1. HUH7.5DIFF ZELLEN STELLEN EIN NEUES MODELL ZUR UNTERSUCHUNG METABOLISCHER VERÄNDERUNGEN IN CHRONISCHER HCV-INFEKTION DAR</b>	<b>70</b>
<b>3.2. HCV-INFEKTION FÜHRT ZU VERÄNDERUNGEN DES HEPATOZELLULÄREN INSULINSIGNALWEGS, JEDOCH NICHT ZU INSULIN RESISTENZ</b>	<b>73</b>
<b>3.3. HCV INDUZIERT ÜBER WACHSTUMSFAKTOREN DIE DEDIFFERENZIERUNG UND DEN S-PHASE-ARREST VON HEPATOZYTEN</b>	<b>78</b>
<b>3.4. DIE DEDIFFERENZIERUNG VON HCV-INFIZIERTEN HEPATOZYTEN IST MIT REDUZIERTER ZELLULÄRE GLUCOSE-AUFNAHMEFÄHIGKEIT ASSOZIIERT</b>	<b>85</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>92</b>
<b>4.1. MATERIAL</b>	<b>92</b>
4.1.1. ANTIKÖRPER	92
4.1.2. ZELLKULTURMEDIEN	93
4.1.3. PRIMER	94
4.1.4. VERBRAUCHSMATERIEN UND CHEMIKALIEN	94

4.1.4.1.	MEDIEN UND ZUSÄTZE	94
4.1.4.2.	CHEMIKALIEN	95
4.1.4.3.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	97
4.1.4.4.	ENZYME	97
4.1.4.5.	KITS	97
4.1.5.	GERÄTE	98
4.1.6.	SOFTWARE	99
<b>4.2.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>100</b>
4.2.1.	MOLEKULARBIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN	100
4.2.1.1.	WESTERNBLOT ANALYSE	100
4.2.1.2.	RNA EXTRAKTION UND CDNA SYNTHESE	101
4.2.1.3.	PRIMER-DESIGN	102
4.2.1.4.	QUANTITATIVE LIGHT CYCLER® PCR MITTELS SYBR GREEN	102
4.2.1.5.	„ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY“ (ELISA)	103
4.2.1.6.	FLUORESCENZMARKIERUNG VON ANTIKÖRPERN	103
4.2.1.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	104
4.2.1.1.	ALLGEMEINE KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON HUH7.5 ZELLEN	104
4.2.1.2.	INSULINSTIMULATION VON HUH7.5, HUH7.5DIFF UND PHHS	104
4.2.1.3.	VIABILITÄTSTEST	104
4.2.1.4.	CASPASE AKTIVITÄTS TEST	105
4.2.1.5.	BESTIMMUNG DER GLUCOSEAUFNAHMEFÄHIGKEIT VON ZELLEN	105
4.2.1.6.	S-PHASE-BESTIMMUNG MITTELS BRDU	105
4.2.2.	VIROLOGISCHE METHODEN	107
4.2.2.1.	EXTRAKTION VON VIRALER RNA AUS DEM ZELLKULTUR-ÜBERSTAND	107
4.2.2.2.	HCV-SPEZIFISCHE QUANTITATIVE LIGHT CYCLER® PCR	107
4.2.2.3.	BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS	108
4.2.2.4.	PRODUKTION VON JC1-VIRUSSTOCKS IN HUH7.5 ZELLEN	109
4.2.2.4.1.	TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> BAKTERIEN MIT HCV-PLASMIDEN	109
4.2.2.4.2.	PLASMIDAUFREINIGUNG AUS <i>E. COLI</i> KULTUREN	109
4.2.2.4.3.	<i>IN VITRO</i> -RNA SYNTHESE	110
4.2.2.4.4.	RNA-AUFREINIGUNG	110
4.2.2.4.5.	ÜBERPRÜFUNG DER RNA MENGE UND QUALITÄT	111
4.2.2.4.6.	ELEKTROPORATION VON HUH7.5 ZELLEN MIT HCV RNA	111
4.2.2.4.7.	VIRUSPRÄZIPITATION AUS DEM ZELLKULTURÜBERSTAND	112
4.2.3.	MIKROSKOPIE	113
4.2.3.1.	IMMUNFLUORESCENZ MIKROSKOPIE	113
4.2.4.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	113
<b>5.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>117</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>119</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>139</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>141</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Chronisch HCV-infizierte Patienten haben ein mehr als 60% erhöhtes Risiko einen Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) zu entwickeln. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist entscheidend, da die betroffenen Patienten ein verschlechtertes Ansprechen auf  $\text{INF}\alpha$  Therapie, beschleunigte Fibrose und höhere Inzidenzraten für hepatozelluläres Karzinom zeigen. Die Erforschung der durch HCV verursachten Veränderungen, wie z.B. der Insulinresistenz (IR), im infizierten Menschen ist stark durch die verfügbaren Modelle limitiert. Häufig wird mit proliferierenden Hepatomazellen und kurzen Infektionsdauern gearbeitet, die den hepatozellulären Stoffwechsel sowie den Aspekt der Chronizität in der menschlichen Leber nur ungenügend widerspiegeln.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Differenzierungsprotokoll entwickelt, das eine persistente Infektion mit HCV erlaubt und den typischen Stoffwechsel von Hepatozyten zeigt. Hepatozyten sind in der Lage *de novo* Glucose zu synthetisieren. Diese sogenannte Gluconeogenese wird durch Insulin reguliert. Die Bindung von Insulin an den Insulin Rezeptor (InsR) führt über den PI3K-Akt-Signalweg zur Inaktivierung des für die Expression der Gluconeogenese-Schlüsselenzyme (PEPCK, G-6-Pase) verantwortlichen Transkriptionsfaktors Foxo1. Inaktives Foxo1 verlässt den Nukleus, woraufhin die Gluconeogenese stoppt. Bislang wurde allgemein angenommen, dass die Ursache der Entstehung von T2DM bei chronischer Hepatitis C (CHC) eine zelluläre IR in HCV-infizierten Hepatozyten ist. Hepatische IR wird als fehlende Hemmung der Gluconeogenese durch Insulin definiert. Daher wäre, bei HCV-induzierter IR eine vermehrte Lokalisation von Foxo1 im Nukleus sowie eine erhöhte PEPCK- und G-6-Pase-Expression in Anwesenheit von Insulin zu erwarten. In der hier präsentierten Arbeit wurde zwar eine verminderte InsR Expression und Insulin-induzierte Akt-Aktivierung beobachtet, überraschenderweise korrelierte dies jedoch nicht mit vermehrter Gluconeogenese. Vielmehr zeigte sich, dass nukleäres Foxo1 und die Expression von PEPCK und G-6-Pase ebenfalls reduziert waren. Die beobachteten Veränderungen entsprachen daher keiner IR. Weitere Experimente bestätigten die Vermutung, dass die Veränderungen im Insulinsignalweg Folgen einer Dedifferenzierung waren. Untersuchungen der Differenzierungsmarker OATPC und BSEP, des Proliferationsmarkers Ki67 sowie Zellzyklusanalysen zeigten, dass HCV zu einer Hepatozyten-Dedifferenzierung, einem Wiedereintritt zuvor differenzierter Zellen in den Zellzyklus und zu einem S-Phase-Arrest führte. Letztere

stellt vermutlich durch hohe Nukleotidverfügbarkeit eine für die Replikation der viralen RNA günstige Umgebung dar. Die Induktion der S-Phase ist zum Teil auf erhöhte EGF-Sekretion HCV-infizierter Zellen zurückzuführen, und betraf daher nicht nur HCV-positive, sondern auch HCV-negative Nachbarzellen.

Im Zuge der Dedifferenzierung wurde unter anderem eine Reduktion der Proteinexpression des leberspezifischen Glucosetransporters GLUT2 beobachtet, die zu einer reduzierten Glucoseaufnahmefähigkeit der HCV-infizierten Proben führte. Bezogen auf die bei CHC-Patienten beschriebene T2DM lässt sich anhand dieser Ergebnisse folgende Hypothese aufstellen: Aufgrund einer verminderten hepatozellulären GLUT2-Expression im Zusammenhang der HCV-induzierten Dedifferenzierung kommt es bei HCV-infizierten Patienten zu einer reduzierten Glucoseaufnahmekapazität der Leber. Die hieraus resultierenden erhöhten peripheren Glucosespiegel ziehen eine erhöhte Insulinsekretion nach sich. Phänotypisch wäre damit eine IR gegeben. Dauerhaft erhöhte Insulin- und Glucosespiegel können zur Entwicklung peripherer IR und schließlich zur klinischen Manifestation des Diabetes führen. Bestätigt sich, dass reduzierte GLUT2 Expression in dedifferenzierten bzw. proliferierenden Hepatozyten tatsächlich eine relevante Auswirkung auf den Glucosespiegel hat, so stellt dies eine völlig neue Pathogenese der Hyperglycämie dar, die auch in anderen Zusammenhängen eine Rolle in der Entstehung von IR und T2DM spielen könnte.

## ABSTRACT

---

Chronically HCV-infected patients a 60% increased risk to develop type 2 diabetes mellitus (T2DM). A better understanding of the underlying mechanisms is essential, because the affected patients show a reduced responsiveness to IFN $\alpha$  therapy, accelerated fibrosis and higher incidence for hepatocellular carcinoma. The investigation of HCV-induced changes in infected patients like e.g. insulin resistance (IR) is strongly limited by the available model systems. Frequently, proliferating hepatoma cells and short infection times are used, only insufficiently mirroring the hepatocellular metabolism and the aspect of chronicity in the human infected liver.

In the here presented work, a differentiation-protocol was established, which allows persistent infection with HCV and shows typical hepatocyte metabolism. Hepatocytes are able to synthesize *de novo* glucose. This so called gluconeogenesis is regulated by insulin. The binding of insulin to the insulin receptor (InsR) leads via activation of the PI3K-Akt signaling pathway to the inactivation of the transcription factor Foxo1, which is responsible for gluconeogenesis-keyenzyme (PEPCK and G-6-Pase) expression. Inactivated Foxo1 leaves the nucleus and gluconeogenesis stops. So far, cellular IR of HCV-infected hepatocytes, was thought to be the cause of the development of T2DM in chronic Hepatitis C (CHC). Hepatic IR is defined as inadequate suppression of gluconeogenesis by insulin. Thus, in HCV-induced IR, enhanced nuclear Foxo1 accumulation as well as increased expression of PEPCK and G-6-Pase in the presence of insulin would be expected. In the here presented work, a reduced expression of the InsR and a reduced insulin-induced activation of Akt were observed, but surprisingly this did not correlate with increased gluconeogenesis. Rather, nuclear Foxo1 and the expression of PEPCK and G-6-Pase were reduced as well. Hence, the observed changes did not match an IR. Further experiments confirmed the speculation, that the changes in the insulin-signaling pathway were consequence of a cellular dedifferentiation. Analysis of the differentiation markers OATPC and BSEP, the proliferation marker Ki67 and cell cycle analyses showed, that HCV leads to hepatocyte-dedifferentiation, reentry of beforehand differentiated cells into the cell cycle and to an S-phase arrest. The latter probably displays an environment, which is, due to high nucleotide-availability, beneficial for viral RNA replication. The induction of the S-phase could be partially

ascribed to enhanced EGF-secretion by HCV-infected cells and thus did not only affect HCV-positive, but also HCV-negative neighbor-cells.

In the course of dedifferentiation, a reduction in the protein-expression of the liver-specific glucose transporter GLUT2 was observed, among other things, which lead to a reduced glucose-uptake-capacity of the HCV-infected samples. Based on these results, the following hypothesis can be made for the pathogenesis of T2DM in CHC-patients: As a result of a reduced GLUT2-expression in the context of HCV-induced dedifferentiation, hepatic glucose-uptake-capacity is reduced in HCV-infected patients. The resulting elevated peripheral glucose-levels entail an enhanced insulin secretion and high glucose- and insulin-levels together phenotypically display an IR. Permanently elevated insulin- and glucose-levels can lead to the development of IR and finally to the clinical manifestation of diabetes. If it proves true, that reduced GLUT2 expression in dedifferentiated and proliferating hepatocytes respectively, has a relevant impact on blood-glucose levels, this displays a completely novel pathogenesis of hyperglycemia, which could also play a role in IR and T2DM in other contexts.

# 1. EINLEITUNG

---

---

## 1.1. HEPATITIS C

---

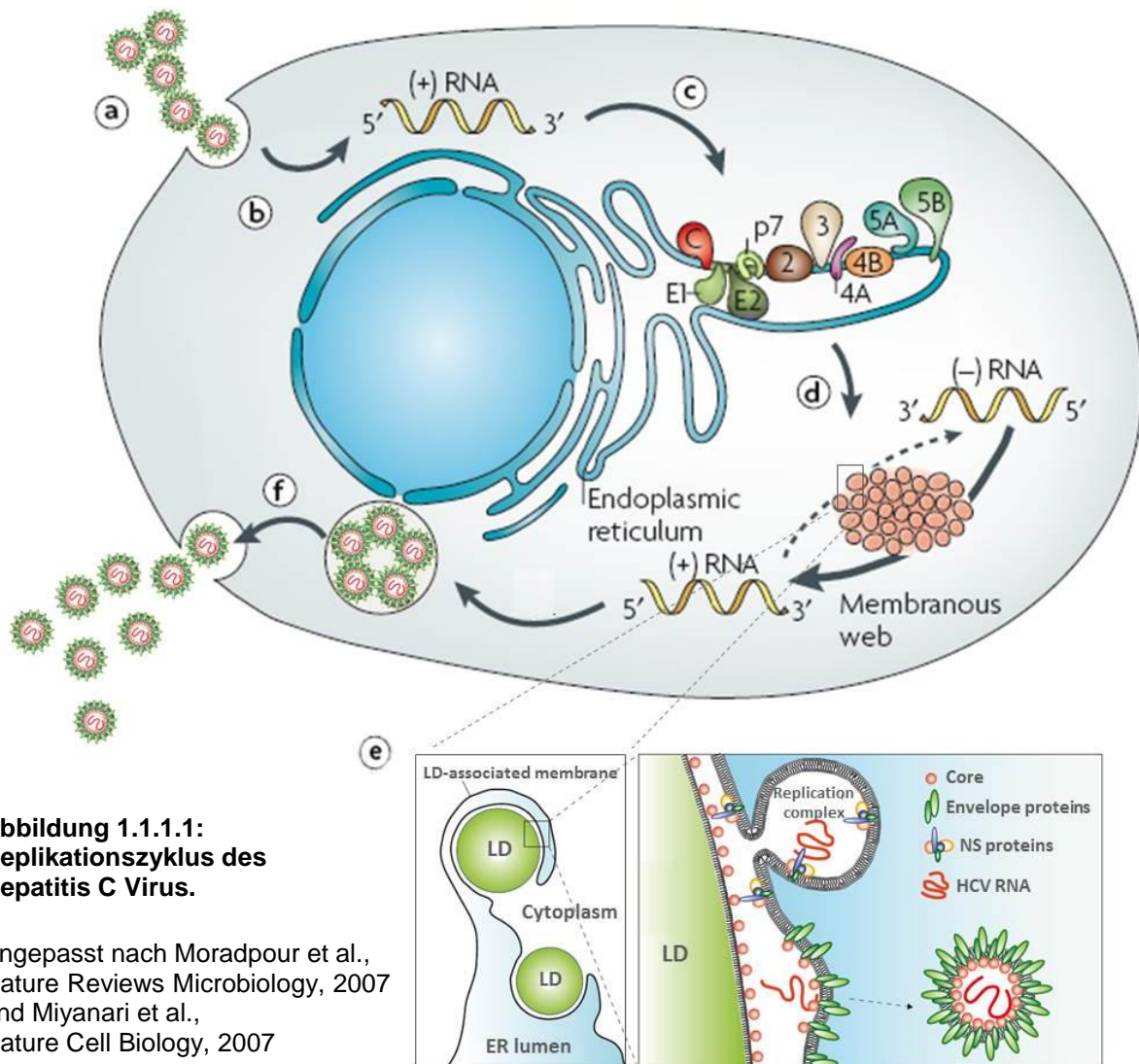
### 1.1.1. DAS HEPATITIS C VIRUS: AUFBAU, KLASSIFIZIERUNG UND REPLIKATION

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein kleines, behülltes Virus mit einem Durchmesser von etwa 50 nm. Die Virushülle ist aus Membranlipiden der Wirtszelle aufgebaut, in die die viralen Hüllproteine E1 und E2 integriert sind. Innerhalb der Virushülle liegt das Kapsid, das sich aus einer Kopie des viralen Genoms und viralen Core-Proteinen zusammensetzt. Das virale Genom besteht aus nur einer, etwa 9,6 kb langen RNA Sequenz mit positiver Orientierung, die sowohl als Vorlage für die RNA Replikation als auch direkt der Proteintranslation dient [1].

HCV wurde als einziges Virus dem Genus Hepacivirus innerhalb der Familie der Flaviviren zugeordnet, zu der außerdem Viren des Genus Pestivirus (z.B. „bovine viral diarrhoea virus“ (BVDV) oder „classical swine fever virus“ (CSFV)) und Flavivirus (z.B. „dengue virus“ (DV) oder „yellow fever virus“ (YFV)) gehören [1]. Es wird angenommen, dass in einem infizierten Menschen täglich etwa  $10^{12}$  virale Partikel gebildet werden [2]. Dies, zusammen mit der hohen Fehlerrate der RNA abhängigen RNA-Polymerase, führt zu einer hohen Variation der Hepatitis C Viren [3]. Insgesamt werden mindestens 6 Genotypen (1 bis 6) mit Sequenzunterschieden von über 30% unterschieden. Diese werden weiter in Subtypen (a, b, c, ...) unterteilt, die sich in 20-25% ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden [4,5]. Selbst innerhalb eines Patienten findet sich eine hohe genetische Variabilität der Viruspopulation mit sogenannten „Quasispecies“ [3,6]. Die hohe Variabilität ist weitgehend auf den zentralen offenen Leserahmen beschränkt. Das 5' Ende der viralen RNA ist hoch konserviert und enthält die sogenannte „internal ribosome entry site“ (IRES), die einen Beginn der Proteintranslation unabhängig von der typischen „cap“-Struktur zellulärer mRNA ermöglicht. Auch das 3'-Ende der RNA-Sequenz ist hoch konserviert und entscheidend für die Replikation der viralen RNA [1].

Der HCV Replikationszyklus ist schematisch in Abb. 1.1.1.1 dargestellt.





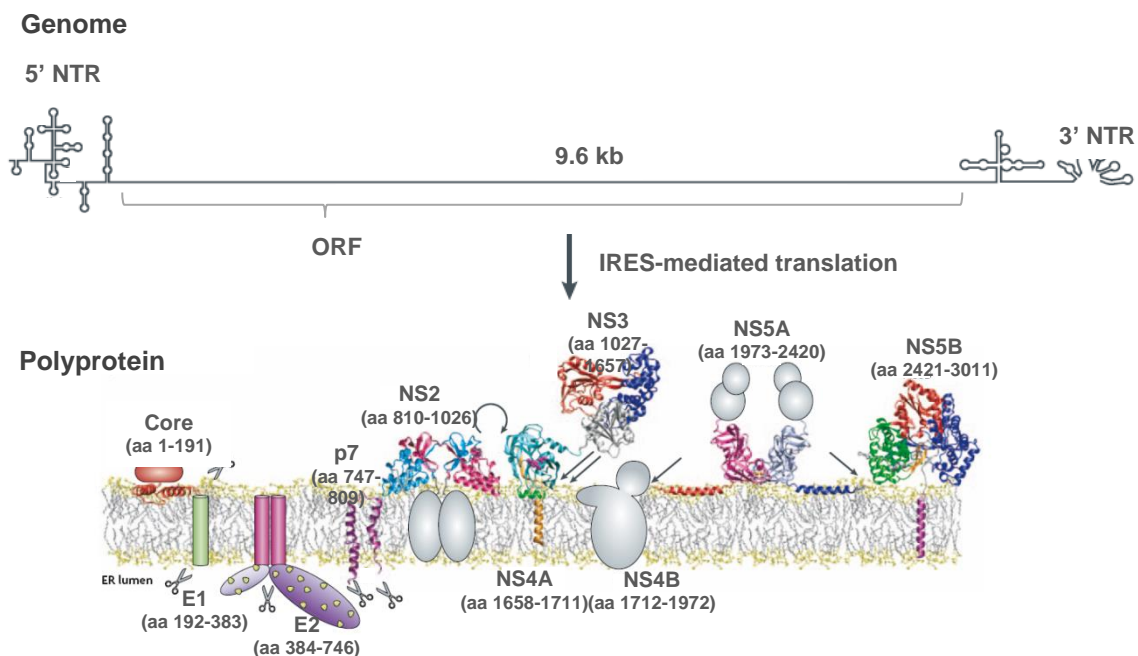
**Abbildung 1.1.1.1:**  
**Replikationszyklus des**  
**Hepatitis C Virus.**

Angepasst nach Moradpour et al.,  
Nature Reviews Microbiology, 2007  
und Miyanari et al.,  
Nature Cell Biology, 2007

(a) HCV wird über Clathrin-vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen. (b) Die Virale positivsträngige RNA wird freigesetzt und dient als Vorlage der Proteinsynthese sowie der RNA Replikation. (c) Die Proteinsynthese und Spaltung erfolgt am Endoplasmatischen Retikulum (ER) (detaillierte Beschreibung s. Abb. 1.1.1.2). (d) Die RNA Replikation und Zusammensetzung der viralen Partikel erfolgt in viral induzierten „membranous web“ Strukturen. (e) „membranous web“ Strukturen sind aus Lipid Droplets (LD) und vom ER stammenden Membranen aufgebaut. (f) Neugebildete Viren verlassen die Zelle über sekretorische Pfade.

Die genauen Abläufe der Bindung von HCV an die Wirtszelle und der Aufnahme in die Wirtszelle sind noch nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch für eine Reihe von Zelloberflächenmolekülen eine Interaktion mit HCV Hüllproteinen bzw. eine Beteiligung an Eintritt von HCV in die Wirtszellen gezeigt werden. Dazu gehören die Glycosaminoglycane, der LDL-Rezeptor, der Scavenger Rezeptor-BI (SR-BI), CD81, Claudin-1, Occludin, der EGF-Rezeptor und EphA2 [7–13]. Nach dem aktuell favorisierten Modell führt eine gering affine Bindung an Glycosaminoglycane und den LDL-Rezeptor zu einem „Arrest“ der viralen Partikel an den Leberzellen, was dann die höher affine Bindung an CD81 und SR-BI ermöglicht [1]. Die zelluläre Aufnahme

der Viruspartikel erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endozytose [14]. Die Rolle der Tight-Junction-Proteine Claudin-1 und Occludin ist nicht genau bekannt, wird aber bei späten Eintrittsprozessen vermutet [1]. Über die Clathrin-vermittelte Endozytose gelangt HCV ins Endosom, wo durch den niedrigen pH-Wert dieses Zellkompartiments eine Fusion der viralen Hülle mit der Endosomenmembran stattfindet, die zur Freisetzung des viralen Kapsids führt [15,16]. Bei der Freisetzung des viralen Genoms durch den niedrigen pH-Wert handelt es sich um einen Vorgang, der bei vielen positiv-strängigen RNA Viren gefunden wird, für HCV aber noch nicht genau verstanden ist [17,18].



**Abbildung 1.1.1.2: HCV Genomorganisation und Polyproteinsynthese und -prozessierung.**

Angepasst nach Moradpour, Benin, Rice, Nature Reviews Microbiology, 2007

Scheren zeigen Spaltstellen durch Proteasen der Wirtszelle. Der Runde Pfeil zeigt die Spaltstelle der HCV NS2-3 Protease. Gerade Pfeile zeigen Spaltstellen des NS3-4A Proteasekomplexes.

Bekannte Proteinstrukturen sind als Bandstrukturen gezeigt. Proteine und Lipiddoppelschicht haben denselben Größenmaßstab. Gelbe Punkte in den im ER-Lumen befindlichen Teilen der Hüllproteine E1 und E2 zeigen die Glycosylierungen an.

Von der ins Zytoplasma entlassenen viralen RNA wird die Translation des 3011 Aminosäuren langen Polyproteins, wie oben erwähnt, durch die virale IRES initiiert. Anders als bei der Translation eukaryotischer mRNA, bei der der eukaryotische Translations-Initiations Faktor eIF-4F an die cap-Struktur der mRNA bindet und damit die aktivierte 40S Untereinheit des Ribosoms zur mRNA leitet, kann im Fall der HCV RNA die 40S Untereinheit direkt an die IRES binden [19,20]. Nach Bindung von eIF-3

und einem Komplex aus eIF-2, Met-tRNA und GTP bindet die 60S Untereinheit und die Translation beginnt. Das in der ER-Membran entstehende Polyprotein wird bereits während der Translation durch Proteasen der Wirtszelle sowie durch die entstehenden HCV Proteasen NS2-3 und NS3-4A in die einzelnen viralen Proteine gespalten [21,22] (Abb. 1.1.1.2).

Im Folgenden werden die einzelnen HCV-Proteine in der Reihenfolge ihrer Entstehung aus dem HCV-Polyprotein kurz in ihren wichtigsten bekannten Funktionen beschrieben.

### **Strukturproteine:**

#### **Core-Protein:**

Das erste entstehende Protein ist das core-Protein. Ihm werden neben seiner Rolle als Strukturprotein viele regulatorische Effekte auf die Wirtszelle zugeschrieben, wie Veränderungen der Zellpolarität, Apoptosehemmung, Regulation der Expression von microRNAs, Interaktion mit Stress- und Proliferationssignalwegen, Veränderung der Insulinsensitivität und vor allem Veränderungen des Lipidstoffwechsels [23–29]. HCV-core Protein lokalisiert in der Zelle in den Membranen von Lipid Droplets (LD) und rekrutiert virale Nichtstruktur-Proteine sowie replizierende RNA zu LD-assoziierten Membranen. Dies ist entscheidend für die Bildung infektiöser Partikel [30].

#### **Hüllproteine (engl. envelope proteins) E1 und E2:**

Anders als das core-Protein verweilen die im Polyprotein anschließenden Proteine E1 und E2 zunächst im ER, wo sie ihre komplexe Faltung und Glycosylierung, die entscheidend für die Infektiösität der freigesetzten Partikel ist, erfahren [31].

#### **Nicht-Strukturproteine (NS- Proteine):**

##### **p7:**

Das erste Nichtstrukturprotein ist p7. Seine Funktion ist bislang nicht genau verstanden, es ist jedoch für eine produktive Infektion entscheidend [32].

**NS3:**

NS3 ist abgesehen von seiner Proteaseaktivität auch für das Auftrennen der viralen RNA zuständig [33].

**NS3-4A Komplex:**

Auch der Serin-Protease-Komplex NS3-4A bewirkt nicht nur die Spaltung des Polypeptids zuständig, sondern inaktiviert darüber hinaus zwei Proteine der angeborenen Immunantwort: Trif und Cardif [34,35].

**NS4B:**

Die einzige bislang bekannte Rolle des Nichtstrukturproteins NS4B ist die Induktion von „membranous web“ Strukturen, den Orten der viralen RNA Replikation [36]. Derartige Strukturen aus veränderten zellulären Membranen sind typisch für positiv-strängige RNA Viren und dienen vermutlich dazu, virale Bestandteile lokal zu konzentrieren und die RNA zu stabilisieren und vor dem Angriff der doppelsträngigen RNA-Zwischenschritte durch Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu schützen [1,37].

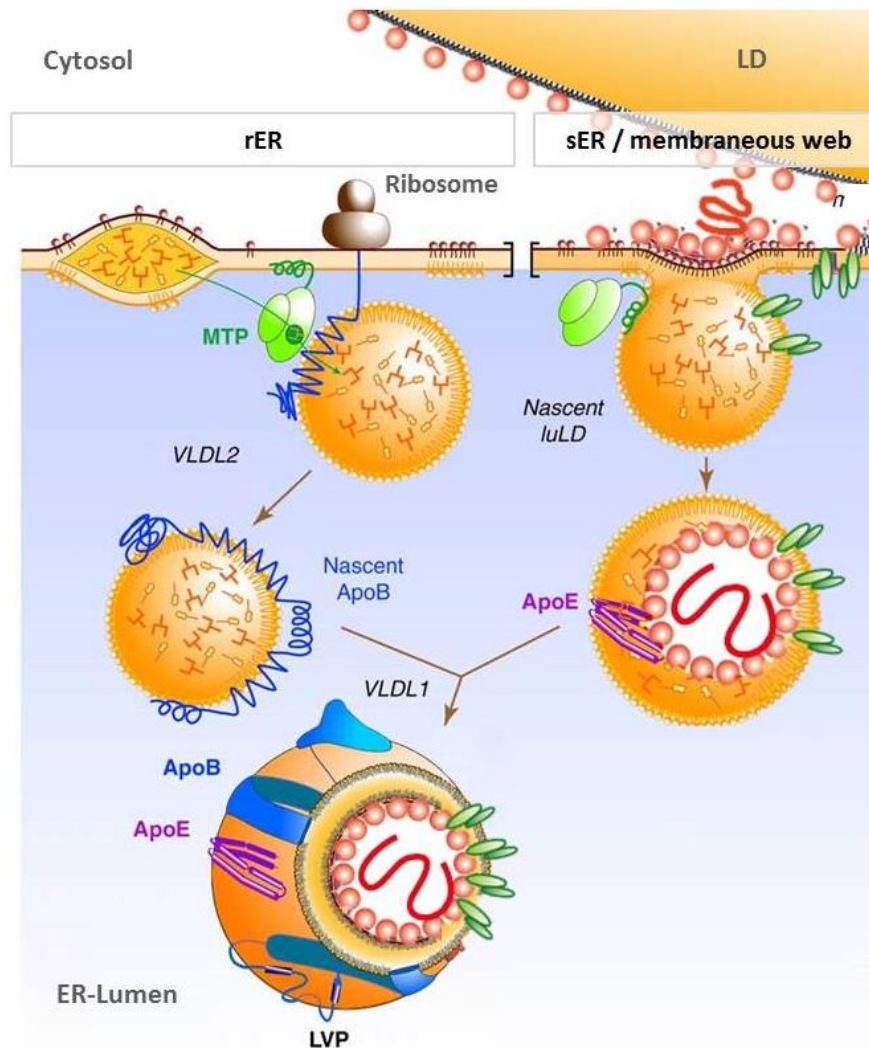
**NS5A:**

Auch die Rolle des NS5A Proteins ist nach wie vor Thema intensiver Forschungen. Es konnten zahlreiche Interaktionen mit Wirtsproteinen, die in den Bereichen Zelladhäsion, Wachstum, Immunabwehr, Signalwege oder Zelltod eine Rolle spielen, gezeigt werden [38,39].

**NS5B:**

Das letzte aus dem Polyprotein entstehende Protein ist die RNA abhängige RNA Polymerase NS5B. Die ist sowohl für die Synthese der negativ-strängigen als auch der positiv-strängigen RNA zuständig [40–42].

Über den Austritt neugebildeter Viren aus der Zelle ist nach wie vor wenig bekannt. Vermutlich knospen die Virionen in vom ER stammende Membranen und können sich dann in den Weg der Lipoproteine sehr geringer Dichte einschleusen und die Zelle als „hybrider“ Lipo-Viro-Partikel verlassen [43] (Abb. 1.1.1.3).

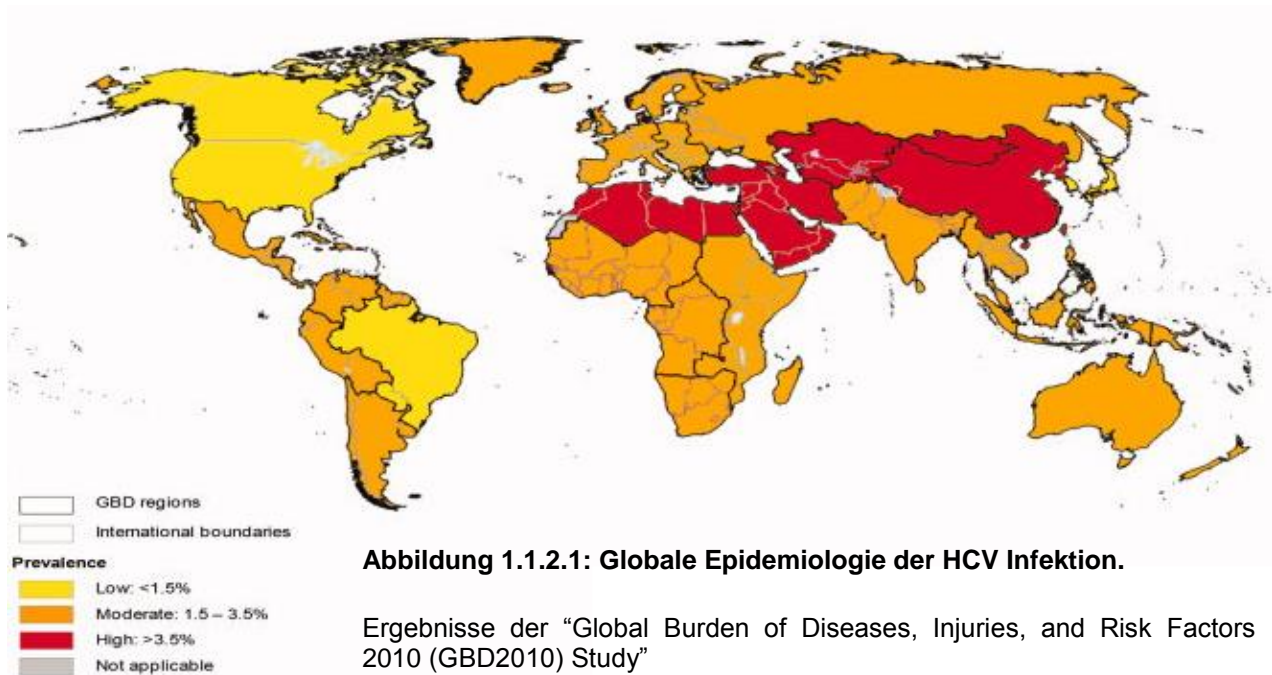


**Abbildung 1.1.1.3: Modell der Entstehung und Freisetzung von Lipo-Viro-Partikeln**  
 Angepasst nach Bartenschlager et al., Trends in Microbiology, 2011

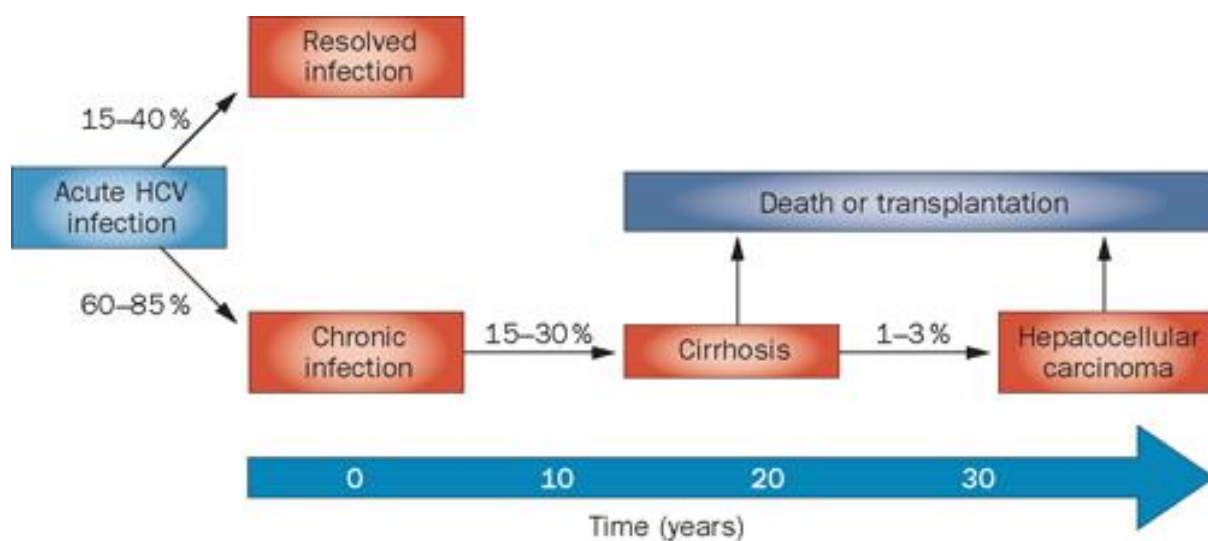
Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL = very low density lipoprotein) entstehen aus zwei Vorstufen: am rauhen ER (rER) wird Apolipoprotein B (ApoB, blaue Linie) bereits während der Synthese durch das microsomale Triglycerid Transfer Protein (MTP) mit Triglyceriden und Phospholipiden beladen. Am glatten ER (smothe ER = sER) oder im durch HCV induzierten „membraneous web“ entstehen, ebenfalls durch MTP, luminale Lipid Droplets (luLDs). Auf ER Membranen bzw. membraneous web Membranen befindliche Hüllproteine können auf die Membran dieser luLDs gelangen. Gleichzeitig integrieren Kapside mit viraler RNA in die Partikel. So entsteht beim Fusionsschritt von VLDL2 mit luLD zum VLDL1 ein Lipo-Viro-Partikel (LVP).

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGIE, VERLAUF DER HCV INFEKTION UND MÖGLICHKEITEN DER THERAPIE

Eine im April diesen Jahres veröffentlichte Metaanalyse zeigt, dass etwa 185 Millionen Menschen und damit 2,8% der Weltbevölkerung (akut oder chronisch) mit dem Hepatitis C Virus infiziert sind [44]. Die neuesten Schätzungen der WHO für chronisch Infizierte liegt bei 150 Millionen Menschen [45]. Jährlich kommen etwa 3-4 Millionen Neuinfektionen hinzu und über 350.000 Menschen sterben jährlich an durch HCV verursachten Lebererkrankungen [46]. Die Prävalenz zeigt große geographische Unterschiede, mit über 3,5% infizierten Menschen in beispielweise Nordafrika und Zentral- und Ost-Asien, mittlerer Prävalenz von 1,5 – 3,5% in Süd- und Südostasien, Lateinamerika aber auch Europa, und niedrigster Prävalenz in Brasilien und den USA [44] (Abb. 1.1.2.1). Hohe Infektionsraten in Entwicklungsländern sind auf fehlende diagnostische Tests für Bluttransfusionen und wiederholte Verwendung von Injektionsnadeln zurückzuführen. Infektionen von Mutter zu Kind und über Sexualkontakt sind selten aber möglich. In entwickelten Ländern treten Infektionen durch Bluttransfusionen und Organtransplantationen dank diagnostischer Routinetests nicht mehr auf. Neuinfektionen sind hier in der Regel auf unprofessionell durchgeführte Tattoos oder Piercings sowie die Wiederverwendung von Injektionsnadeln zwischen Drogenkonsumenten zurückzuführen [44].



HCV ist ein hepatotropes, nicht cytopathisches Virus [47]. Neuinfektionen führen nur in 15-40% zu akuter Hepatitis mit Elimination des Virus durch das Immunsystem [48] (Abb. 1.1.2.2.). Bei der Mehrheit der Patienten verläuft die Infektion asymptomatisch oder mit schwachen, erkältungsähnlichen Symptomen. In diesen Fällen persistiert das Virus und die Infektion wird oft erst nach vielen Jahren diagnostiziert, wenn die Entstehung von fibrotischem Lebergewebe zu einem progressiven Verlust der Leberfunktionen führt [49]. Diese Patienten haben ein hohes Risiko eine Leberzirrhose und ein hepatozelläres Karzinom (HCC, hepatocellular carcinoma) zu entwickeln [50]. Die Progression der chronischen Hepatitis C (CHC) ist von Faktoren wie Co-Infektion mit Hepatitis B Virus (HBV) oder humanem Immunodefizienz Virus (HIV), Alkoholkonsum und Alter zum Zeitpunkt der Infektion abhängig und korreliert zudem mit dem Anteil der infizierten Hepatozyten, der von Patient zu Patient zwischen 7 und 20% schwankt [49,51,52].



**Abbildung 1.1.2.2: Natürlicher Verlauf einer HCV Infektion.**

Aus „Management of rheumatic disease with comorbid HBV or HCV infection“  
Vassilopoulos, D. & Calabrese L. H  
Nature Review Rheumatology, 2012

Die Entwicklung eines HCC ist zum einen eine Folge der andauernden Immunreaktion gegen die infizierten Leberzellen, die zu schwach ist um das Virus zu eliminieren aber eine fortwährende Leberschädigung mit konsekutiver kompensatorischer Proliferation mit sich bringt. Diese birgt das Risiko der Bildung

von Narbengewebe (Fibrose) und der Entstehung von pro-karzinogenen Mutationen. Zum anderen wurden auch die viralen Proteine NS3, NS5A und core mit der Entstehung eines HCC in Verbindung gebracht [53,54]. Über "epidermal growth factor receptor"- (EGFR), "insulin-like growth factor receptor 1"- (IGFR1), PI3K-AKT- und RAS-Signalwege induzieren diese Proteine Wachstum bzw. hemmen die Apoptose von infizierten Zellen [55]. Für NS3, NS5A und core-Protein wurden zudem Veränderungen der Funktion des Tumorsuppressor-Proteins p53 beschrieben [56–58]. HCV-core scheint außerdem in der Lage zu sein durch Aktivierung von DNA-Methyltransferasen die Expression von Genen, die für die DNA-Reparatur entscheidend sind, zu reduzieren [59]. Die meisten der beschriebenen Ergebnisse wurden allerdings aus Überexpressionsmodellen der einzelnen Proteine gewonnen, die zudem teilweise an proliferierenden Tumorzellen durchgeführt wurden.

Eine prophylaktische Impfung gegen HCV ist aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus nicht möglich. Bei bestehender chronischer Infektion ist jedoch eine dauerhafte Eliminierung des Virus grundsätzlich erreichbar, denn, anders als beispielweise HBV oder HIV, integriert HCV als positiv-strängiges RNA Virus keine virale Nucleinsäure in das Wirtsgenom [49]. Allerdings führt die Therapie mit pegyliertem Interferon alfa (pegIFN $\alpha$ ) und Ribavirin (RBV) - bis 2011 Standardtherapie für alle Virus Genotypen - teilweise nur für etwa die Hälfte der Patienten zur Elimination des Virus. Der Erfolg ist abhängig von Wirtsfaktoren wie Alter, Viruslast, Geschlecht, Ethnie, Gewicht, Progression der Leberschädigung und bestimmten SNPs, vor allem aber vom Virus Genotyp [49]. Der weltweit häufigste und in Nordamerika und Europa prävalente Virus Genotyp ist Genotyp 1 [60]. Hier liegt die Erfolgsrate der IFN $\alpha$ -RBV Therapie bei unter 50%. Bei Genotyp 2 und 3 liegt der Therapieerfolg mit über 80% deutlich höher [61,62]. Um möglichst eine dauerhafte Viruselimination zu erreichen, ist die Therapiedauer für Genotyp 1 Patienten auf 48 Wochen angesetzt, während sie für Patienten infiziert mit Genotyp 2 oder 3 nur 24 Wochen beträgt [60]. In beiden Fällen kommt es aufgrund häufig auftretender, schwerer Nebenwirkungen wie Depressionen, Schlaflosigkeit, Hautirritationen und trockene Schleimhäute, Anämie, Übelkeit, Kopfschmerzen oder Beeinträchtigung der Sehkraft, oft zum Abbruch der Therapie durch den Patienten [63,64].

Seit Mai 2011 wurden die Therapiemöglichkeiten durch die Medikamente Telaprevir und Boceprevir, Inhibitoren der viralen Protease NS3, erweitert. Beide werden vor allem bei Patienten mit Genotyp 1 Infektion in Kombination mit IFN $\alpha$  und RBV



eingesetzt [65]. Das Problem der Nebenwirkungen durch IFN $\alpha$  bleibt dabei bestehen und Nebenwirkungen der Protease Inhibitoren, wie Hautausschlag, Anämie oder Geschmacksstörungen, kommen hinzu [66]. Insgesamt kann die Therapiedauer aber für behandlungsnaive Patienten verkürzt werden und vor allem steigt die Chance, HCV zu eliminieren für Genotyp 1 Patienten von knapp 50% auf bis zu 80% an [67–69]. Aktuell befinden sich Inhibitoren der viralen Polymerase und zusätzliche Proteaseinhibitoren in klinischen Studien, was die Aussicht verbessert, in naher Zukunft jeden HCV infizierten Patienten, der Zugang zu den entsprechenden Medikamenten hat, heilen zu können [70].

### 1.1.3. MODELSYSTEME DER HCV INFEKTION

1989 identifizierten Choo und Kollegen im Blut eines Patienten, der nach Bluttransfusion an Hepatitis erkrankt war, eine neue Nukleinsäure-Sequenz, die Ähnlichkeiten zu bis dahin bekannten Flaviviren aufwies. Damit bestätigten sie, dass die bereits 1975 beschriebene „non-A, non-B Hepatitis“ ebenfalls von einem Virus verursacht wurde [71,72]. Versuche auf Grundlage dieser Sequenz *in-vitro* Modelle der HCV Infektion zu entwickeln blieben jedoch erfolglos. 1997 zeigte sich, dass der ersten Sequenz ein Abschnitt am 3'-Ende des viralen Genoms gefehlt hatte [73]. Mit der nun vollständigen Sequenz gelang die Infektion von Chimpansen nach intrahepatischer Injektion von *in-vitro* transkribierter viraler RNA, jedoch nicht die RNA-Replikation und Virusproduktion in Zellkultur [74]. Aufgrund hoher Wirtsspezifität - der einzige natürliche Wirt des neben dem Mensch sind Chimpansen - blieb auch die Etablierung von Kleintiermodellen erfolglos. Mit Hilfe von Expressionsvektoren war es möglich, die Synthese des HCV Polyproteins und dessen Spaltung in die 10 bzw. 11 viralen Proteine zu untersuchen und Proteinstrukturen aufzuklären [75–80]. Die Konstruktion von HCV „Pseudo-Partikeln“ – retrovirale Partikel mit funktionellen HCV-Oberflächenproteinen – ermöglichte zudem die Untersuchung der Bindung von HCV an und des Eintritts in die Wirtszellen [81,82]. 1999 gelang schließlich die Replikation von subgenomischer HCV RNA in der Hepatoma Zelllinie Huh7 [83]. Durch Selektion von besonders replikationsfähigen Zellklonen wurde die Zelllinie Huh7.5 etabliert, in der subgenomische und vollständige HCV RNA auch ohne Selektionsdruck replizierte, jedoch ohne virale Partikel zu bilden [84].

Der Durchbruch gelang 2005 Wakita et al. mit einem Genotyp 2a Isolat aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis. Huh7 Zellen, die mit der RNA des sogenannten JFH-1 Isolats elektroporiert wurden, sezernierten virale Partikel, die sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* infektiös waren [85]. Hierbei waren die produzierten Virustiter jedoch äußerst niedrig und erst die Verwendung einer Hybrid-RNA Sequenz genannt Jc1 (Kombination der RNA-Sequenz für die Nichtstrukturproteine aus dem Isolat JFH-1 mit der Sequenz der Strukturproteine aus einem weiteren Genotyp 2a Patientenisolat (J6)), sowie die Verwendung von Huh7.5 Zellen führte zu bis zu 1000fach höheren Titern [82,83]. Dieses Modell aus dem chimären Genotyp 2a Virus Jc1 und der Zelllinie Huh7.5 ermöglichte endlich die Untersuchung aller Schritte des viralen Replikationszykluses in einem System. Dennoch zeigte bereits die erste Charakterisierung der produzierten Viren Defizite des Modells auf: Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben kommen im Blut zirkulierende HCV Partikel assoziiert mit Lipoproteinen vor, was zu einer sehr heterogen und insgesamt ungewöhnlich niedrigen Dichte führt [88,89]. Dabei haben Partikel mit niedriger Dichte die höchste Infektiosität [90]. Die Dichte der in Zellkultur produzierten Viren liegt mit ca. 1,15 g/ml deutlich höher [85]. Werden allerdings Chimpanse mit den Viren aus der Zellkultur infiziert, so findet man bei den in der Chimpanseleber gebildeten Partikeln wieder ein heterogenes Dichtespektrum inklusive der Partikel niedriger Dichte [90]. Die erneute Infektion von Huh7.5 Zellen mit diesen Viren führt wieder nur zur Freisetzung von Partikeln höherer Dichte. Ursache dafür scheinen Defekte im Lipidstoffwechsel der Huh7.5 Zellen zu sein, die zu einer unvollständigen Lipidierung von Lipoproteinen führen [91]. Somit ist unklar, inwieweit Partikelbildung und –Freisetzung in diesem Modell mit der Situation in der humanen Leber übereinstimmen. Besonders kritisch ist es allerdings, wenn Fragestellungen zu Effekten des Virus auf die Wirtszelle untersucht werden sollen. Im Menschen infiziert das Hepatitis C Virus wachstumsarretierte, differenzierte Hepatozyten. Es ist davon auszugehen, dass das Virus dort eine völlig andere Stoffwechsellage, andere Signalwege und somit andere, seine Replikation limitierende oder begünstigende Faktoren antrifft als in proliferierenden Hepatomazellen. Dies lässt vermuten, dass auch die Effekte des Virus auf Signalwege und Stoffwechselforgänge hier anders als *in vivo* im Patienten sind.

Die Verwendung von aus Patienten isolierten primären humanen Hepatozyten (PHHs) oder von differenzierten Hepatomazellen stellen Versuche dar, die Seite der

Wirtszelle besser zu imitieren. PHHs verlieren zwar in Kultur zunehmend ihre Polarisierung, bleiben aber dennoch hoch differenziert. Erstaunlicherweise lassen sich diese Zellen jedoch kaum mit HCV infizieren. Zusammen mit ihrer limitierten Verfügbarkeit führt dies dazu, dass sie nur selten als Modell verwendet werden [92]. Sainz und Chisari beschrieben 2006 mit DMSO differenzierte Huh7 Zellen als Modell für persistente HCV Infektion [93]. Untersuchungen der Effekte von Interferon- $\alpha$  auf die HCV-Infektion zeigten, dass die Ergebnisse aus differenzierten Hepatomazellen die in Patienten beobachteten Effekte tatsächlich wesentlich besser erklären können [94]. Allerdings ist der Mechanismus, durch den DMSO zur Zelldifferenzierung führt, bis heute nicht verstanden und es ist daher schwierig abzuschätzen, in wieweit untersuchte Signalwege durch DMSO verändert werden. DMSO ist beispielweise dafür bekannt, die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen und gilt daher als chemisches Chaperon [95]. In Zellkultur verwendet könnte es daher in verschiedenen Bereichen die Ergebnisse beeinflussen: Als chemisches Chaperon könnte DMSO durch HCV induzierten „Endoplasmic-Reticulum-Stress“ maskieren; Effekte des Virus auf den Zellzyklus oder den Lipidstoffwechsel können nur vor dem Hintergrund der nicht genau verstandenen Effekte von DMSO auf den jeweiligen Bereich untersucht werden [96–100].

Zusätzlich zu den beschriebenen Zellkultur Modellen kommen einige *in-vivo* Modelle zum Einsatz. Da Chimpanse neben den Menschen der einzige Wirt des Virus sind, stellen diese das einzig echte Tiermodell der HCV Infektion und der Entstehung von Leberzirrhose und HCC in chronischer HCV Infektion dar. Aus ethnischen und finanziellen Gründen werden diese Experimente allerdings nur sehr begrenzt durchgeführt. Mäuse und andere Kleintiere können nicht mit dem Virus infiziert werden und murine Hepatozyten sind bei Transfektion mit der viralen RNA nicht in der Lage diese zu replizieren [101]. Effekte einzelner HCV Proteine oder auch des ganzen HCV Polyproteins wurden in transgenen Tieren untersucht [28,102–105]. Jedoch fehlen diesen Modellen immer die Effekte der viralen RNA Replikation sowie der Aspekt der adaptiven Immunantwort auf HCV Partikel in der Zirkulation. In sogenannten uPA-SCID-Mäusen (chimäre Mäuse aus „urokinase plasminogen activator“ und „severe combined immunodeficiency“ Tieren) wird die murine Leber mit humanen Hepatozyten besiedelt, die dann mit HCV infiziert werden können und HCV über mehrere Wochen replizieren [106]. Mäuse, deren Hepatozyten durch adenovirale Transfektion humanes CD81 und Occludin exprimieren, können

ebenfalls mit HCV infizierte werden, replizieren das Virus aber nicht [107]. Beide Systeme sind wertvolle Modelle für erste *in-vivo* Experimente mit potenziellen antiviralen Medikamenten, eignen sich aber aufgrund der Immunsuppression im einen bzw. aufgrund der fehlenden RNA Replikation im anderen Modell nur bedingt um Effekte von HCV auf den Wirt zu untersuchen.

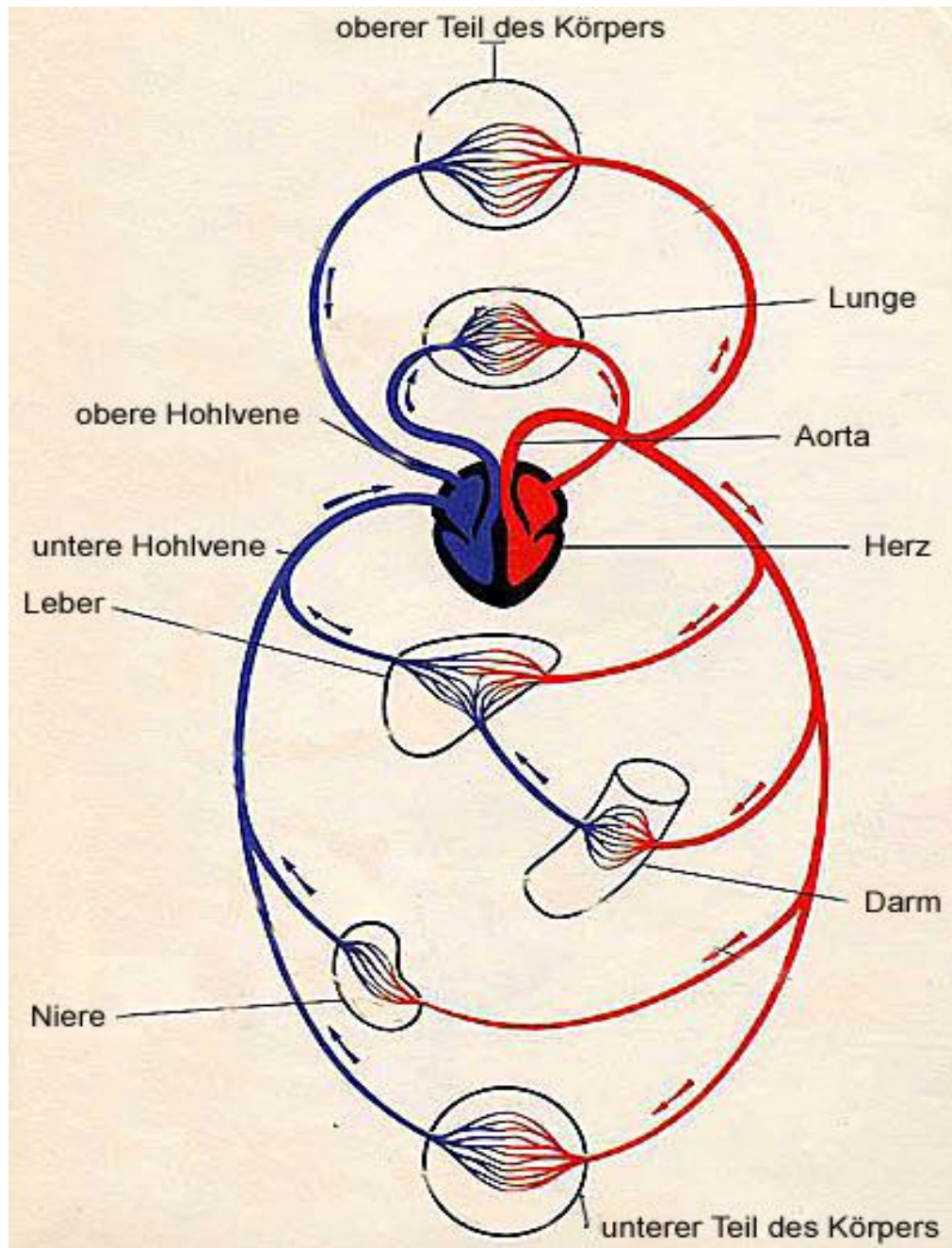
## 1.2. DIE LEBER ALS ZENTRALES STOFFWECHSELORGAN

---

Unsere Nährstoffzufuhr unterliegt großen Schwankungen: Die Menge und Zusammensetzung unsere Mahlzeiten variiert, zwischen den Mahlzeiten und Nachts findet keine Nährstoffzufuhr statt und auch mit mehreren Tagen oder sogar Wochen andauernden Fastenperioden muss der Körper umgehen können. Hinzu kommen Veränderungen im Nährstoffbedarf durch unterschiedliche körperliche Aktivität, Erkrankungen, Wachstum etc. Trotz dieser hohen Variabilität in Nährstoffzufuhr und -bedarf bewegen sich die physiologischen Nährstoffkonzentrationen in engen Grenzen [108–110].

Die zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Nährstoffkonzentration spielt die Leber. Sie besitzt nicht nur die Fähigkeit Nährstoffe in großen Mengen zu speichern, sondern ist auch in der Lage sie ineinander um- oder neu aufzubauen und sorgt so für die Gewährleistung konstanter Glucose-, Aminosäure- und Lipidkonzentrationen im Blut [110].

Abbildung 1.2.1 zeigt die Position der Leber im Blutkreislauf. Die meisten Nährstoffe erreichen die Leber direkt über die Pfortader. Durch diese anatomische Gegebenheit ist die Leber in der Lage, hohe Nährstoffkonzentrationen durch rasche Speicherung bereits in der ersten Leberpassage zu reduzieren, bevor das Blut über die untere Hohlvene zurück zum Herzen und weiter zu anderen Organen gelangt. Besonders schnell ist die Aufnahme im Fall der Glucose. Insgesamt verbleibt nur etwa ein Drittel der über den Darm aufgenommenen Glucose im Blut, zwei Drittel werden von der Leber aufgenommen und in Form von Glycogen gespeichert [109]. Experimente in Hunden zeigten eine hepatische Glucoseaufnahme von bis zu  $9,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  [111]. Durch Hyperglycämie kann sich im Menschen die viszerale Glucoseaufnahme um  $1,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  erhöhen [112]. Mit bis zu 150 g kann die in Form von Glycogen gespeicherte Glucose 10% des Gewichts der Leber ausmachen [110,113].

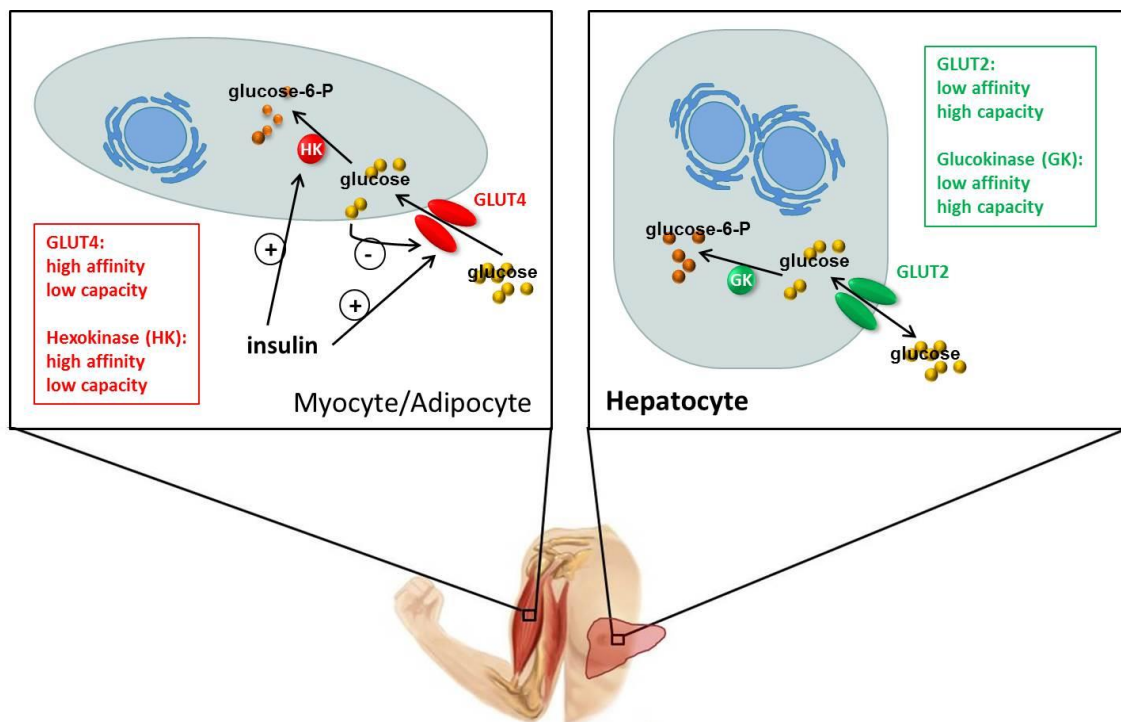


**Abbildung 1.2.1: Position der Leber im Blutkreislauf**

Quelle: Fondation La main à la patte

Die Versorgung der Leber mit sauerstoffreichem, arteriellem Blut erfolgt über die hepatische Arterie. Zudem erreicht die Leber von Darm kommendes, nährstoffreiches aber sauerstoffarmes Blut über die Pfortader. Detaillierte Abbildung der Leberdurchblutung: siehe Abb. 1.4.2.

Ob die Leber selbst Glucose überhaupt als Energiequelle verwendet, wird in Frage gestellt [114]. Als gesichert gilt, dass das gespeicherte Leberglycogen primär als Glucosespeicher für den gesamten Organismus und nicht als Energiespeicher des einzelnen Hepatozyten dient. Eine zusätzliche Form der Speicherung von Glucose ist, die Umwandlung in Lipide und Einlagerung in zelluläre Lipidspeicher [115].



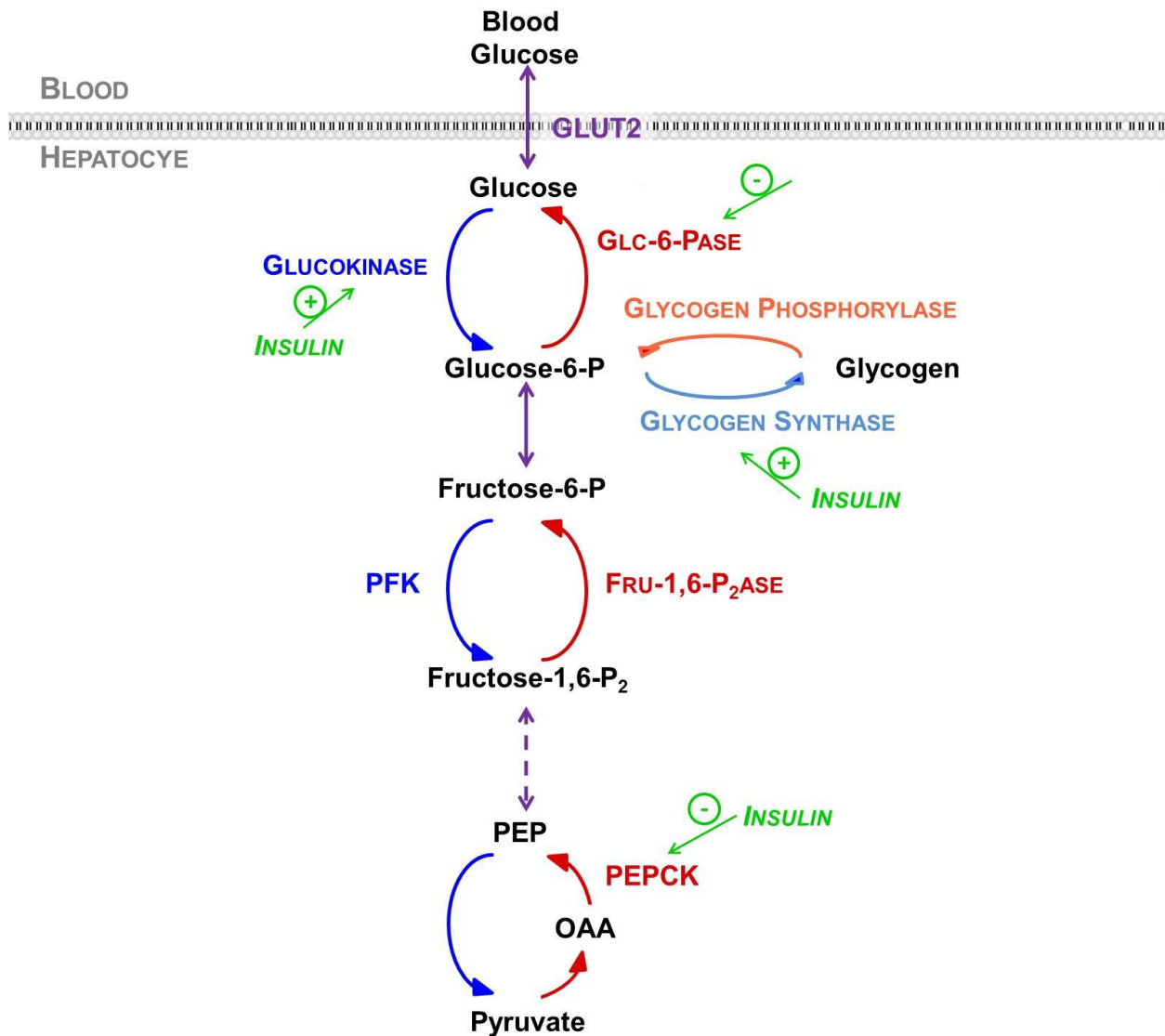
**Abbildung 1.2.2: Periphere vs. hepatische Glucoseaufnahme.**

In Muskel- oder Fettgewebe wird die Glucoseaufnahme durch Insulin stimuliert und durch intrazelluläre Glucose gehemmt. Sowohl der Glucosetransporter GLUT4 als auch die Hexokinase (das Enzym, das die intrazelluläre Glucose aus dem Konzentrationsgleichgewicht entfernt) zeichnen sich durch eine niedrige Kapazität aber hohe Affinität zu ihrem Substrat aus. Der Glucosetransporter der Leber, GLUT2, und die hepatische Glucokinase weisen dagegen eine hohe Kapazität aber niedrige Glucoseaffinität auf. Zudem wird in der Leber die Glucoseaufnahme kurzfristig weder durch Insulin noch durch intrazelluläre Glucose reguliert.

Zwei Moleküle sind für die hohe Glucose-Aufnahmefähigkeit der Leber verantwortlich: der hepatische Glucosetransporter GLUT2 und die hepatische Glucokinase. Beide unterscheiden sich in ihrer Kinetik stark von den analogen Molekülen der Peripherie. Während der beispielsweise im Muskelgewebe exprimierte Glucosetransporter GLUT4 durch hohe Affinität eine am Bedarf der Zelle orientierte Glucoseaufnahme sicherstellt, ist GLUT2 aufgrund niedriger Affinität aber hoher Kapazität auf die Aufnahme großer Glucosemengen bei Glucoseüberschuss ausgerichtet (Abb. 1.2.2). Im Gegensatz zu GLUT4 wird GLUT2 weder von Insulin aktiviert noch von intrazellulärer Glucose gehemmt. Ähnliche Unterschiede findet man zwischen der Glucokinase der Leber und der Hexokinase peripherer Gewebe. Beide Enzyme katalysieren die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat. Diese Reaktion ist der erste Schritt sowohl für die Speicherung von Glucose als Glycogen, als auch für ihren Abbau zur Energiegewinnung. Wie GLUT2

hat auch die Glucokinase eine sehr hohe Kapazität aber geringe Affinität. Zudem wird sie, anders als die Hexokinase, nicht vom Produkt der Reaktion – Glucose-6-Phosphat – gehemmt. Da Glucose-6-Phosphat nicht von GLUT2 transportiert werden kann, wird die Glucose durch diese Reaktion in der Zelle festgehalten. Zudem entfernt die Reaktion intrazelluläre Glucose aus dem Konzentrationsgleichgewicht, was eine kontinuierliche Aufnahme über GLUT2 entlang des extrazellulären/intrazellulären Konzentrationsgradienten aufrechterhält [108,116].

Wie erwähnt reguliert die Leber Nährstoffspiegel nicht nur auf den Auf- und Abbau von zellulären Nährstoffspeichern, sie ist auch in der Lage Nährstoffe neu zu synthetisieren. Die Synthese von Glucose bei längerer Nahrungskarenz ist überlebensnotwendig, da Erythrozyten ausschließlich Glucose als Energiequelle verwerten können und auch das Gehirn nur langsam auf die Verwendung von Ketonkörpern als Energiequelle umstellen kann. Die meisten Reaktionsschritte der Synthese von Glucose – der Gluconeogenese – sind die Umkehrreaktionen der Glycolyse und werden auch von den gleichen Enzymen durchgeführt. Die Richtung all dieser Reaktionen wird allein vom Konzentrationsgradienten der Metabolite bestimmt. In drei Reaktionsschritten, in denen in der Glycolyse Energie frei wird und in der Gluconeogenese folglich Energie benötigt wird, unterscheiden sich die Stoffwechselwege jedoch (Abb. 1.2.3). Diese irreversiblen Schritte erlauben eine Regulierung der Stoffwechselwege durch Hormone und allosterische Liganden. Zudem bestimmt die Expression der Enzyme, die diese Schlüsselreaktionen katalysieren, ob in einer Zelle die notwendigen Reaktionen durchgeführt werden können. Hepatozyten gehören zu den wenigen Zellen, die die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese exprimieren: Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase). Ihre Expression wird von Glucocorticoiden und cyclischem AMP stimuliert und von Insulin gehemmt. Somit findet bei Fasten, Stress oder körperlicher Anstrengung eine Induktion der Gluconeogenese statt, während sie bei hohen postprandialen Glucosespiegeln gehemmt wird [117,118].



**Abbildung 1.2.3: Glucosestoffwechsel im Hepatozyten**

**Dunkelblau:** Schritte spezifisch für die Glycolyse. **Dunkelrot:** Schritte spezifisch für die Gluconeogenese. **Violett:** Schritte, die in beide Richtungen von den gleichen Enzymen katalysiert werden.

**+**: Schritte, die von Insulin stimuliert werden. **-**: Schritte, die von Insulin gehemmt werden.

Unterbrochener Pfeil: Zwischenschritte sind nicht dargestellt.

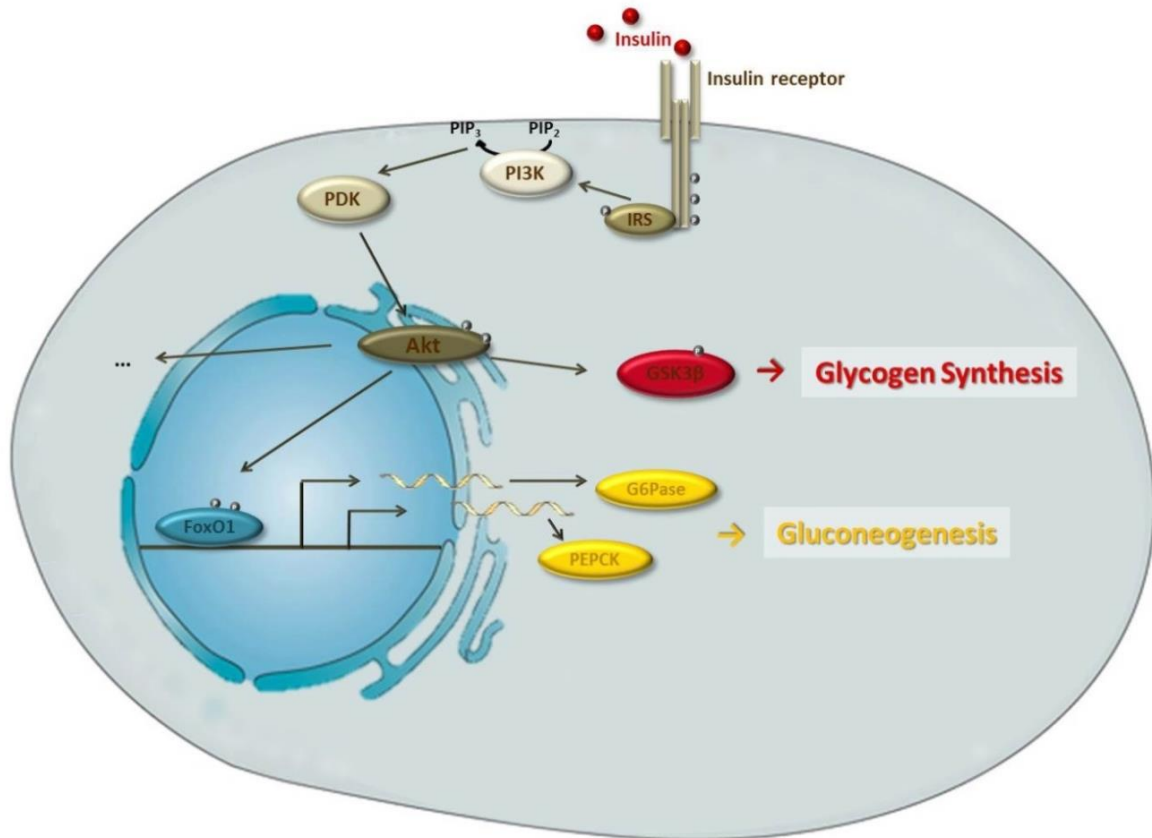
GLUT2: hepatischer Glucosetransporter, PFK: Phospho-Fructo-Kinase, Fru-1,6,P<sub>2</sub>ase: Fructose-1,6-Bisphosphatase, PEP: Phosphoenol-Pyruvat, PK: Pyruvatkinase, OAA: Oxalacetat, PEPCK: Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase

Insulin ist der dominante Botenstoff in der Regulation des hepatischen Glucosestoffwechsels [119]. Abbildung 1.2.4 zeigt den Insulin-Signalweg in Hepatozyten. Wie in allen Geweben wirkt Insulin auch auf Hepatozyten wachstumsstimulierend und fördert die Bildung von intrazellulären Nährstoffspeichern [120]. Bindet Insulin an den Insulin Rezeptor in der Zellmembran, wird eine Autophosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors induziert. Dies ermöglicht



die Bindung und Phosphorylierung von Insulin Rezeptor Substraten (IRS). Phosphorylierte IRS können ihrerseits PI3K aktivieren, ein Enzym, das in der Plasmamembran befindliches Phosphatidylinositol-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Phosphatidylinositol-Triphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) umwandelt.  $\text{PIP}_3$  aktiviert PDK, was seinerseits Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Akt phosphoryliert eine Vielzahl von Substraten zu denen auch GSK3 $\beta$  (Glycogensynthasekinase 3 beta) und Foxo1 (Forkhead box protein O1) gehören. GSK3 $\beta$  ist ein Inhibitor der Glycogensynthase. Durch Phosphorylierung wird er inaktiviert und die Glycogen Synthese wird induziert. Foxo1 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die Transkription der Gluconeogenese Schlüsselenzyme PEPCK und G-6-Pase verantwortlich ist. Wird er von Akt phosphoryliert so transloziert er vom Nucleus ins Zytoplasma wo er abgebaut wird. Die Gluconeogenese kommt folglich zum Erliegen. Auch der Lipidstoffwechsel wird von Insulin reguliert. Die Aktivierung von Akt führt über mTORC1 oder INSIG2 zur Induktion von SREBPs, die für die Expression von mehr als 30 Genen für die Aufnahme und Synthese von Lipiden verantwortlich sind [121,122].

Interessanterweise verliert Insulin seine Effekte auf den Lipidstoffwechsel auch in Insulin-resistenten Patienten nicht [123,124]. Hepatische Insulin Resistenz wird somit alleine als die nicht mehr stattfindende Hemmung der Gluconeogenese durch Insulin definiert [124,125].



**Abbildung 1.2.4: Insulin-Signalweg in Hepatozyten.**

Die Bindung von Insulin an den Insulin Rezeptor induziert die Autophosphorylierung der intrazellulären Untereinheit des Rezeptors. Dies führt zur Bindung und Phosphorylierung von Insulin Rezeptor Substraten (IRS) was wiederum zur Aktivierung der Phospho-Inositol-3-Kinase (PI3K) führt. Diese setzt Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Phosphatidylinositol-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) um. PIP<sub>3</sub> aktiviert die PIP<sub>3</sub>-abhängige Kinase (PDK), die ihrerseits die Proteinkinase Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Akt hat eine Vielzahl von Substraten zu denen auch die Glycogensynthase-Kinase β (GSK3β) und das Forkheadbox Protein O1 (Foxo1) gehören. GSK3β ist ein Inhibitor der Glycogensynthase. Durch seine Phosphorylierung wird sie inaktiviert und die Glycogen Synthese wird induziert. Foxo1 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die Transkription der Gluconeogenese Schlüsselenzyme PEPCK und G-6-Pase verantwortlich ist. Wird er von Akt phosphoryliert so transloziert er vom Nucleus ins Zytoplasma wo er abgebaut wird – die Gluconeogenese stoppt.

### 1.3. INSULIN RESISTENZ IN CHRONISCHER HCV INFEKTION

---

In einer Vielzahl von klinischen Studien wurde in Kohorten von CHC Patienten ein erhöhtes Auftreten von Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet. Eine Metaanalyse von 2005 ergab ein 68% bzw. 67% erhöhtes Risiko T2DM zu entwickeln in retrospektiven bzw. prospektiven Studien mit gesunden Patienten als Kontrollgruppe und ein 82% erhöhtes Risiko für HCV/HIV-coinfizierte Patienten im Vergleich zu HIV monoinfizierten Patienten [126]. Auch im Vergleich zu Patienten die chronische mit dem Hepatitis B Virus infiziert waren ist das Risiko für T2DM bei CHC-Patienten um 80% erhöht. T2DM ist durch Insulin Resistenz (IR) bestimmt, welche bereits viele Jahre vor der Manifestation des Diabetes entstehen kann [127,128]. Erst wenn die  $\beta$ -Zellen des Pankreas die verminderte Insulin Sensitivität der Gewebe nicht mehr durch erhöhte Insulinproduktion kompensieren können, kommt es zur klinischen Manifestation des Diabetes. Dieser ist definiert als das Auftreten von Nüchtern-Glucosespiegeln von  $\geq 126$  mg/dl [129]. Die Entstehung von IR und T2DM im Zusammenhang des Metabolischen Syndroms (Hypertonie, abdominale Fettleibigkeit, Dyslipidämie und IR) beruht auf komplexen und bislang nicht vollständig verstandenen systemischen Veränderungen [130,131]. Oxidativer Stress, „endoplasmic-reticulum-stress“ (ER-Stress), chronische Entzündung, Hyperglycämie und erhöhte Spiegel freier Fettsäuren werden als potenzielle Ursachen der T2DM-Entstehung diskutiert [130].

Auch in CHC Patienten geht dem T2DM eine IR voran, die häufig schon in frühen Stadien der Lebererkrankung und sogar in Patienten ohne Leberfibrose gemessen werden kann [132]. Die erhöhte Prävalenz von T2DM in CHC Patienten im Vergleich zu chronisch HBV infizierten Patienten deutet darauf hin, dass es sich nicht um einen Effekt der vorwiegend immunvermittelten Lebererkrankung bei chronischer HBV- oder HCV-Infektion handelt, sondern spezifisch durch HCV ausgelöst wird. Eine Studie, die die proinflammatorischen Cytokine in HCV Patienten mit und ohne T2DM verglich, bestätigte diese Annahme: Serumspiegel von IL-6 und TNF $\alpha$  zeigten keine Korrelation mit dem Auftreten oder Ausprägung der IR [133].

Geht man also davon aus, dass IR und T2DM bei HCV-infizierten Patienten direkt durch das Virus hervorgerufen werden, so müssten die ursächlichen Veränderungen in den Wirtszellen des Virus, den Hepatozyten, zu finden sein. Interessanterweise deuten Experimente mit Hunden, die induziert durch eine spezielle Diät IR entwickelten darauf hin, dass auch bei IR im Kontext des metabolischen Syndroms

der erste Schritt in der Entstehung einer systemischen IR eine hepatische IR sein könnte [134]. Eine Vielzahl an Daten aus Zellkulturexperimenten und aus Patientenmaterial bestätigt die Hypothese der direkten Interaktion von HCV mit dem Insulin Signalweg, allerdings teilweise mit gegensätzlichen Ergebnissen. He et al. zeigten beispielsweise bereits 2002 in HCV-NS5A-exprimierenden Hela Zellen eine erhöhte Akt-Phosphorylierung, die nach Etablierung des Zellkultur-Infektionsmodell auch in HCV-infizierten Hepatozyten bestätigt wurde, Aytug et al. beobachteten hingegen in Biopsiematerial eine verminderte Akt-Phosphorylierung [103,135–137]. Dieselbe Arbeit von Aytug et al. zeigt auch eine reduzierte Aktivierung des Insulin Rezeptor Substrats 1 (IRS1) trotz erhöhter IRS1 Expression, was eine Hemmung des Insulin Signalwegs durch HCV Proteine vermuten lässt [137]. Kawaguchi et al. publizierten ebenfalls aus Biopsiematerial stammende Ergebnisse, die eine verminderte Expression der IRS [138]. Experimente mit Zellenlinien und transgenen Mäusen derselben Publikation zeigen zudem, dass das HCV-core Protein zu einer Reduktion der IRS Expression und Akt-Phosphorylierung führen kann [138]. Die Reduktion der IRS Proteinmenge wurde auf den proteasomalen Abbau nach Ubiquitinierung durch von HCV-core aktiviertes „Suppressor of Cytokine Signaling 3“ (SOCS3) Protein zurückgeführt. Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte die SOCS vermittelte IRS-Degradation durch Genotyp 3 core-Protein. Core-Protein des Genotyps 1 führte zu einem mTOR vermittelten IRS Abbau [139].

Ein weiterer vorgeschlagener Mechanismus der Entstehung hepatozellulärer IR ist die Aktivierung des „proteasome activator 28gamma“ (PA28γ), ebenfalls durch HCV-core [28]. HCV-core transgene Mäuse entwickelten IR, die durch zusätzlichen PA28γ Knockout reversibel war.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass HCV einerseits ER-Stress induziert, ihn andererseits aber auch hemmt [96,140,141]. ER-Stress tritt auf, wenn die Kapazität des ERs Proteine zu Falten und zu modifizieren überfordert ist und es zur Akkumulation ungefalteter Proteine kommt. Über drei Sensormoleküle werden verschiedene Wege der sogenannten „unfolded protein response“ (UPR) eingeleitet, die zur Hemmung der Neusynthese zusätzlicher Proteine, zum Proteinabbau und Erhöhung der Kapazität des ERs führen und damit auf eine Wiederherstellung der normalen ER-Funktion abzielen. Kann dies nicht erreicht werden, so führt ER-Stress zu Apoptose [142]. Es erscheint plausibel, dass die Akkumulation der riesigen HCV Polyproteine bzw. die Umstrukturierung von ER-Membranen zu membranous web

Strukturen (s. Abschnitt 1.1.1) ER-Stress hervorrufen. Dadurch, dass HCV gleichzeitig ein andauerndes UPR-Signal verhindert, schützt das Virus seine Wirtszelle vor der Apoptose [96]. Wie oben erwähnt, wird ER-Stress als ein Faktor in der Entstehung von IR im Kontext des Metabolischen Syndroms diskutiert [130,143]. Als Mechanismus wird angenommen, dass eine Aktivierung der Stress-Kinase JNK die Insulin Rezeptor Substrate durch Phosphorylierung hemmt [143]. Tatsächlich gibt es Ergebnisse, die von HCV verursachten ER-Stress mit IR verknüpfen - allerdings durch andere Signalwege. Christensen et al. beschrieben, dass HCV-verursachter ER-Stress *in-vitro* Protein Phosphatase 2A (PP2A) hochreguliert [144]. Eine weitere Publikation derselben Gruppe zeigt später, dass Überexpression von PP2A *in-vitro* und im Mausmodell Akt hemmen und dadurch IR verursachen kann [145].

Interessanterweise kam in den letzten Jahren Kritik an der Art der Erfassung der IR in der Mehrheit an klinischen Studien auf, die die scheinbar sichere Datenlage der durch HCV verursachten hepatischen IR in Frage stellt. Vanni et al. führten an 14 chronisch HCV-infizierten und sieben gesunden Probanden hyperinsulinämische, euglycämische Clamps sowie Experimente mit markierter Glucose und markiertem Glycerol durch. Diese aufwändigen Messungen zeigten, dass bei CHC durchaus nicht nur hepatische, sondern auch periphere IR entsteht [146]. Die in der zuvor erwähnten Metaanalyse zusammengefassten Studien definierten diabetische Probanden in der Regel durch alleinige Messung von Blut-Glucose oder aufgrund der Einnahme von Diabetesmedikamenten oder vorheriger Diagnose durch einen privaten Arzt [126]. Selbst wenn die Diagnose durch einen privaten Arzt gestellt wurde, ist maximal von einem oralen Glucosetoleranztest (OGT) oder der Berechnung der HOMA-IR (nüchtern Glucose [mmol/L] x nüchtern Insulin [mU/L] / 22,5) auszugehen. Lam et al. verglichen die Ergebnisse der Diagnose durch derartige Surrogatmessungen mit den Ergebnissen durch die aufwändige Messung der tatsächlichen IR und kamen zu dem Ergebnis, dass vor allem für normalgewichtige CHC Patienten die Verwendung von Surrogatmesswerten zu falschen Ergebnissen führt [147]. Mukhtar et al. führten ebenfalls hyperinsulinämische, euglycämische Clamp Experimente, allerdings an einer deutlich größeren Kohorte von 102 nicht diabetischen CHC Patienten durch. In dieser Kohorte korrelierte die IR mit ethnischer Herkunft, BMI und anderen Wirtsfaktoren aber nicht mit viralen Faktoren [148].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl klinische als auch experimentelle Daten zeigen, dass HCV den Wirtsstoffwechsel verändert. Ob diese Veränderungen in ihrer Entstehung einer klassischen IR entsprechen bleibt fraglich und die zugrundeliegenden Mechanismen sind ungeklärt.

Ein besseres Verständnis der Vorgänge ist jedoch entscheidend, da IR und T2DM entscheidende Auswirkungen auf die Pathogenese der CHC haben [149]: IR und T2DM korrelieren mit verschlechtertem Ansprechen auf INFa Therapie, beschleunigter Fibrose und höherer HCC-Inzidenz [132,150–154].

## 1.4. ZELLDIFFERENZIERUNG VS. PROLIFERATION IN DER LEBER

---

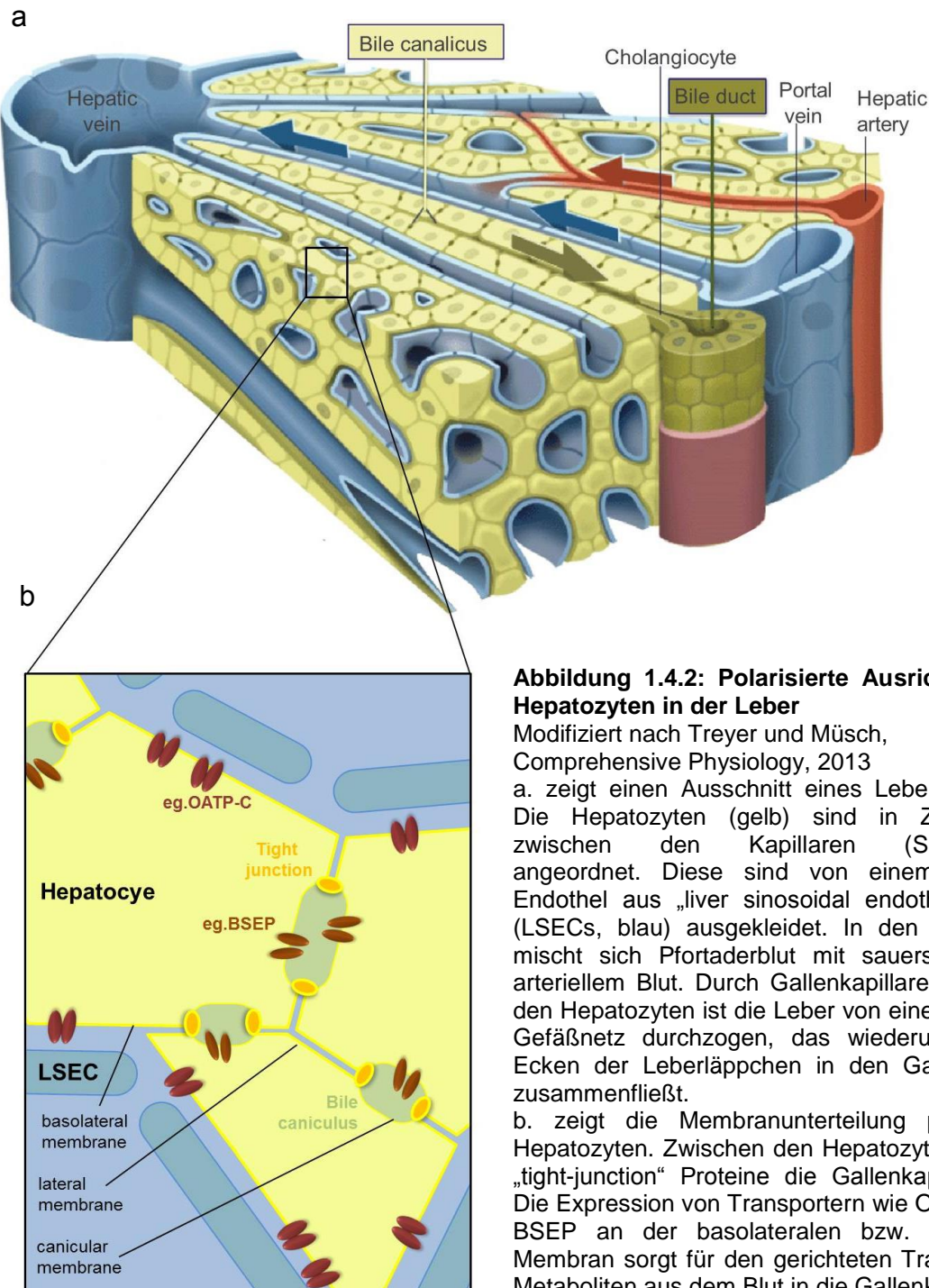
### 1.4.1. DIE DIFFERENZIERTE LEBERZELLE

Wie Epithelzellen, weisen differenzierte Hepatozyten eine polare Ausrichtung auf, d.h. ihre Membran ist in mehrere, funktional unterschiedliche Abschnitte unterteilt. Anders als typische Epithelzellen jedoch, die eine apikale, eine basale und eine laterale Seite besitzen, weisen Hepatozyten in der Regel zwei basale Seiten auf und die apikale Oberfläche verläuft wie ein Band um die Zelle [155] (Abb. 1.4.2).

Die basolaterale Hepatozytenmembran ist mit einer Vielzahl von Transportern zur Aufnahme und Abgabe von Metaboliten ausgestattet. Dazu gehören die leberspezifischen "organic anion transporting polypeptides" (OATPs: OATP-1B1, 1B3 und 2B1) und das „Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide“ (Ntcp) [156]. Beide sind für die Aufnahme von Gallensalzen aus dem Blut verantwortlich, die dann über Efflux Proteine wie MRP2 („multi drug related protein 2“) oder BSEP („bile salt export pump“) in der apikalen Membran in die Gallenkapillaren abgegeben werden [156]. Über dieselben Transporter wird neben Gallensalzen teilweise ein breites Spektrum an Metaboliten transportiert und über die Galle ausgeschieden [157]. Entsprechend des gerichteten Transports ist es nicht überraschend, dass die Expression der Transportmoleküle mit dem Entwicklungsstatus der Leber bzw. Polarisierungsstatus der Zellen korreliert und unpolarisierte Hepatozyten in Zellkultur die Expression reduzieren [158–160].

Auch die Expression vieler Stoffwechsellzyme wie PEPCK (Gluconeogenese) oder TDO (2,3-Tryptophandioxygenase, Aminosäurestoffwechsel) ist nicht nur spezifisch für Hepatozyten, sondern korreliert auch mit dem Differenzierungsstatus der Zellen [159,161].

Ein weiteres Merkmal der Differenzierung von Hepatozyten ist Polyploidie. Es wird angenommen, dass Polyploidie in der gesunden Leber eine terminale Differenzierung mit reduzierter Teilungsfähigkeit anzeigt [162].



**Abbildung 1.4.2: Polarisierte Ausrichtung der Hepatozyten in der Leber**

Modifiziert nach Treyer und Müsch, Comprehensive Physiology, 2013

a. zeigt einen Ausschnitt eines Leberläppchens. Die Hepatozyten (gelb) sind in Zellsträngen zwischen den Kapillaren (Sinosoiden) angeordnet. Diese sind von einem löchrigen Endothel aus „liver sinusoidal endothelial cells“ (LSECs, blau) ausgekleidet. In den Sinosoiden mischt sich Pfortaderblut mit sauerstoffreichem arteriellem Blut. Durch Gallenkapillaren zwischen den Hepatozyten ist die Leber von einem weiteren Gefäßnetz durchzogen, das wiederum an den Ecken der Leberläppchen in den Gallengängen zusammenfließt.

b. zeigt die Membranunterteilung polarisierter Hepatozyten. Zwischen den Hepatozyten grenzen „tight-junction“ Proteine die Gallenkapillaren ab. Die Expression von Transportern wie OATP-C und BSEP an der basolateralen bzw. canikulären Membran sorgt für den gerichteten Transport von Metaboliten aus dem Blut in die Gallenkapillaren.

Untersuchungen an Ratten zeigen während der Embryonalentwicklung, wie zu erwarten, eine hohe Zellteilungsrate der Hepatozyten. Dabei handelt es sich praktisch ausschließlich um diploide Zellen. Postnatal nimmt die Lebermasse weiter zu, jedoch ohne einen entsprechenden Anstieg an Zellteilungen [163]. Hypertrophie und Kernteilungen ohne anschließende Cytokinese führen zu einem Anstieg der polyploiden Zellen [164,165]. Im erwachsenen Menschen besitzen etwa 30-40% aller Hepatozyten zwei oder mehr Kerne [162]. Über den Vorteil unvollständiger



Zellteilungen und resultierender Polyploidie gegenüber vollständigen Mitosen herrscht noch Unklarheit. Ob Polyploidie die Verdopplung der biosynthetischen Kapazität ohne die eine aufwändige Neuorganisation der Membranen bedeutet oder aber nur die Folge einer reduzierten Teilungsfähigkeit ist wird kontrovers diskutiert [166].

#### 1.4.2. ZELLPROLIFERATION IN DER LEBER

Obwohl in der gesunden Leber aufgrund einer sehr hohen Lebensdauer der Hepatozyten (geschätzte Halbwertszeit von 6-12 Monaten) ein geringer Zell-„turnover“ herrscht, verlieren auch differenzierte Hepatozyten nie ihre prinzipielle Teilungsfähigkeit [167]. Dies führt zu einer außergewöhnlichen Regenerationsfähigkeit der Leber, die bereits der griechischen Sage von Prometheus zu entnehmen ist, der zu lebenslanger Qual verurteilt wurde, indem ein Adler jeden Tag ein Stück sein Leber aß, das jede Nacht aufs Neue nachwuchs. 1934 zeigten Higgins und Anderson, dass Ratten selbst nach Resektion von zwei Dritteln der Leber überleben und der zurückbleibende Teil innerhalb kurzer Zeit auf die ursprüngliche Größe der Leber anwächst [168]. Und tatsächlich ist die Leber selbst bei vielfacher Wiederholung der Hepatektomie immer wieder zur Regeneration in der Lage [169]. Die Größe, zu der die Leber wieder anwächst scheint hierbei nicht intrinsisch, sondern durch die Anforderung des Organismus bestimmt: Bei Lebertransplantationsexperimenten von großen in kleine Hunde nahm die Lebermasse ab, die transplantierte Leber eines Baboon Affen in einen Menschen wuchs auf die Größe einer humanen Leber an [170,171]. Anders als bei anderen Geweben wie z.B. der Haut, wo nur eine kleine Population von Stammzellen für die Regeneration des Gewebes zuständig ist, sind in der Leber praktisch alle Zellen an der Regeneration des Gewebes beteiligt [172]. Selbst bei einer Resektion von zwei Dritteln der Leber genügen damit weniger als zwei Zellzyklen um die ursprüngliche Zellzahl wiederherzustellen [173]. Voll funktionale Hepatozyten die den Zellzyklus verlassen hatten und in die G<sub>0</sub>-Phase übergegangen waren, müssen folglich dazu gebracht werden wieder in den Zellzyklus einzutreten. Die Serumspiegel einer Vielzahl von Signalmolekülen, darunter TNF, Noradrenalin, HGF, IL6, Gallensäuren, Hyaluronsäure, Serotonin und TGFβ<sub>1</sub>, zeigen einen Anstieg nach partieller Hepatektomie. Zudem gilt eine Beteiligung von EGF als gesichert: EGF ist aus

Tierexperimenten und Zellkultur als potentes Mitogen für Hepatozyten bekannt [172]. In Ratten wurde nach partieller Hepatektomie ein Anstieg von EGF in der Pfortader beschrieben [174]. Da Hepatozyten EGF äußerst effizient aufnehmen kann jedoch ein Anstieg praktisch nicht in der Peripherie gemessen werden [175]. Das genaue Zusammenspiel der benannten Signalmoleküle ist noch nicht sicher verstanden und wird in Referenz 157 diskutiert. Auf die Rolle einzelner, in der Leber wirkender oder in der Leber produzierter Wachstumsfaktoren, wird in folgenden Abschnitt 1.4.3 näher eingegangen.

### 1.4.3. WACHSTUMSFAKTOREN IN DER GESUNDEN UND KRANKEN LEBER

**Hepatozyten Wachstumsfaktor** (engl. hepatocyte growth factor, HGF):

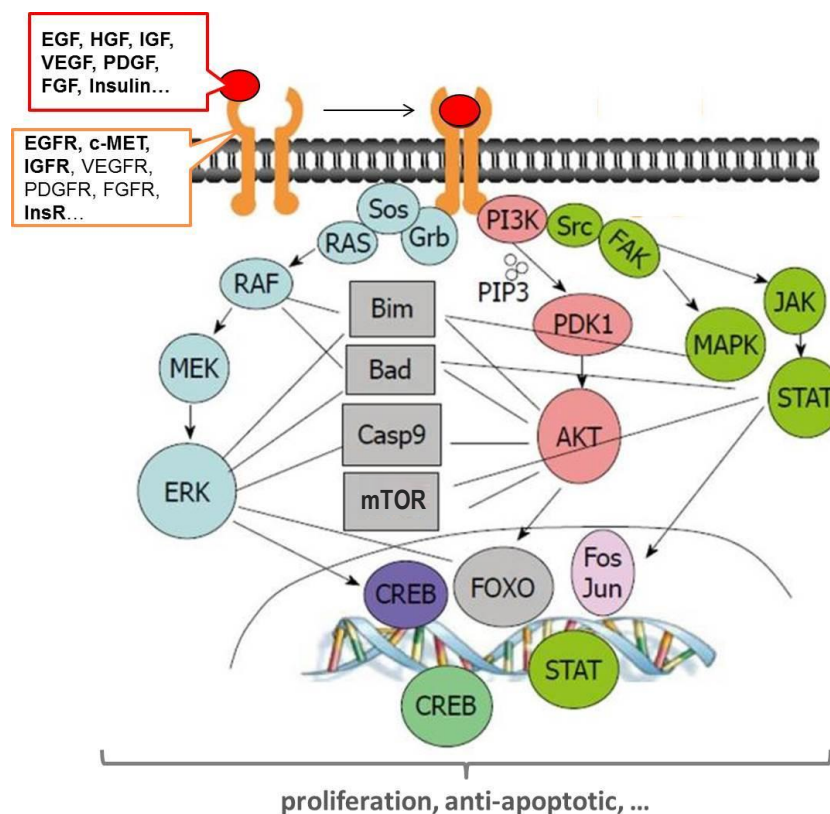
HGF wurde 1984 aus dem Blut von Ratten, die einer partiellen Hepatektomie unterzogen worden waren, isoliert und als die DNA-Synthese und Proliferation fördernder Hepatozyten-Wachstumsfaktor beschrieben [177]. Später zeigte sich, dass weder die mitogene Wirkung, noch die Produktion auf die Leber beschränkt sind: HGF wird vor allem von mesenchymalen Zellen (z.B. den Kupferzellen in der Leber) produziert und wirkt primär auf Epithel- und Endothel Zellen. Dort bindet es an den HGF-Rezeptor „c-MET“, der daraufhin autophosphoryliert und verschiedene Signalwege induziert, die zu Zellproliferation, Apoptose-Hemmung und Cytoskell-Veränderungen/Zellmotilität führen (Abb. 1.4.3). So ist HGF an der Epithel-Regeneration in Lunge, Niere, Darm und anderen Organen beteiligt. Obwohl bei einem Anstieg der Serum-Spiegel alle Organe HGF ausgesetzt sind, erfolgt nur in geschädigten Organen eine Aktivierung von c-MET. Wie dies zustande kommt ist noch nicht geklärt [178].

Während der Organentwicklung ist c-MET auch in Parenchymzellen vieler Organe exprimiert. Unter anderem für Leber, Niere, Lunge, Darm, Muskel- und Nervengewebe, Brustdrüsen, Plazenta wurde eine Rolle von HGF in der Organentwicklung gezeigt [178].

In der Leber induziert HGF die Proliferation von Hepatozyten, LSECs und Cholangiozyten [179]. Erhöhte Serum-HGF-Spiegel nach Leberschädigung sind offensichtlich sowohl auf erhöhte lokale Produktion durch Kupferzellen, als auch auf Produktion durch entfernte Organe (Lunge, Leber und Milz) zurück zu führen.

Interessanterweise ist letzteres vor allem nach partieller Hepatektomie zu beobachten, wohingegen bei akuter Hepatitis, verursacht durch Toxine oder Viren, die intrahepatische HGF Produktion dominiert [178].

HGF wirkt nicht nur anti-apoptotisch, es sorgt zudem für die Aufrechterhaltung der Funktionalität der Zellen. Im Hepatozyten induziert HGF beispielweise die Albumin-Produktion [180]. Außerdem wirkt es anti-fibrotisch und, durch die Hemmung verschiedener Immunzellen, anti-inflammatorisch [178]. Bei andauernder Organschädigung nehmen HGF Expression und die von ihm induzierten regenerativen Prozesse jedoch nach und nach ab [178].



**Abbildung 1.4.3: Wachstumsfaktor-aktivierte Signalwege**

Angepasst nach Fang, World Journal of Molecular Genetics, 2011

Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factors (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) oder auch Insulin aktivieren über die jeweiligen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (...-R) die drei gemeinsame Signalwege: Den PI3K/AKT-Signalweg (rot), den RAS/RAF/MAPK-Signalweg (blau) und den SRC/JAK/STAT-Signalwege (grün). Durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB, FOXO, Fos/Jun oder STAT) und andere Regulatorische Proteine (z.B. Bim, Bad, Casp9, mTOR) wirken sie allgemein pro-proliferativ und anti-apoptotisch.

Im Zusammenhang mit der hier präsentierten Arbeit ist interessant, dass in den vergangenen Jahren zunehmend eine Rolle von HGF im Glucosestoffwechsel, Wechselwirkungen mit Insulin und eine Assoziation mit dem metabolischen Syndrom deutlich wurde: Bertola et al. beschrieben 2007 eine erhöhte Glucoseaufnahme in HGF behandelten Adipozyten [181]. 2008 zeigten Perdomo und Kollegen, dass HGF in Skelettmuskelzellen, durch erhöhte Expression der Glucosetransporter GLUT4 in der Plasmamembran, die Glucoseaufnahme steigern kann [182]. Gleichzeitig wurde in den untersuchten Zellen eine Hemmung der Lipid-Oxidation beobachtet, womit die Effekte von HGF den seit langem bekannten Effekten von Insulin auf Skelettmuskelzellen entsprachen. Bereits zuvor war bekannt, dass HGF die Insulin-Sekretion durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas stimuliert [183,184]. HGF scheint also sowohl den Insulinspiegel zu erhöhen, als auch selbst Insulin-ähnliche Wirkung auf manche Zellen zu haben. Eine aktuelle Publikation über die Wirkung von HGF auf den Glucosestoffwechsel der Leber zeigt, dass der HGF-Rezeptor c-MET in der Hepatozyten sogar Dimere mit Insulin Rezeptor-Untereinheiten bildet und HGF so direkt den Insulin-Signalweg aktivieren kann [185]. De Courteen et al. zeigten in Hyperinsulinämischen-Clamp-Versuchen, dass Insulin seinerseits in negativer Rückkopplung die HGF Freisetzung hemmen kann [186]. Dieses Gleichgewicht scheint bei Übergewicht verloren zu gehen: Eine Querschnittsstudie korrelierte die Serum-HGF-Werte von knapp 1500 Probanden mit Parametern wie Blutdruck, Hüftumfang, Nüchtern-glucose, Seruminsulin, Blutlipiden u.a. und beobachtete eine positive Korrelation der HGF-Spiegel mit allen vier Faktoren des Metabolischen Syndroms [187]. Erhöhte HGF-Spiegel in übergewichtigen Personen, von denen angenommen wird, dass sie durch erhöhte HGF-Produktion durch Adipozyten entstehen, konnten, in den zuvor erwähnten Versuchen von Courteen et al., nicht durch Insulin gesenkt werden [186,188].

Im Hinblick auf die Entstehung von HCC bei CHC-Patienten ist außerdem zu erwähnen, dass HGF im Gegensatz zu den proliferativen Effekten in beschädigten Organen, auf isolierte Tumorzellen oder Tumorzelllinien wachstumshemmend wirkt [189,190]. Entsprechend ist die Expression von HGF in Tumorzellen im Vergleich zum umliegenden Gewebe reduziert. Erstaunlicherweise wurde jedoch eine erhöhte Expression des Rezeptors c-MET in HCC beschrieben und Überexpression von c-MET führte im Tiermodell zur Tumorentwicklung. Trotzdem zeigte der Einsatz von c-MET-Inhibitoren bislang nur schwache Effekte in der Therapie von HCC [191].

### **Epidermaler Wachstumsfaktor**

(engl. epidermal growth factor, EGF):

EGF wurde 1962 erstmals von Stanley Cohen aus Speicheldrüsen von Mäusen isoliert und in seiner Wirkung auf die Augenentwicklung beschrieben [192]. Bald zeigte sich, dass EGF im Menschen sowohl in Speicheldrüsen produziert wird und die Magensäureproduktion hemmt als auch in den Brunnerschen Drüsen des Duodenums gebildet wird und für die Proliferation und Differenzierung des Intestinums entscheidend ist [193]. Mit der Zeit wurde eine proliferative Wirkung von EGF auf eine Vielzahl von Zelltypen festgestellt [175]. Wie HGF wirkt auch EGF durch Bindung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase und daran angeschlossene Signalwege [194] (Abb. 1.4.3).

Wie zuvor erwähnt ist EGF aus Tierexperimenten und Zellkultur als starkes Mitogen für Hepatozyten beschrieben. Als solches ist es entscheidend für die Leberregeneration, steht aber auch in Zusammenhang mit der Entstehung von HCC [195,196]. Die Überexpression von EGF in Mäusen führt zur Entstehung von Lebertumoren in 100% der Tiere [197]. Mutationen im EGF-Rezeptor-Gen sind mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert und EGF-Rezeptor-Antikörper, die zur Internalisierung und Degradation des Rezeptors führen, werden in der Therapie entsprechender Tumoren erfolgreich eingesetzt [194].

### **Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren 1 und 2**

(engl. insulin-like growth factor, IGF)

IGF1 und -2 ähneln, wie ihr Name impliziert, in vieler Hinsicht Insulin. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit der Moleküle kann Insulin teilweise an IGF-Rezeptoren binden und umgekehrt [198]. Auch der IGF-Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und aktiviert die drei für diese Moleküle typischen, in Abb. 1.4.3 dargestellten, Signalwege.

Eine Vielzahl von Zellen ist zur IGF1-Produktion in der Lage, der größte Anteil wird aber, stimuliert durch Wachstumshormon, in der Leber synthetisiert. Obwohl IGF1, Entsprechend der gemeinsamen Signalwegeweise, wirkt IGF1 wie EGF, HGF oder auch Insulin vor allem proliferativ und anti-apoptotisch. Dennoch sind eine reduzierte IGF1 Expression im Tumorgewebe und erniedrigte IGF1-Spiegel im Serum, bei Patienten mit HCC beschrieben [199–201].

IGF2 spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine Rolle wo es ebenfalls vorwiegend in der Leber produziert wird. Auch später stammt IGF2 vorwiegend aus der Leber und die progressive Abnahme der Leberfunktion bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung ist mit reduzierten Serum-IGF2-spiegeln korreliert. Lebertumorzellen wiederum produzieren teilweise große Mengen an IGF2 [201]. Im Zusammenhang der hier präsentierten Arbeit ist interessant, dass erhöhte IGF2-Spiegel bei Patienten mit IGF2-produzierenden Tumoren zu Hypoglycämie durch erhöhte periphere Glucoseaufnahme zu führen scheinen [202–204].

Die Effekte von IGF1 und -2 werden von verschiedenen IGF-Bindungsproteinen (IGFBP1-6) moduliert. Diese werden ebenfalls von der Leber aber auch von anderen Organen synthetisiert, verlängern die Halbwertszeit der Wachstumsfaktoren und erhöhen oder erniedrigen ihre Wirksamkeit [201].

### **Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$**

(engl. Transforming Growth Factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )

Die allgemeine Wirkungsweise, sowie die Rolle von TGF $\beta$  in chronischen Lebererkrankungen und HCC sind in Quellen 206 und 207 zusammengefasst. TGF $\beta$  ist ein antiproliferatives Cytokin und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung. Es führt seine Effekte über zwei Signalwege aus: Über den kanonischen Signalweg aktiviert TGF $\beta$  nach Bindung an den TGF $\beta$ -Rezeptor sogenannte smad-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren die Expression mehrerer hundert Gene regulieren. Über nicht-kanonische Signalwege kann TGF $\beta$  auch in Akt-, Wnt-, Notch-, NF $\kappa$ B- und MAP-Kinase-Signalwege d.h. in die zuvor beschriebenen Signalwege von beispielsweise EGF, HGF oder IGF eingreifen.

Grundsätzlich wirkt TGF $\beta$  als Tumorsuppressor. Fortgeschrittene Tumorzellen zeigen jedoch häufig Resistenz gegenüber den anti-proliferativen bzw. pro-apoptotischen Effekten des Cytokins. TGF $\beta$  kann dann sogar pro-onkogen wirken. In verschiedenen Tumoren, darunter auch HCC, wurde eine erhöhte TGF $\beta$  Expression beschrieben. Etwa 25% aller HCCs weisen jedoch eine Reduktion des TGF $\beta$ -Rezeptors auf. In diesen Fällen wirkt TGF $\beta$  in der Regel weiterhin als Tumorsuppressor.

Auf der anderen Seite kann TGF $\beta$  auch zur Entstehung von Leberfibrose beitragen. TGF $\beta$  kann Hepatozyten nicht nur in der Teilung hemmen, sondern auch ihre Apoptose induzieren. Freigewordener Raum wird von hepatischen Ito-Zellen, die

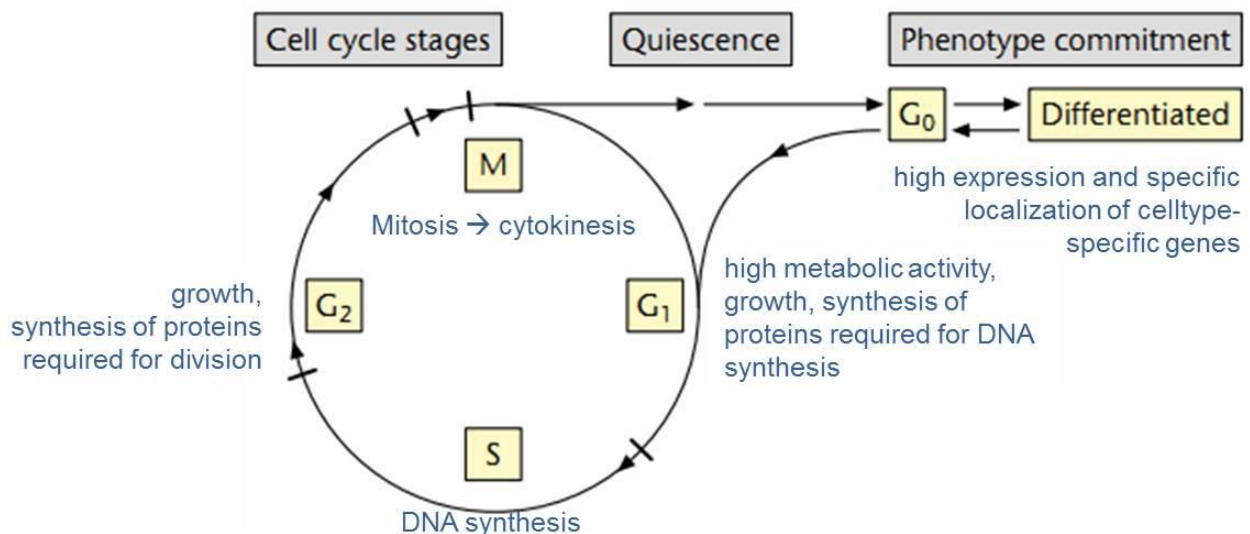
weniger sensitiv gegenüber TGF $\beta$  zu sein scheinen, mit unfunktionalem Bindegewebe und extrazellulärer Matrix aufgefüllt.

#### 1.4.4. ZELLULÄRER DIFFERENZIERUNGSSTATUS UND VIRALE INFESTIONEN

Da Viren um sich zu vervielfältigen auf „Material“ und „Werkzeug“ ihrer jeweiligen Wirtszelle angewiesen sind, können jegliche Veränderungen in den Zellen die Replikation der Viren positiv oder negativ beeinflussen. Innerhalb desselben Zelltyps trifft das Virus, je nachdem ob sich die Zelle in Proliferation befindet oder ausdifferenziert ist, völlig unterschiedliche zelluläre Bedingungen an (Abb. 1.4.3). Dabei finden sich zwischen verschiedenen Viren große Unterschiede, sowohl in den Schritten des viralen Replikationszyklus, die auf bestimmte Zellzyklusphasen oder Differenzierungsstadiums der Wirtszellen angewiesen sind, als auch darin, welche Zellzyklusphasen oder Differenzierungsstadien günstig oder nachteilig für das jeweilige Virus sind: HBV beispielweise ist nur zur Infektion von differenzierten Hepatozyten in der Lage. Nur hier ist die Expression des als HBV-Rezeptor fungierenden Gallensäuretransporters und von hepatozyten-spezifischen Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von HBV-Proteinen nötig sind, gegeben [207,208]. Humanes Cytomegalovirus (HCMV) kann Zellen zwar in jeder Phase des Zellzyklus infizieren, die virale Genexpression kann jedoch nur in G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub>-Phase beginnen [209]. Bei humanen Papyloviren (HPV) wiederum, ist der Schritt der Produktion von Viruspartikeln vom Differenzierungsstatus der Wirtszellen (Keratinocyten) abhängig [210]. Im Falle von HIV hemmt Polarisierung von Makrophagen die produktive Infektion, wobei Polarisierung zu M1-Makrophagen (cytotoxische Wirkung) zu schlechter Infizierbarkeit führt, während Polarisierung zu M2-Makrophagen (anti-inflammatorisch) die Replikation und Virusbildung hemmt [211].

In ihrer Koevolution mit dem Menschen entwickelten Viren Mechanismen, um in ihren Wirtszellen die für sie günstigen Bedingungen zu induzieren. Vielen Viren gelingt es den Stoffwechsel der Zelle zu ihren Gunsten zu verändern [212]. Auch ein Eingreifen in Differenzierungsstatus und Zellzyklus ist häufig zu finden. Adeno- und Papillomaviren interagieren mit Regulatorproteinen des Zellzyklus und treiben Zellen so in die S-Phase, vermutlich um ihre eigene Replikation zu begünstigen [213].

HCMV Infektion führt zu „Pseudomitosen“, zellulären Veränderungen die sonst nur während der Mitose vorkommen, hier aber nicht zur Zellteilung führen [214]. Auch RNA-Viren greifen häufig in den Zellzyklus ein: Das murines Coronavirus MHV (mouse hepatitis virus) führt zu einem  $G_0/G_1$ -Phase Arrest, das Vogel-Coronavirus IBV (infectious bronchitis virus) zu einem  $G_2/M$ -Phase Arrest [215,216].



**Abbildung 1.4.3: Zellzyklusphasen und Differenzierungsstatus schaffen unterschiedliche Voraussetzungen für virale Infektion und Replikation**

Quelle: Biology-Library, „Principles of Cell Cycle Regulation“

Auch HCV ist vom Zellzyklus seiner Wirtszellen beeinflusst und greift möglicherweise aktiv in ihn ein. Obwohl das Virus spezifisch Hepatozyten infiziert, scheint sich ein hoher Differenzierungsstatus mit dem assoziierten Wachstumsstopp nachteilig auf seine Replikation auszuwirken. Proliferierende Huh7.5 Hepatomazellen sind zu 100% infizierbar und setzen große Mengen an infektiösem Virus frei. Nach wenigen Tagen jedoch, wenn die Zellen Konfluenz erreichen, reduziert sich die Freisetzung infektiöser Viren dramatisch [217]. Stabile Expression des HCV NS2 Proteins in Hela oder Vero Zellen führte in diesen Zellen zum S-Phase Arrest [218]. Scholle et al. untersuchten Veränderungen des Zellzyklus in Huh7 Zellen, die Vollängen HCV RNA replizierten und somit das gesamte HCV Polyprotein exprimierten [219]. Sie



sahen keine Veränderung im Zellzyklus durch HCV, beobachteten aber eine Reduktion der viralen RNA-Replikation in schwach proliferierenden Zellen und einen Anstieg in S-Phase Zellen. Zusammen deutet dies darauf hin, dass die HCV Replikation in proliferierenden Zellen bzw. in S-Phase Zellen die günstigsten Bedingungen für die virale RNA-Replikation herrschen, was insofern überraschend ist, als HCV im Menschen wachstumsarretierte differenzierte Hepatozyten infiziert. Verbesserte Modelle sind nötig, um Effekte von HCV auf Zellproliferation bzw. Zellzyklusphasen untersuchen zu können.

## 1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

---

Chronisch HCV-infizierte Patienten haben ein mehr als 60% erhöhtes Risiko T2DM zu entwickeln [126]. T2DM ist durch IR gekennzeichnet, d.h. der Körper des betroffenen Patienten reagiert nicht mehr angemessen auf Insulin und es kommt zu erhöhten Glucose- und Insulinspiegeln im Blut [220]. Dabei kann die Resistenz sowohl in der Peripherie, mit reduzierter insulinstimulierter Glucoseaufnahme in Muskel- oder Fettgewebe, also auch in der Leber beginnen [220–222]. Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung konstanter Blutglucosespiegel, indem sie bei hohen Glucosespiegeln große Mengen an Glucose speichert, bei Nahrungskarenz hingegen durch Glycogenolyse und Gluconeogenese Glucose ins Blut abgibt. IR der Leber äußert sich in mangelhafter Unterdrückung der Gluconeogenese durch Insulin, durch die es ebenfalls zu erhöhten Glucosespiegeln im Blut kommt [125]. Aufgrund der Leberspezifität von HCV wird angenommen, dass eine hepatozelluläre IR Ursache der Entwicklung von T2DM bei CHC ist, die zugrundeliegende Mechanismen sind aber noch nicht vollständig geklärt [223]. Ein besseres Verständnis der Vorgänge ist jedoch entscheidend, da IR und T2DM entscheidende Auswirkungen auf die Pathogenese der CHC haben [149]: IR und T2DM korrelieren mit verschlechtertem Ansprechen auf  $\text{INF}\alpha$  Therapie, beschleunigter Fibrose und höherer HCC-Inzidenz [132,150–154].

Die Erforschung von HCV und durch HCV verursachten Veränderungen im infizierten Menschen ist stark durch die verfügbaren Modelle limitiert. Seit es Wakita et al. 2005 gelang, mit einem HCV-Isolat aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis, Huh7 Zellen produktiv zu infizieren, wird dieses Modell bzw. seine Modifikationen weltweit verwendet [85,224]. Als proliferierende Tumorzellen unterscheiden sich Huh7 Zellen jedoch in vielerlei Hinsicht stark von den wachstumsarretierten, polarisierten Zellen, die HCV in einer gesunden Leber infiziert. Die Aussagekraft von mit diesem Modell erhaltenen Ergebnissen über die Situation im infizierten Menschen ist somit fraglich, vor allem wenn Effekte des Virus auf die Wirtszelle untersucht werden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, ein Zellkulturmodell zu etablieren, das den typischen Metabolismus von Hepatozyten und den Aspekt der Chronizität wiedergespiegelt und in diesem Modell die Mechanismen der Insulin Resistenz in chronischer HCV-Infektion zu untersuchen.

## 2. ERGEBNISSE

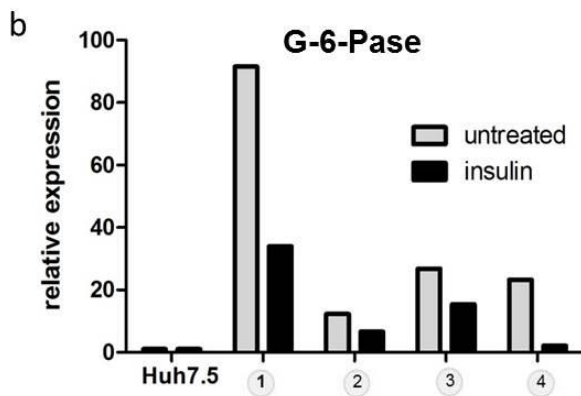
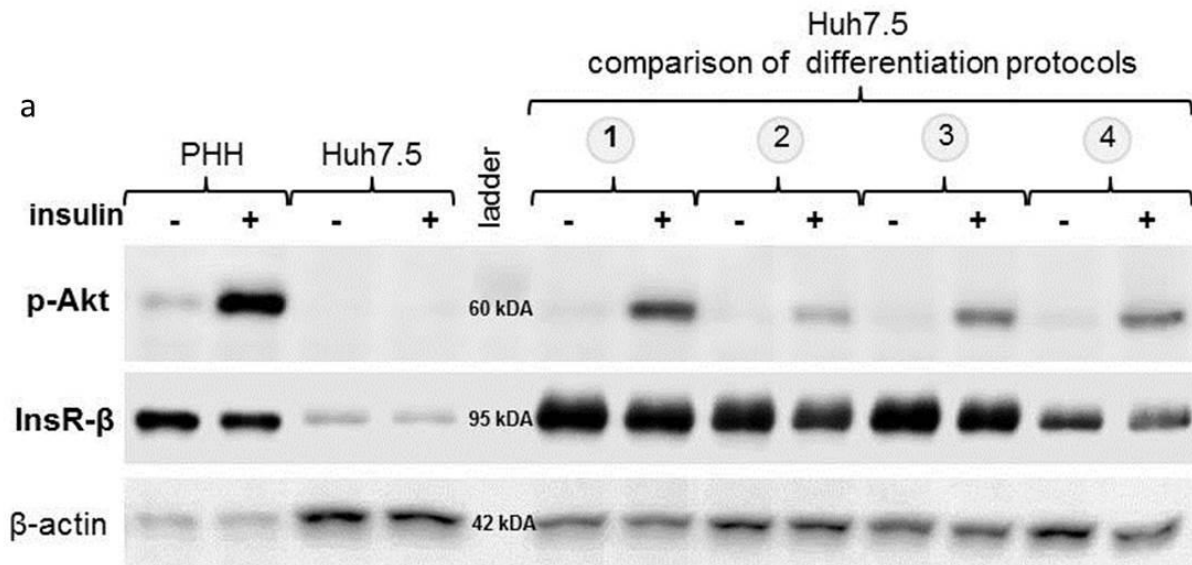
---

---

### 2.1. ETABLIERUNG EINES MODELLS ZUR UNTERSUCHUNG VON VERÄNDERUNG IM STOFFWECHSEL VON HEPATOZYTEN

---

Um Veränderungen im Stoffwechsel von Hepatozyten bei chronischer HCV-Infektion untersuchen zu können, war zunächst die Etablierung eines Zellkultursystems nötig, in dem der hepatische Insulin-Signalweg funktional exprimiert war. Wie zuvor beschrieben, kommt es in Hepatozyten nach Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor zur Autophosphorylierung der intrazellulären  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors, was die Bindung und Aktivierung von Rezeptor Substraten ermöglicht. Diese können daraufhin PI3K aktivieren, was  $PIP_2$  in  $PIP_3$  umwandelt.  $PIP_3$  aktiviert PDK, was seinerseits Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Akt inaktiviert den Transkriptionsfaktor Foxo1, der für die Expression der Gluconeogenese-Schlüsselenzyme PEPCK und G-6-Pase verantwortlich ist. Inaktiviertes Foxo1 verlässt den Nucleus und stoppt damit die Gluconeogenese (siehe auch Abb. 1.2.4). Anforderungen an das Modell waren daher 1.) gute Expression des Insulin Rezeptors, 2.) Aktivierbarkeit von Akt durch Insulin, 3.) Foxo1-Translokation nach Insulinstimulation und 4.) Regulation von PEPCK und G-6-Pase durch Insulin. Ausgangspunkt der Experimente war aufgrund ihrer guten Infizierbarkeit mit HCV die Hepatomazelllinie Huh7.5 [84]. Abbildung 2.1.1 zeigt, dass undifferenzierte Huh7.5 Zellen im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten (PHHs) eine niedrige Protein Expression des  $InsR\beta$  und kaum Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Insulin aufwiesen (Abb. 2.1.1a). Auch die ebenfalls sehr niedrige mRNA Expression des Gluconeogenese-Schlüsselenzyms G-6-Pase zeigte keine Regulation durch Insulin (2.2.1b). Vier Protokolle (etabliert in Vorexperimenten mit verschiedenen Mediumzusätzen, die in unserem Labor zur Differenzierung von HepaRG Zellen und zur Kultivierung von PHHs verwendet werden) wurden auf eine mögliche Verbesserung der Expression und Regulierbarkeit von  $InsR\beta$ , Akt und G-6-Pase getestet. Alle vier Protokolle führten zu einer erhöhten Expression von  $InsR\beta$  und einer erhöhten Expression bzw. Insulin-Regulierbarkeit von Akt und G-6-Pase. Bezogen auf alle drei Parameter führte Protokoll 1 zum stärksten Anstieg. Dieses Protokoll wurde daher für die weiteren Versuche ausgewählt.



**Abbildung 2.1.1: Etablierung eines Modells zur Untersuchung des Insulin Signalwegs in Huh7.5 Zellen**

Huh7.5 Zellen wurden mit verschiedenen Protokollen differenziert (s.u.) und mit undifferenzierten Huh7.5 Zellen und PHHs verglichen. Alle Zellen wurden 24 h ohne Insulin und FCS kultiviert und anschließend mit 100 nM Insulin (in ebenfalls Insulin- und FCS-depletiertem Medium) bzw. dem entsprechenden Kontrollmedium ohne Insulin behandelt.

- a.) Nach 8 min Insulinstimulation wurden Proteinlysate hergestellt und p-Akt (Ser473) sowie InsR-β im Westernblot, mit β-Aktin als Ladungskontrolle, untersucht.  
 b.) Nach 16 h Insulinstimulation wurde die G-6-Pase Expression in quantitativer RT-PCR, relativ zu B2, gemessen und auf die Expression in unbehandelten, undifferenzierten Zellen normalisiert.

Differenzierungsprotokolle:

- (1): 3 Wochen Kultivierung in Medium A ohne DMSO
- (2): 2 Wochen Kultivierung in Medium A und Medium B gemischt zu gleichen Teilen, 1 Woche Kultivierung in Medium A und Medium B gemischt zu gleichen Teilen ohne DMSO
- (3): 3 Wochen Kultivierung in Medium A und B gemischt zu gleichen Teilen ohne DMSO
- (4): 3 Wochen Kultivierung in Medium A und B gemischt zu gleichen Teilen

PHH: Primäre humane Hepatozyten, isoliert von der chirurgischen Klinik und Polyklinik Großhadern, im Rahmen der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR (Human Tissue and Cell Research), Behandlung nach 3 Tagen in Kultur in Medium A  
 Huh7.5: proliferierende, 90% konfluente Huh7.5 Zellen

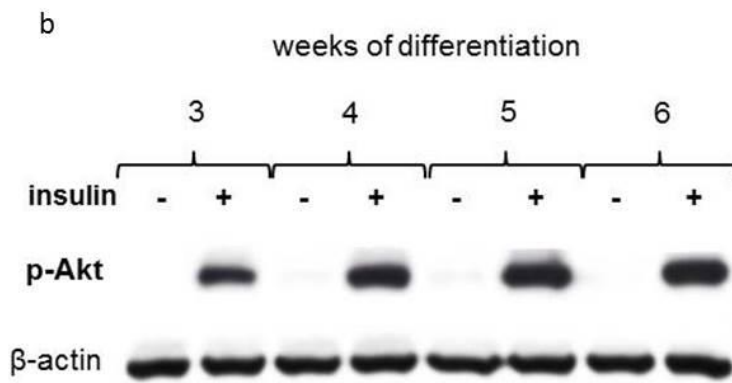
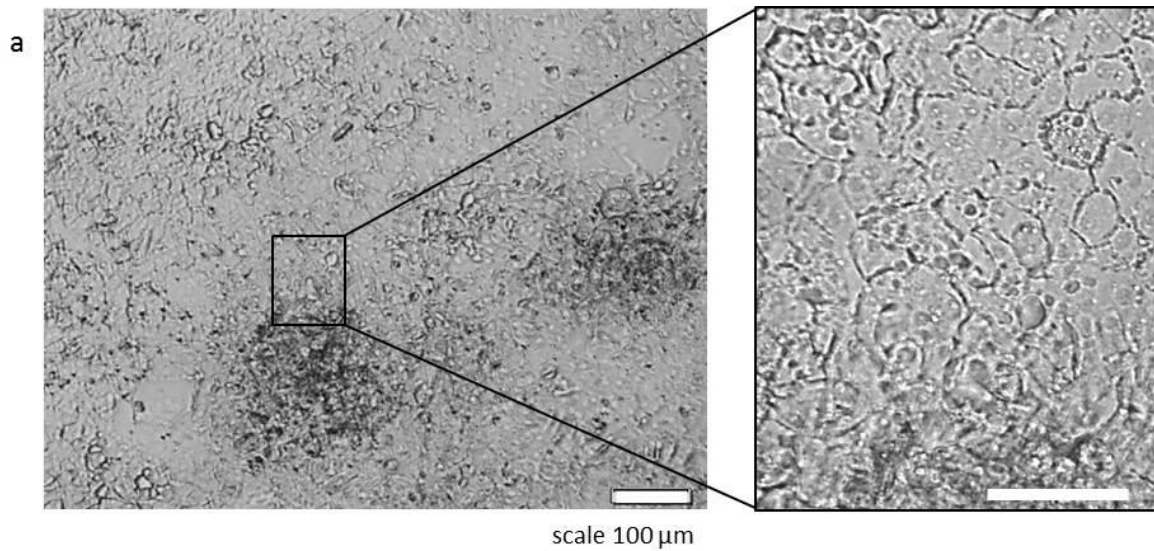
Medium A: Williams E Medium, 500ml, versetzt mit 6 ml 5% Glucose, 11,5 ml 1M HEPES pH 7,5, 5,6 ml L Glutamin (200 mM), 2,8 ml Penicillin/Streptavidin (10000 I.U./ml bzw 10000 µg/ml), 320 µl Insulin (155 nM), 280 µl Inosin (25 mg/ml), 8,7 ml DMSO, 600 µl Hydrocortison (5,5 µg/ml), 25 ml FCS

Medium B: DMEM Medium, 500ml, versetzt mit 5 ml ml Penicillin/Streptavidin (10000 I.U./ml bzw. 10000 µg/ml), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml NEAA (100x), 5 ml Na Pyruvat, 25 ml FCS.

Abb. 2.1.2a zeigt den Zellkulturphänotyp nach drei Wochen Kultivierung mit Protokoll 1. Morphologisch war ab drei Wochen keine Veränderung der Zellen mehr zu beobachten, eine Kinetik zeigte jedoch, dass die Akt-Aktivierung durch Insulin nach vier Wochen im Vergleich zu drei Wochen nochmals zunahm und erst dann stagnierte (Abb. 2.1.2b). Im Folgenden wurden die mit Protokoll 1 für vier Wochen differenzierten Zellen (=Huh7.5diff), im Vergleich zu proliferierenden Huh7.5 Zellen, weiter charakterisiert.

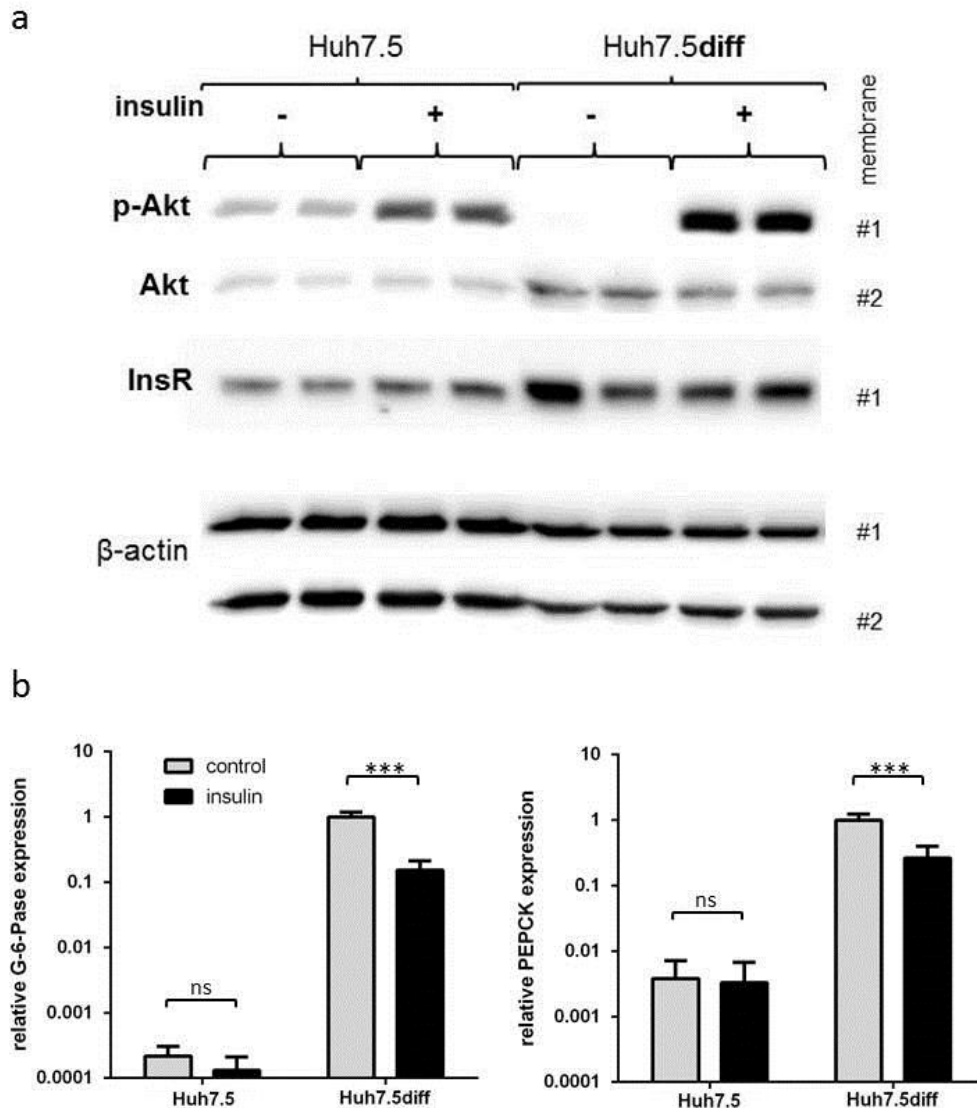
Westernblot-Analysen zeigten, dass Akt in Huh7.5diff nicht nur verstärkt durch Insulin aktiviert werden konnte, sondern dass auch ein Anstieg der Proteinexpression vorlag (Abb. 2.1.3a). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Analyse der Expression und Regulation des für die Expression der Gluconeogenese-Enzymen verantwortlichen Transkriptionsfaktors Foxo1: In proliferierenden Huh7.5 Zellen war die Expression von Foxo1 niedrig (Abb. 2.1.4) und Foxo1 war auch ohne Insulin nicht im Nukleus detektierbar. In Huh7.5diff hingegen war ohne Insulin eine klare nukleäre Foxo1-Färbung und eine Translokation ins Cytoplasma nach Insulin-Stimulation zu beobachten. Für die an der Gluconeogenese beteiligten Enzyme PEPCK und G-6-Pase war ein etwa 300facher bzw. 4000facher Anstieg der mRNA-Spiegel im Vergleich zu proliferierenden Huh7.5 Zellen zu sehen. Die Expression beider Enzyme ließ sich durch Insulin signifikant reduzieren (85% Reduktion von G-6-Pase, 74% Reduktion von PEPCK). In undifferenzierten Zellen war keine Reduktion der Expression durch Insulin messbar (Abb. 2.1.3b).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Abschnitts, dass in undifferenzierten Huh7.5 Zellen die Expression des Typischen hepatozellulären Insulinsignalwegs niedrig und seine Regulierbarkeit durch Insulin unvollständig ist. Mit Protokoll 1 differenzierte „Huh7.5diff“ Zellen erfüllten alle Anforderungen die an das Modells zur Untersuchung von Veränderung im Stoffwechsel von Hepatozyten gestellt worden waren in dem sie gute Expression des Insulin Rezeptors, Aktivierbarkeit von Akt durch Insulin, Foxo1-Translokation nach Insulin-Stimulation und Regulation von PEPCK und G-6-Pase durch Insulin zeigten.



**Abbildung 2.1.2: Maximale Differenzierung von Huh7.5 Zellen nach 4 Wochen**

a.) zeigt ein Hellfeldbild des Zellkulturphänotyps von Huh7.5diff Zellen nach 3 Wochen.  
 b.) zeigt die Insulin induzierte Akt Phosphorylierung nach 3, 4, 5 bzw. 6 Wochen Differenzierung mit Protokoll 1. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen für 24h mit Depletionsmedium ohne Insulin, Glucose und FCS behandelt. Anschließend wurden die Zellen, ebenfalls in Depletionsmedium, für 8 min mit Insulin stimuliert (+) oder mit Kontrollmedium ohne Insulin behandelt (-). Es wurden Gesamtzell-Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf p-Akt (Ser473) untersucht. β-Aktin diente als Ladungskontrolle.

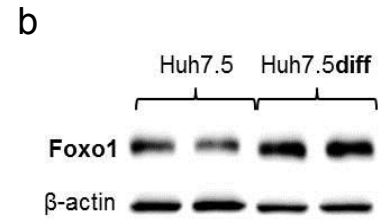
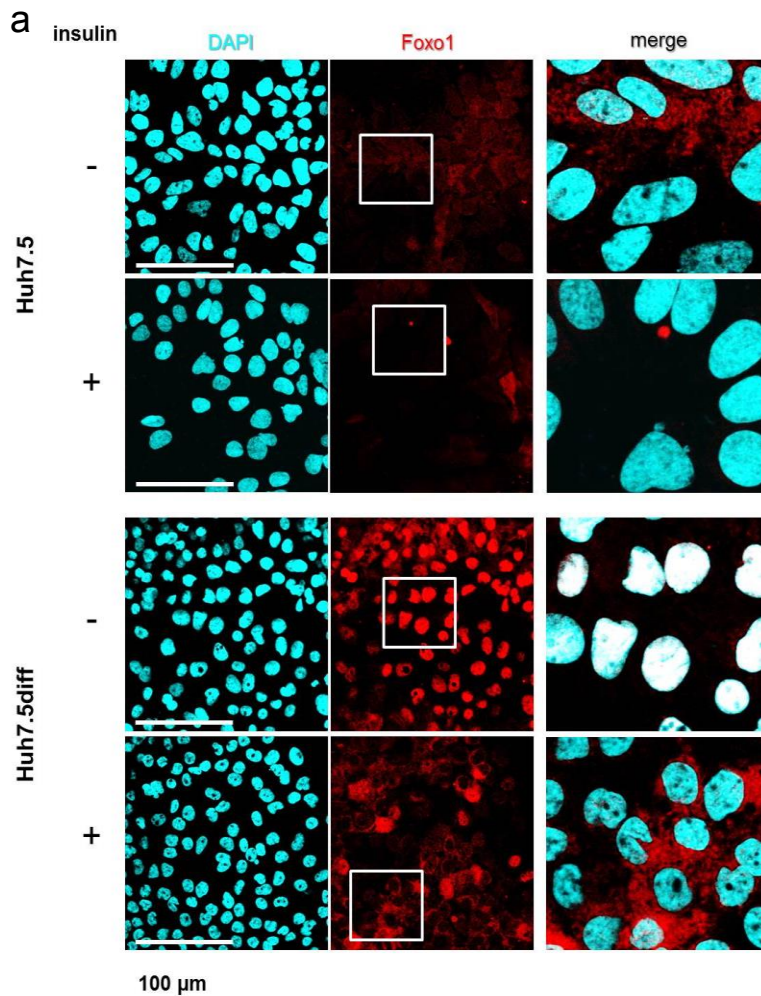


**Abbildung 2.1.3 Huh7.5diff Zellen zeigen erhöhte InsRβ-, Akt, G-6-Pase und PEPCK-Expression sowie ein verbessertes Ansprechen auf Insulin.**

Huh7.5diff Zellen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert. Zum Vergleich wurden Huh7.5 Zellen 10% konfluent in DMEM-Vollmedium ausgesät und nach 4 Tagen, bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz, für 16h mit Depletionsmedium behandelt.

a.) Nach 8 min Insulinstimulation (+) oder Inkubation mit Kontrollmedium (-) wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf p-Akt (Ser473)-, gesamt Akt- und InsR- Proteinexpression untersucht. β-Aktin diene als Ladungskontrolle. Zu Detektion aller genannten Proteine wurden zwei Westernblots derselben Proben durchgeführt die durch #1 und #2 gekennzeichnet sind. Repräsentative Westernblots sind dargestellt.

b.) Nach 4 h Insulinstimulation wurde die G-6-Pase- und PEPCK-Expression in quantitativer RT-PCR relativ zu 18sRNA gemessen und auf die Expression in unbehandelten, undifferenzierten Zellen normalisiert. Mittelwerte+SD aus zwei unabhängigen Experimenten (durchgeführt mit 3 bzw. 2 biologischen Replikaten) sind dargestellt. ns = nicht signifikant, \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 2.1.4: Huh7.5diff Zellen zeigen insgesamt erhöhte Foxo1 Expression und Foxo1-Translokation nach Stimulation mit Insulin.**

Huh7.5diff Zellen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert. Zum Vergleich wurden Huh7.5 Zellen 10% konfluent in DMEM-Vollmedium ausgesät und nach 4 Tagen, bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz, verwendet.

a.) Nach 16 h in Depletionsmedium wurden die Zellen für 20 min mit Insulin stimuliert (+) oder mit Kontrollmedium ohne Insulin behandelt (-) und anschließend zur Immunfluoreszenzfärbung fixiert. Das dritte Bild jeder Probe („merge“) zeigt die Überlagerung des Foxo1-Signals und des DAPI-Signals (Kernfärbung) in der Vergrößerung des im „Foxo1“-Bild markierten Ausschnitts.

b.) Proteinlysate wurden mittels Westernblot auf Gesamtzell-Foxo1 Protein untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle.



## 2.2. INFEKTION UND VIRUSREPLIKATION IN DIFFERENZIIERTEN HUH7.5 ZELLEN

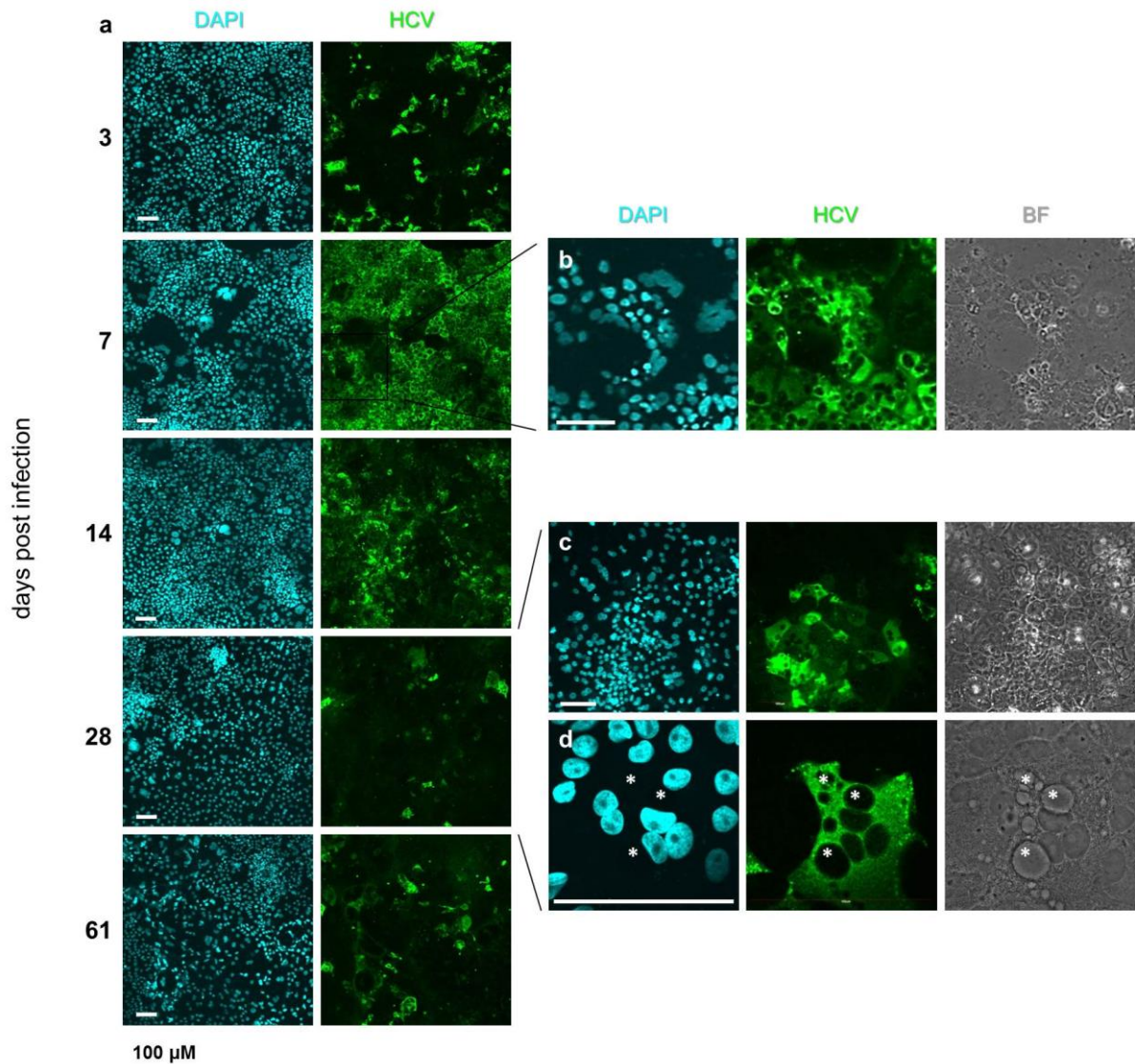
---

In HuH7.5 Zellen wurde während der Differenzierung und darüber hinaus über einen Zeitraum von insgesamt 75 Tagen der Grad der HCV Infektion und die Virusreplikation bestimmt. Immunfluoreszenzfärbungen auf HCV-core zeigten, dass der Anteil der infizierten Zellen in den ersten Tagen zunahm. Sieben Tage nach Infektion, wenn der Zellrasen an manchen Stellen noch nicht komplett geschlossen war, waren 100% der Zellen infiziert (Abb. 2.2.1b). Über die folgenden Tage war die Zahl infizierter Zellen rückläufig und ab dem Zeitpunkt der maximalen Differenzierung bei ca. 4 Wochen blieb ihr Anteil mit 10-15% infizierten Zellen konstant (Abb. 2.2.1a). Bei Infektion von  $\geq 28$  Tagen bildeten die infizierten Zellen häufig Fokusse, sowohl in Zellhügeln (Abb. 2.2.1c), als auch in den einzelschichtigen Bereichen. In einzelschichtigen Bereichen waren zudem immer wieder einzelne ungewöhnlich große HCV-core-positive Zellen mit Zelldurchmessern bis zu 100  $\mu\text{M}$  zu beobachten (Abb. 2.2.1d). Diese Zellen hatten in der Regel mehr als 2 Zellkerne und enthielten zudem vesikuläre Strukturen unterschiedlicher Größen, bei denen es sich der Morphologie nach um sogenannte „Lipid Droplets“ (Fettspeicherorganelle) handelte.

Im Vergleich zu uninfizierten Proben waren etwa ab der 4. Woche nach Infektion auch makroskopisch Veränderungen im Zellkulturphänotyp zu beobachten. Während die Zellen uninfizierter Proben im Prozess der Differenzierung zahlreiche kleine Hügel bildeten, entwickelten HCV-infizierte Zellkulturen einzelne sehr große Zellagglomerate (Abb. 2.2.2).

Intrazelluläre HCV RNA sowie HCV NS3 Protein im Gesamtzelllysat korrelierten mit den Immunfluoreszenzerggebnissen (Abb. 2.2.3a/b): Auch hier war nach einem Anstieg während der ersten Woche nach Infektion, wieder eine Abnahme auf ca. 10% des Maximalwertes zu beobachten, bei dem der jeweilige Parameter dann konstant blieb.

Infektiösität und HCV-Partikelzahl im Überstand, gemessen als TCID<sub>50</sub> bzw. HCV RNA, folgten demselben Verlauf (Abb. 2.2.3c/d).



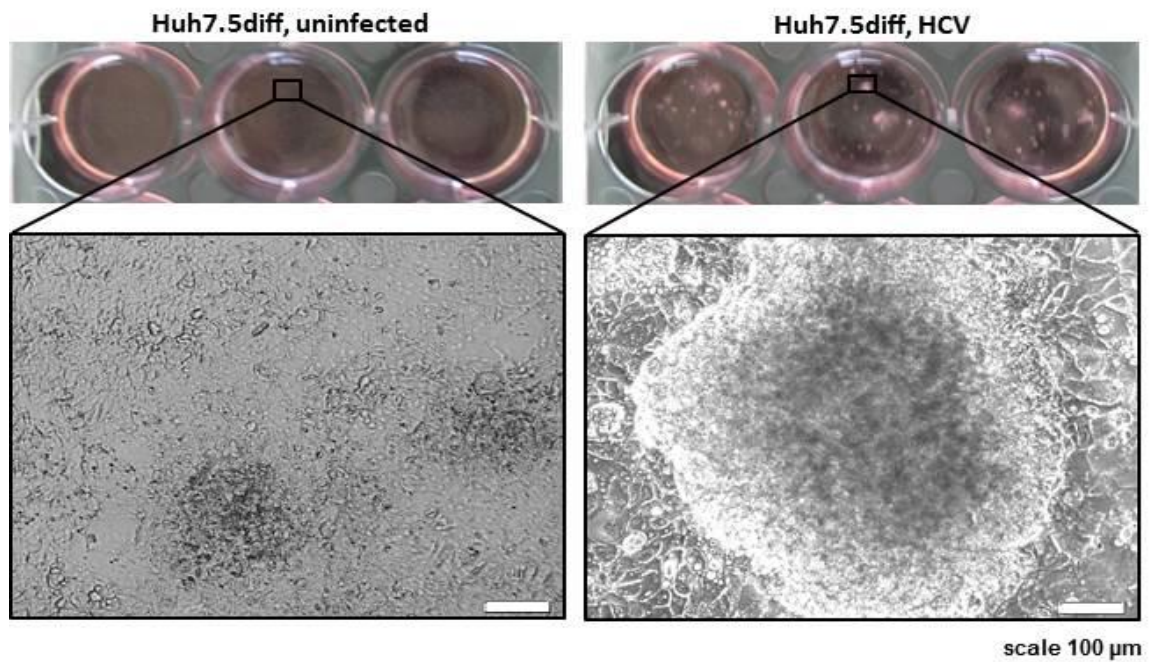
**Abbildung 2.2.1: Anteil HCV infizierter Zellen im Verlauf der Differenzierung von Huh7.5 Zellen**

Huh7.5diff Zellen wurden 10% konfluent auf Deckgläschen in einer 12-well Platte ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen mit HCV (0,05 TCID<sub>50</sub>/Zelle) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Deckgläschen entnommen, fixiert und bis zum Ende des Experiments bei 4°C in PBS aufbewahrt. Nach der letzten Fixierung wurden alle Proben durch Immunfluoreszenzfärbung auf HCV core untersucht.

a.) zeigt die HCV-Färbung im Zeitverlauf.

b.) zeigt einer Vergrößerung der Färbung nach 7 Tagen. Ein zusätzliches Hell Feld Bild (engl. bright field, BF) zeigt die Dichte des Zellrasens.

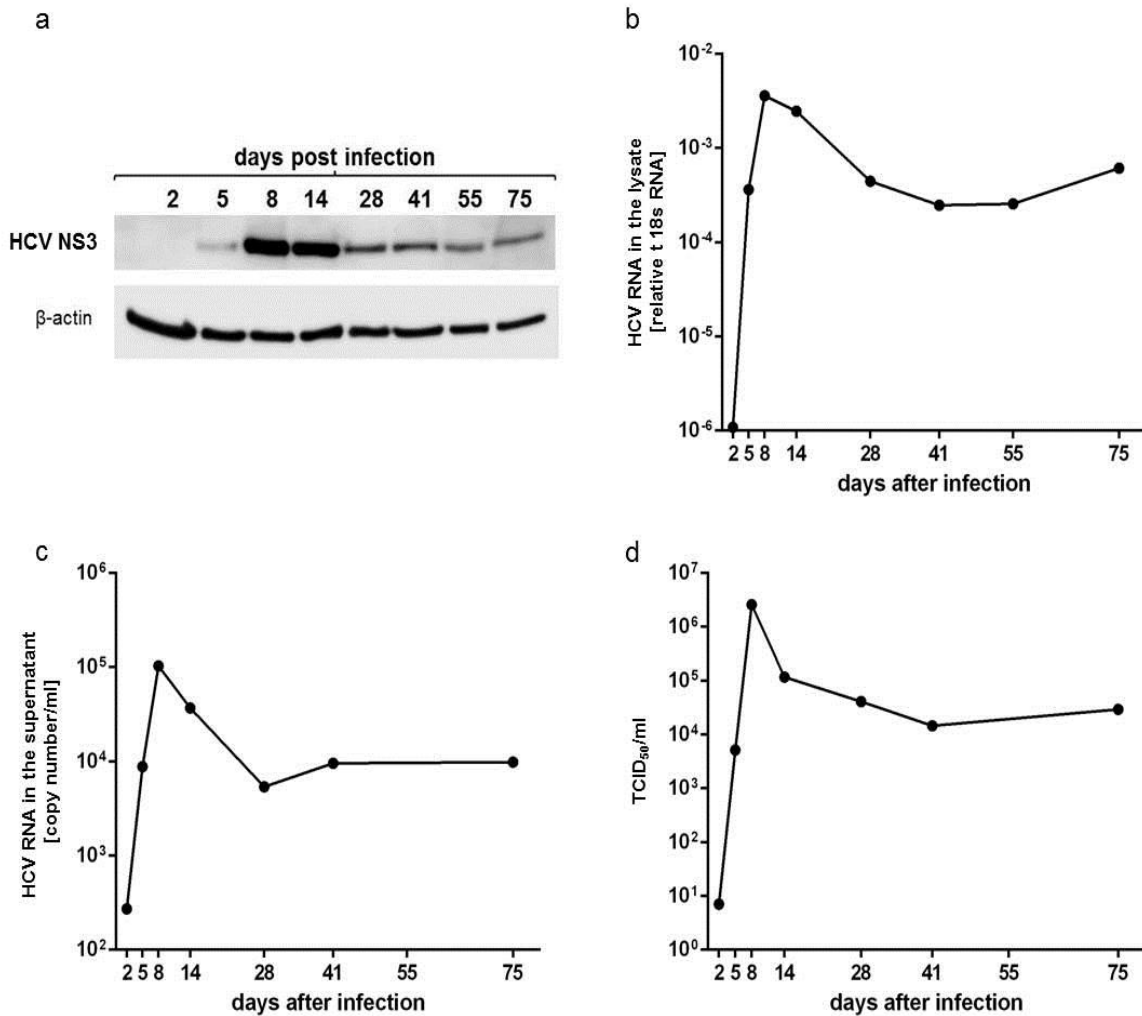
c.) und d.) zeigen vergrößerte Ausschnitte von Bildern 28 Tage nach Infektion (Erreichen der maximalen Differenzierung). c.) zeigt ein infiziertes Zellagglomerat. d.) zeigt eine infizierte „Riesenzelle“ mit mehreren Kernen und Lipid Droplets (\*).



**Abbildung 2.2.2: Veränderter Zellkulturphänotyp in HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen**

Oben: typischer Zellkultur-Phänotyp von uninfizierten und HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen (Ausschnitte aus Digitalfotos von 12-well Platten).

Unten: hellfeldmikroskopische Bilder der typischer kleiner Zellhügel in uninfizierten und großer Zellagglomerate in HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen.



**Abbildung 2.2.3: Intrazelluläre und extrazelluläre Virusmarker im Verlauf der Zelldifferenzierung**

Huh7.5diff Zellen wurden 10% konfluent in 12-well Platten ausgesät. Nach 48 h wurden die Zellen mit HCV (0,05 TCID<sub>50</sub>/Zelle) infiziert.

a.)/b.) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Protein- bzw. RNA-Lysate hergestellt und bei -80°C aufbewahrt. a.) Nach dem letzten Messzeitpunkt wurde die Expression des HCV-Proteins NS3 mittels Westernblot untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle. b.) Intrazelluläre HCV RNA wurde durch quantitative RT-PCR relativ zu 18sRNA gemessen.

c.)/d.) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Überstände aus drei Proben gepoolt und bei -80°C aufbewahrt. 24 h vor jedem Analysezeitpunkt fand ein Mediumwechsel statt. c.) Nach RNA-Extraktion aus dem Überstand wurde die absolute Zahl an HCV-RNA-Kopien durch quantitative RT-PCR mit HCV-spezifischen Sonden durchgeführt gegen eine Verdünnungskurve gemessen.

d.) Die Infektiosität des Überstands wurde durch Bestimmung der TCID<sub>50</sub> untersucht. Der erste Verdünnungsschritt der Titration betrug 1:4. Im Folgenden wurde 1:8 weiterverdünnt.

### 2.3. INSULIN-SENSITIVITÄT VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION

---

Um die Hypothese der Entstehung von Insulin Resistenz in HCV-infizierten Hepatozyten zu überprüfen, wurde der Insulin-Signalweg in uninfizierten und HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen untersucht.

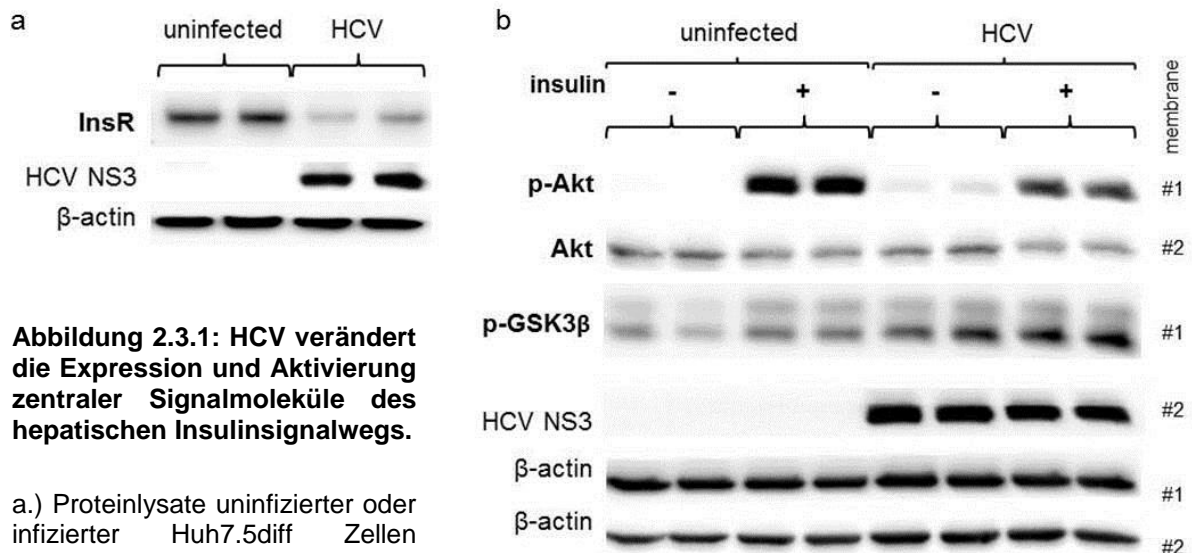
Hepatische Insulin Resistenz ist durch nicht mehr stattfindende Hemmung der Gluconeogenese durch Insulin charakterisiert [124,125]. Die Ursache dafür könnte bei jedem Schritt zwischen dem InsR und den Gluconeogenese-Schlüsselenzymen PEPCK und G-6-Pase liegen (siehe Abb. 1.2.4: Insulin-Signalweg in Hepatozyten). Dementsprechend wurde die Expression des InsR, die durch Insulin Signal ausgelöste Aktivierung von Akt, die durch Akt vermittelte Translokation des Transkriptionsfaktors Foxo1 aus dem Nukleus ins Cytoplasma und die dadurch verursachte Veränderung in der PEPCK- und G-6-Pase-Expression untersucht. Zudem wurde ein weiteres Substrat von Akt - GSK3 $\beta$  - untersucht. GSK3 $\beta$  ist ein Inhibitor der Glycogensynthese. Durch insulinvermittelte Aktivierung von Akt wird GSK3 $\beta$  phosphoryliert und damit inaktiviert, was zur Induktion der Glycogensynthese führt [225].

Westernblot Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion von InsR $\beta$  sowie eine reduzierte Insulin-induzierte Akt-Aktivierung in HCV infizierten Proben (Abb. 2.3.1). Dies führte allerdings zu keiner Reduktion der Insulin-induzierten GSK3 $\beta$  Phosphorylierung. Sowohl das basale als auch Insulin-induzierte p-GSK3 $\beta$  Signal war in HCV-infizierten Proben deutlich stärker. Auch Foxo1 war, trotz der reduzierten Akt-Phosphorylierung, nicht vermehrt im Nukleus zu finden. Während in den uninfizierten Proben ohne Insulinbehandlung beinahe alle Zellen Foxo1-positive Zellkerne zeigten und auch nach 20-minütiger Insulin-Stimulation noch einige Foxo1-positive Kerne zu sehen waren (Abb. 2.3.2a), waren in den infizierten Proben weder mit Insulin noch ohne Insulin Foxo1-positive Kerne detektierbar. Dies betraf nicht nur die HCV-positiven Zellen („HCV<sup>+</sup>-Zellen“), sondern auch die HCV-negativen Nachbarzellen (im Folgenden zur Unterscheidung von uninfizierten Zellen aus uninfizierten Proben als „HCV<sup>-</sup>-Zellen“ bezeichnet). Westernblotuntersuchungen von Foxo1 im Gesamtzelllysat zeigte eine insgesamt reduzierte Foxo1-Proteinexpression (Abb. 2.3.2c).

Die Expression der Gluconeogenese Enzyme korrelierte mit den Ergebnissen des Transkriptionsfaktors: sie war in den HCV-infizierten im Vergleich zu uninfizierten

Proben ohne Insulinbehandlung signifikant reduziert und lag im Bereich der Expression von uninfizierten Zellen nach Insulinstimulation (Abb. 2.3.3).

Zusammenfassend zeigten HCV-infizierte Huh7.5diff Zellen zwar signifikante Veränderungen im Insulin-Signalweg aber keine IR.



**Abbildung 2.3.1: HCV verändert die Expression und Aktivierung zentraler Signalmoleküle des hepatischen Insulinsignalwegs.**

a.) Proteinlysate uninfizierter oder infizierter Huh7.5diff Zellen wurden mittels Westernblot auf InsR Expression untersucht.

b.) Nach 8 min Insulinstimulation (+) oder Behandlung mit Kontroll-Medium (-) wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf p-Akt (Ser473)-, gesamt Akt- und p-GSK3β Expression untersucht. Die Proteine wurden auf insgesamt zwei Membranen detektiert, die durch #1 und #2 gekennzeichnet sind.

Pro Spur wurden 30 µg Protein aufgetragen. β-Aktin diente als Ladungskontrolle, HCV-NS3 als Kontrolle der Infektion. Pro Kondition wurden zwei biologische Replikate desselben Experiments aufgetragen.

Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

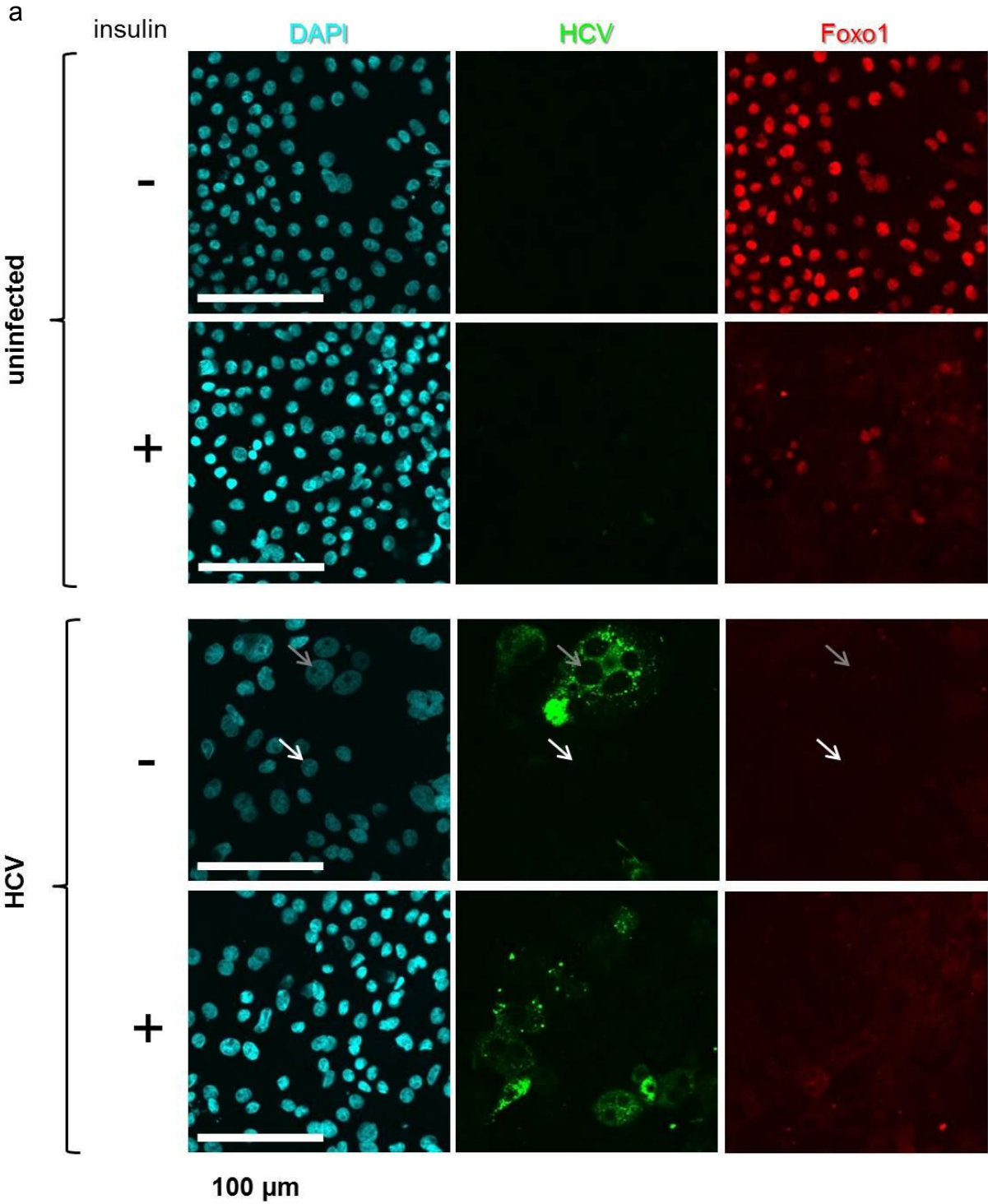
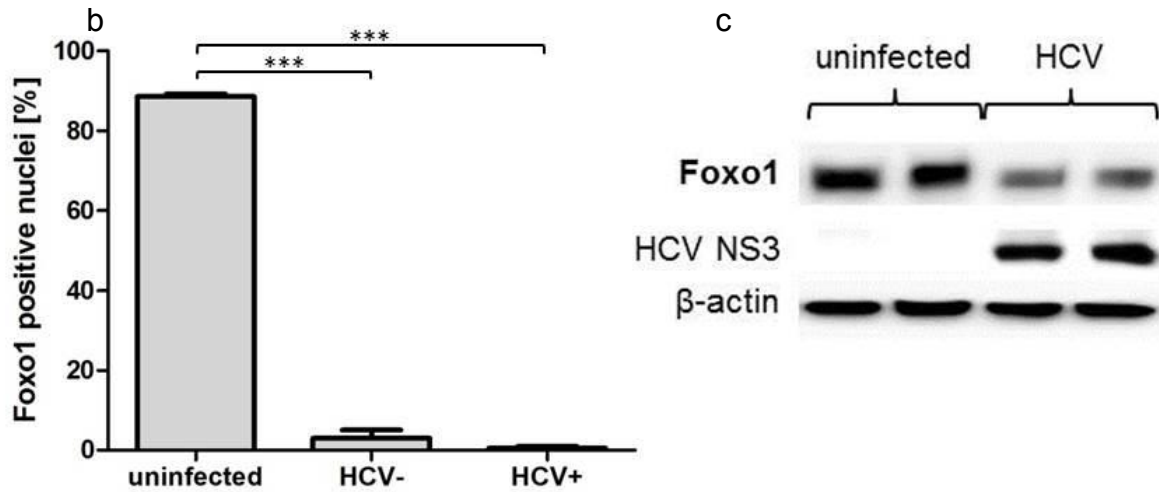


Abbildung 2.3.2: HCV reduziert Expression und nukleäre Lokalisation von Foxo1.

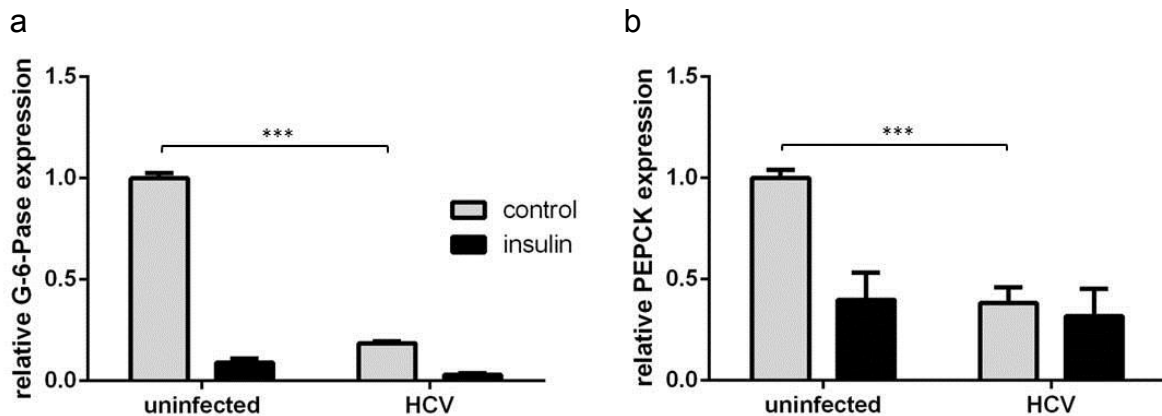
Beschreibung siehe Abb. 2.3.2b, nächste Seite



**Abbildung 2.3.2: HCV reduziert Expression und nukleäre Lokalisation von Foxo1, fortgesetzt.**

Uninfizierte und HCV-infizierte Huh7.5diff Zellen wurden für 20 min mit Insulin stimuliert (+) oder mit Kontrollmedium ohne Insulin behandelt (-) und anschließend zur Immunfluoreszenzfärbung fixiert. a.) zeigt repräsentative Bilder der HCV core (grün) und Foxo1 (rot) Doppel-Färbung. Weiße Pfeile markieren den Kern einer uninfizierten Zelle, graue Pfeile den Kern einer infizierten Zelle. b.) zeigt die Quantifizierung der Foxo1-positiven Zellkerne. In zwei unabhängigen Experimenten wurde insgesamt die Foxo1-Kernfärbung von 186 uninfizierten, 220 HCV- bzw. 282 HCV+ Zellen ausgewertet.

c.) zeigt Westernblot-Ergebnisse der Foxo1-Proteinexpression im Gesamtzelllysat. Es handelt sich um denselben Westernblot wie in Abb. 2.3.1a gezeigt. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 2.3.3: HCV reduziert die Expression von Gluconeogenese Enzymen.**

Uninfizierte und infizierte Huh7.5diff Zellen wurden nach 4 h Insulinstimulation durch quantitative RT-PCR auf die mRNA Expression von G-6-Pase (a) und PEPCK (b) untersucht. Die Expression wurde relativ zu 18sRNA gemessen und auf Werte unbehandelter, uninfizierter Zellen normalisiert. Mittelwerte+SD aus drei unabhängigen Experimenten (durchgeführt mit 3 biologischen Replikaten) sind dargestellt. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



## 2.4. DIFFERENZIERUNGSSTATUS VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION

---

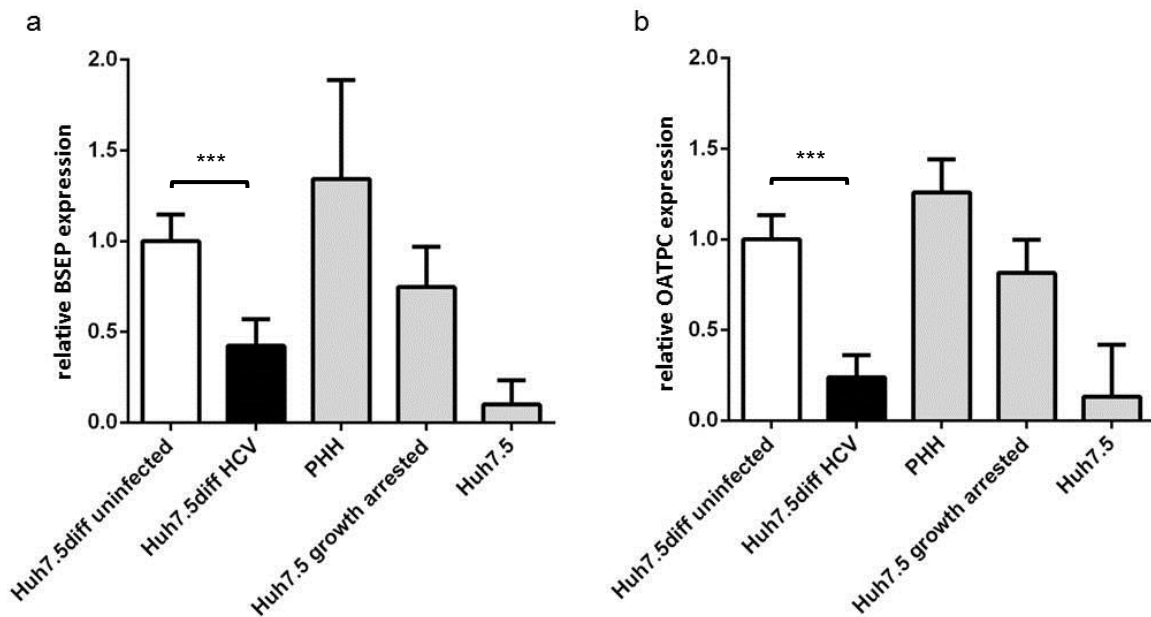
G-6-Pase und PEPCK mit ihrer Schlüsselrolle in der Gluconeogenese gelten als Marker für den Differenzierungsgrad von Hepatozyten [161,226]. Wie in Abschnitt 2.1 gezeigt, ist auch eine niedrige Expression des InsR sowie mangelnde Regulation von Akt und Foxo1 als ein Zeichen undifferenzierter Hepatozyten zu sehen, während die Differenzierung die Expression der genannten Moleküle erhöht bzw. die Regulierbarkeit durch Insulin verbessert. Die in Abschnitt 2.3 gezeigten Unterschiede zwischen HCV-infizierten und uninfizierten Huh7.5diff Zellen entsprachen den Unterschieden zwischen differenzierten und undifferenzierten Hepatozyten in allen untersuchten Aspekten.

Daher wurde im Folgenden eine mögliche Dedifferenzierung infizierter Huh7.5diff Zellen untersucht. Hierbei wurde zunächst die Zellproliferation bzw. der Zellzyklus untersucht.

Es wurden Organic anion transporter polypeptide 2 (OATPC) und Bile Salt Export Pump (BSEP) als vom Glucosestoffwechsel unabhängige Differenzierungsmarker analysiert und mit der Expression in proliferierenden Huh7.5 Zellen, wachstumsarretierten Huh7.5 Zellen und PHHs verglichen. PHHs zeigten die höchsten Expressionslevel für beide Marker, gefolgt von Huh7.5diff Zellen und wachstumsarretierten Huh7.5 Zellen. Die niedrigsten Level zeigten erwartungsgemäß proliferierende Huh7.5 Zellen. HCV-infizierte Proben differenzierter Huh7.5 Zellen zeigten im Vergleich zu uninfizierten Proben signifikant niedrigere Expressionslevel für beide Marker: Ihre Expression lag nur unwesentlich höher als in proliferierenden Huh7.5 Zellen (Abb. 2.4.1).

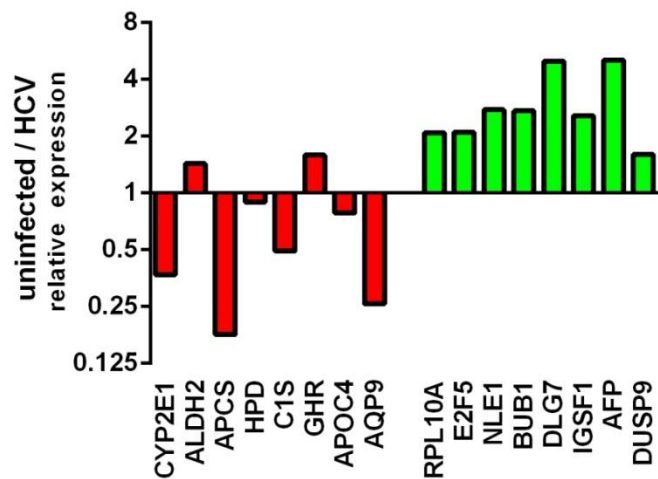
Cairo et. al veröffentlichten 2008 eine Zusammenstellung von 16 Genen, mit der sich Lebertumoren in zwei Typen unterscheiden lassen: In stark proliferative Tumoren „C2-type“ mit Ähnlichkeit zu früher fetaler Leber, erhöhter Expression anti-apoptotischer Gene und Tendenz zur Metastasierung, und in „C1-type“ Tumoren mit höherem Differenzierungsgrad und starker Expression des perivenösen Leberstoffwechsel [227]. Die Untersuchung der Expression dieser Gene zeigte Veränderungen für HCV-infizierte Huh7.5diff Zellen im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen, die (mit Ausnahme von 2 Genen) jenen von undifferenzierten, proliferativen „C2“ Typ Tumoren entsprachen (Abb. 2.4.2).

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten zudem einen Anstieg des Zellproliferationsmarker Ki-67 [228] von 19% in uninfizierten Zellen (der uninfizierten Proben) auf 56% in HCV<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 2.4.3). Auch HCV<sup>-</sup>-Zellen in infizierten Kulturen zeigten mit 45% eine im Vergleich zu Zellen der uninfizierten Proben erhöhte Anteil Ki-67 positiver Zellen. Auffallend war, dass die Mehrheit der Ki67-positiven Kerne in HCV-infizierten Proben eine gepunktete Färbung zeigten, wie sie für Zellen in der G1- und S-Phase des Zellzyklus beschrieben ist [229].



**Abbildung 2.4.1: HCV reduziert die Expression hepatischer Differenzierungsmarker**

Uninfizierte (weiße Balken) und infizierte (schwarze Balken) Huh7.5diff Zellen wurden durch quantitative RT-PCR auf die mRNA Expression von BSEP (a) und OATPC (b) untersucht. Als Kontrollen des Differenzierungsstatus (graue Balken) wurden PHHs (isoliert von der chirurgischen Klinik und Polyklinik Großhadern, im Rahmen der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR), wachstumsarretierte Huh7.5 Zellen („Huh7.5 growth arrested“, gleichzeitig mit Huh7.5diff ausgesät, 4 Wochen Kultivierung in DMEM-Vollmedium) und proliferierende Huh7.5 Zellen („Huh7.5“, gleichzeitig mit Huh7.5diff ausgesät, Lyse bei 80-90% Konfluenz) verwendet. Die Expression wurde relativ zu 18sRNA gemessen und auf Werte un behandelter, uninfizierter Huh7.5 Zellen normalisiert. Mittelwerte+SD aus zwei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in 3 biologischen Replikaten) sind dargestellt. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 2.4.2:** Veränderungen in der Genexpression durch HCV führen zu einem Expressions-muster wie es in stark proliferativem HCC zu finden ist.

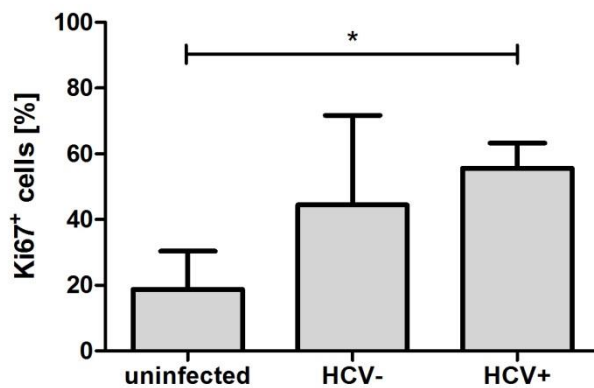
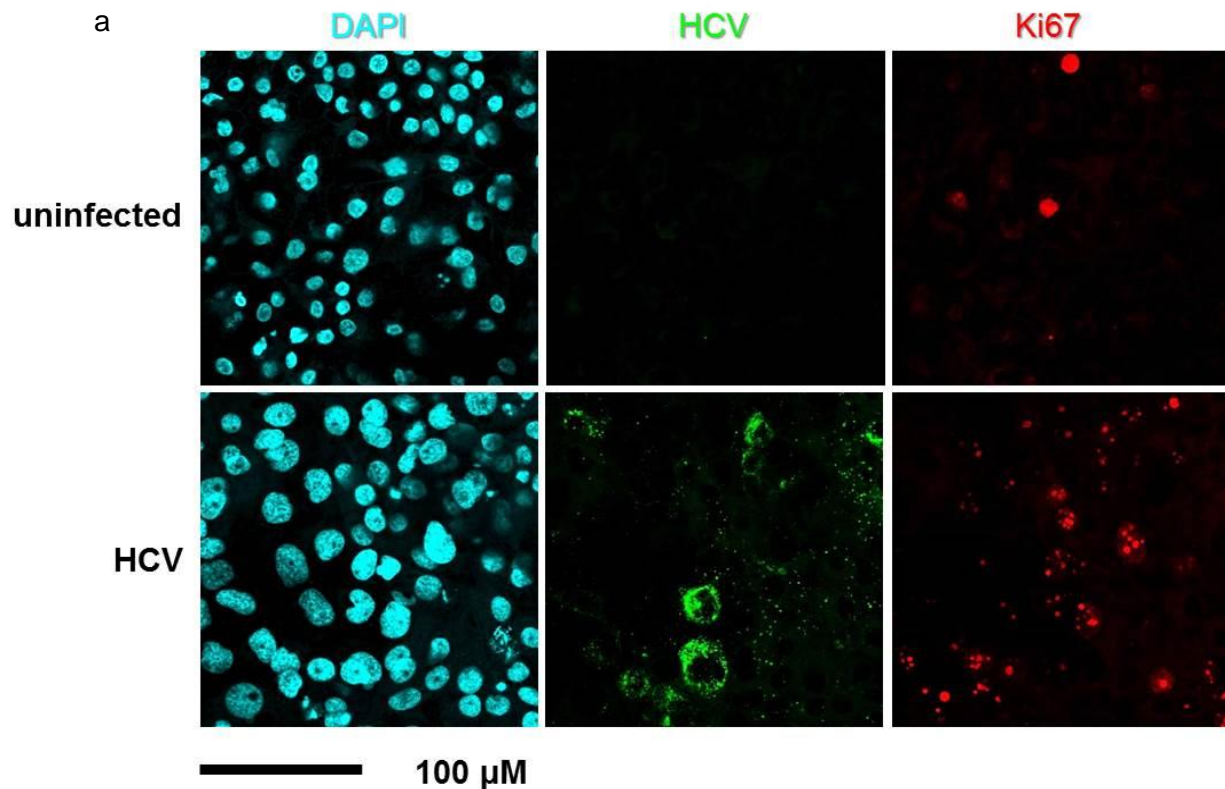
Uninfizierte und infizierte Huh7.5diff Zellen wurden durch quantitative RT-PCR auf die Expression eines Sets von 16-Genen untersucht, das zur Einordnung von HCC etabliert wurde [227]. **Rot:** Gene die in stark proliferativem HCC runterreguliert sind, **grün:** Gene, die in stark proliferativem HCC hoch-reguliert sind. Die Expression wurde relativ zu 18sRNA gemessen. Ergebnisse sind als Quotient uninfizierter zu infizierter Proben (jeweils Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten eines Experiments) dargestellt.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden mittels BrdU (Bromeodeoxyuridine) und 7-AAD (7-amino-actinomycin D) durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen durchgeführt. Nach Zugabe ins Zellkulturmedium wird BrdU aufgrund seiner Ähnlichkeit anstelle von Thymidin in die DNA der Zellen eingebaut. Durch eine spätere Antikörperfärbung von BrdU können so Zellen die sich im Zeitraum der BrdU Zugabe in der S-Phase befunden haben quantifiziert werden. Durch zusätzliche Färbung mit 7-amino-actinomycin D (7-AAD), das doppelsträngige DNA bindet, können BrdU-negative Zellen weiter in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase Zellen und G<sub>2</sub>/M-Phase Zellen unterschieden werden.

Die Zellzyklusanalysen zeigten, dass sich von den HCV<sup>+</sup>-Zellen ca. sechsmal mehr Zellen (18%) in der S-Phase des Zellzyklus befanden als in uninfizierten Zellen (3%) (Abb. 2.4.4). Der Anteil der S-Phase Zellen in HCV<sup>-</sup>-Zellen lag bei 7%.

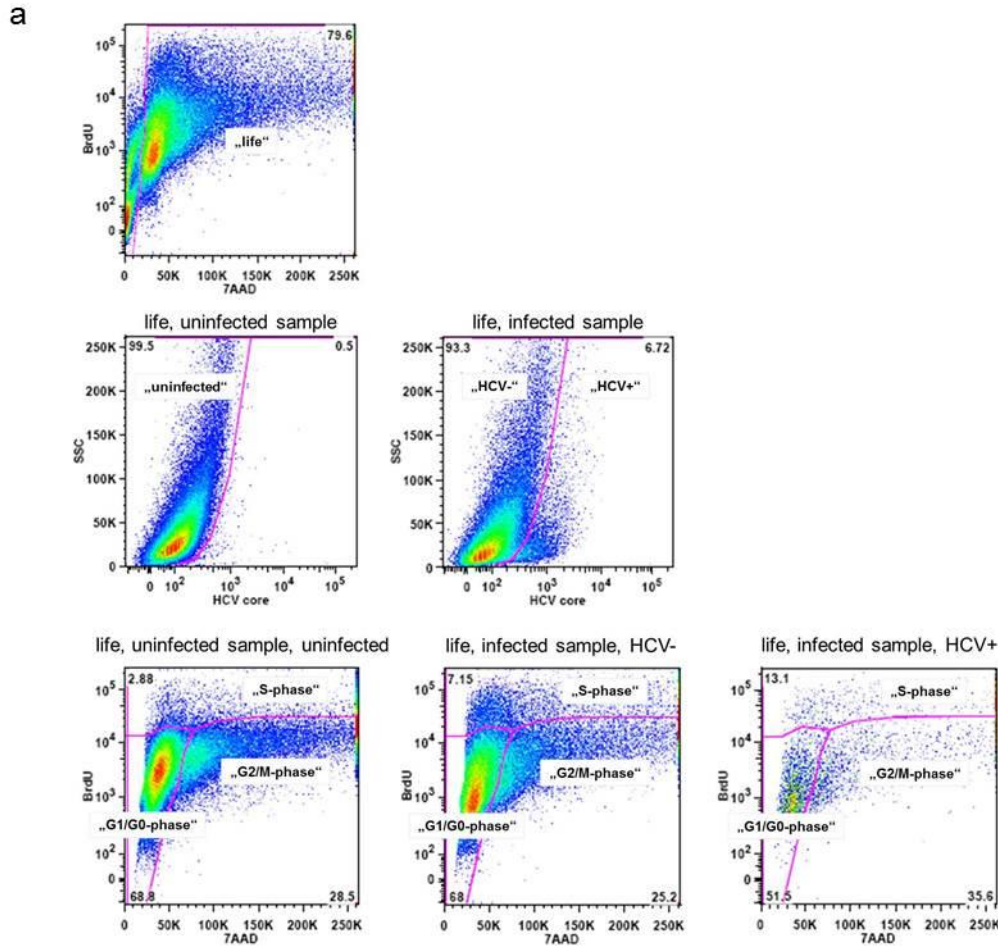
Bei regelmäßiger Mikroskopie der Zellen wurden keine Anzeichen vermehrter Apoptose in infizierten Proben beobachtet. Um sicher ausschließen zu können, dass das Auftreten undifferenzierter Hepatozyten eine Folge von Apoptose und kompensatorischer Proliferation benachbarter Hepatozyten war, wurde die Aktivierung von proapoptotischen Effektorcaspasen gemessen. Die Quantifizierung von cleaved Caspase 3 (gespaltene Caspase 3, aktive Form des Enzyms) in einem Experiment bzw. der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 und -7 im Wiederholungsexperiment zeigten, dass die Caspase Aktivität in HCV infizierten Proben nicht erhöht, sondern sogar deutlich gesenkt war (Abb. 2.4.5).

Damit kann zusammengefasst werden, dass 1.) die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse die Dedifferenzierung, den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die Akkumulation von S-Phase Zellen bei HCV-infizierten Hepatozyten sowie uninfizierten Nachbarzellen zeigen und 2.) die dedifferenzierten Zellen nicht aufgrund von Apoptose infizierter Zellen und kompensatorischer Proliferation von Nachbarzellen auftreten.

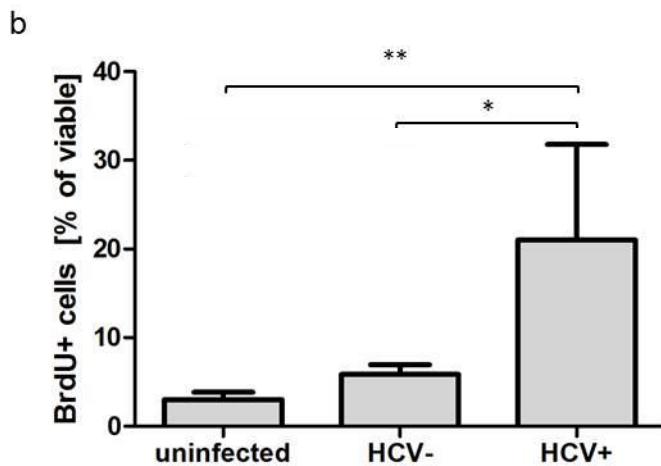


**Abbildung 2.4.3: HCV erhöht den Anteil Ki67-positiver Zellen.**

Immunfluoreszenzfärbungen auf HCV-core Protein (grün) und Ki67 (rot) wurden durchgeführt. a.) zeigt repräsentative Bilder der Ki67 Immunfluoreszenz-Färbungen. b.) zeigt die Quantifizierung der Ki67-positiven Zellkerne. In fünf unabhängigen Experimenten wurden jeweils 10 mikroskopische Felder ausgewertet. \* =  $p \leq 0,05$ .



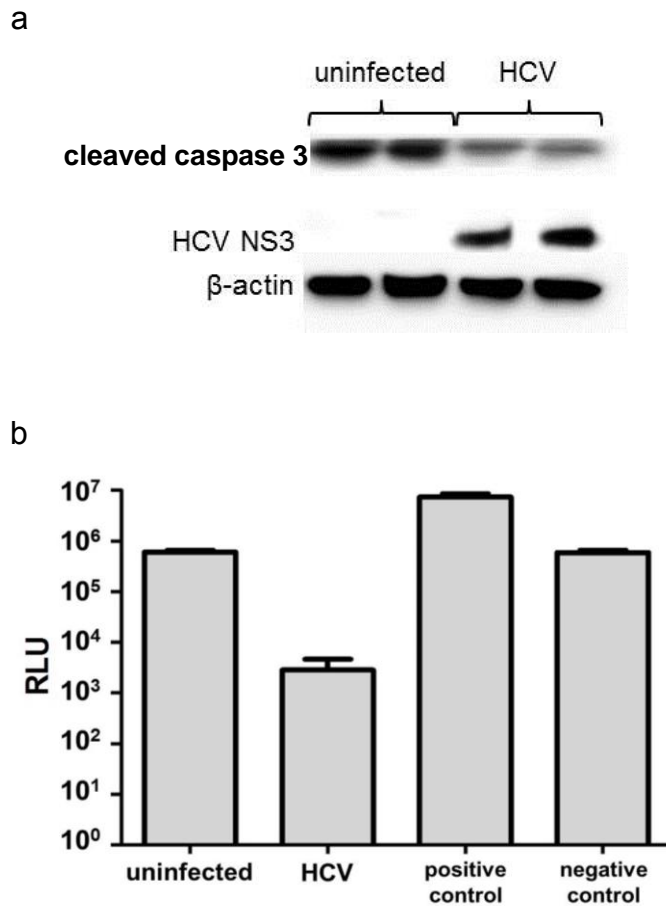
**Abbildung 2.4.4: HCV ist vermehrt in S-Phase Zellen zu finden und erhöht ihren Anteil in HCV- infizierten Proben.**



Uninfizierten und indizierten Huh7.5diff Zellen wurde für 90 min BrdU ins Zellkulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden intrazelluläre Antikörper-Färbungen auf HCV-core und BrdU durchgeführt und so S-Phase Zellen sichtbar gemacht. Zur Unterscheidung von G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> (diploid) und G<sub>2</sub>/M (tetraploid) wurde zusätzlich wurde die DNA mit 7AAD angefärbt.

a.) zeigt das Gating aus einem repräsentativen Experiment: Nach Ausgrenzung der toten Zellen (oberstes Bild) wurden HCV-positive und HCV-negative Zellen anhand der HCV-core Färbung unterschieden (mittlere Bilder). In den resultierenden Populationen wurde zwischen BrdU-positiven „S-Phase Zellen“, BrdU-negativen, 7AAD-positiven „G<sub>2</sub>/M-Phase Zellen“ und BrdU-negativen, 7AAD-negativen „G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase Zellen“ unterschieden.

b.) zeigt die Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in biologischen Duplikaten bzw. Triplikaten) Mittelwerte+SD sind dargestellt. \* = p ≤ 0,05, \*\* = p ≤ 0,01.



**Abbildung 2.4.5: HCV reduziert die Aktivierung von Signal-Caspasen.**

a.) Proteinlysate uninfizierter oder infizierter Huh7.5diff Zellen wurden mittels Westernblot auf die gespaltene Form der Caspase 3 (cleaved caspase 3) untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle, HCV-NS3 als Kontrolle der Infektion. Pro Kondition wurden zwei biologische Replikate desselben Experiments aufgetragen.

b.) Caspase-Aktivität wurde in einem Luminesz-Assay gemessen. In diesem wird durch aktivierte Caspasen 3 und 7 ein Substrat verdaut, was ein Lumineszenz-Signal erzeugt. Als Positiv-Kontrolle der Apoptose-Induktion wurden proliferierende Huh7.5 Zellen 16h mit 0,5  $\mu$ M Staurosporin behandelt. Unbehandelte Huh7.5 Zellen dienen als Negativ-Kontrolle. Die Ergebnisse wurden mittels Cell-Titer-Blue Viabilitätstest auf die Zellzahl normalisiert und als Mittelwerte+SD aus biologischen Triplikaten desselben Experiments dargestellt. RLU = relative Licht-Intensität (engl. relative light units).

## 2.5. UNTERSUCHUNG DER PRODUKTION VON WACHSTUMSFAKTOREN VON HEPATOZYTEN NACH HCV-INFEKTION

---

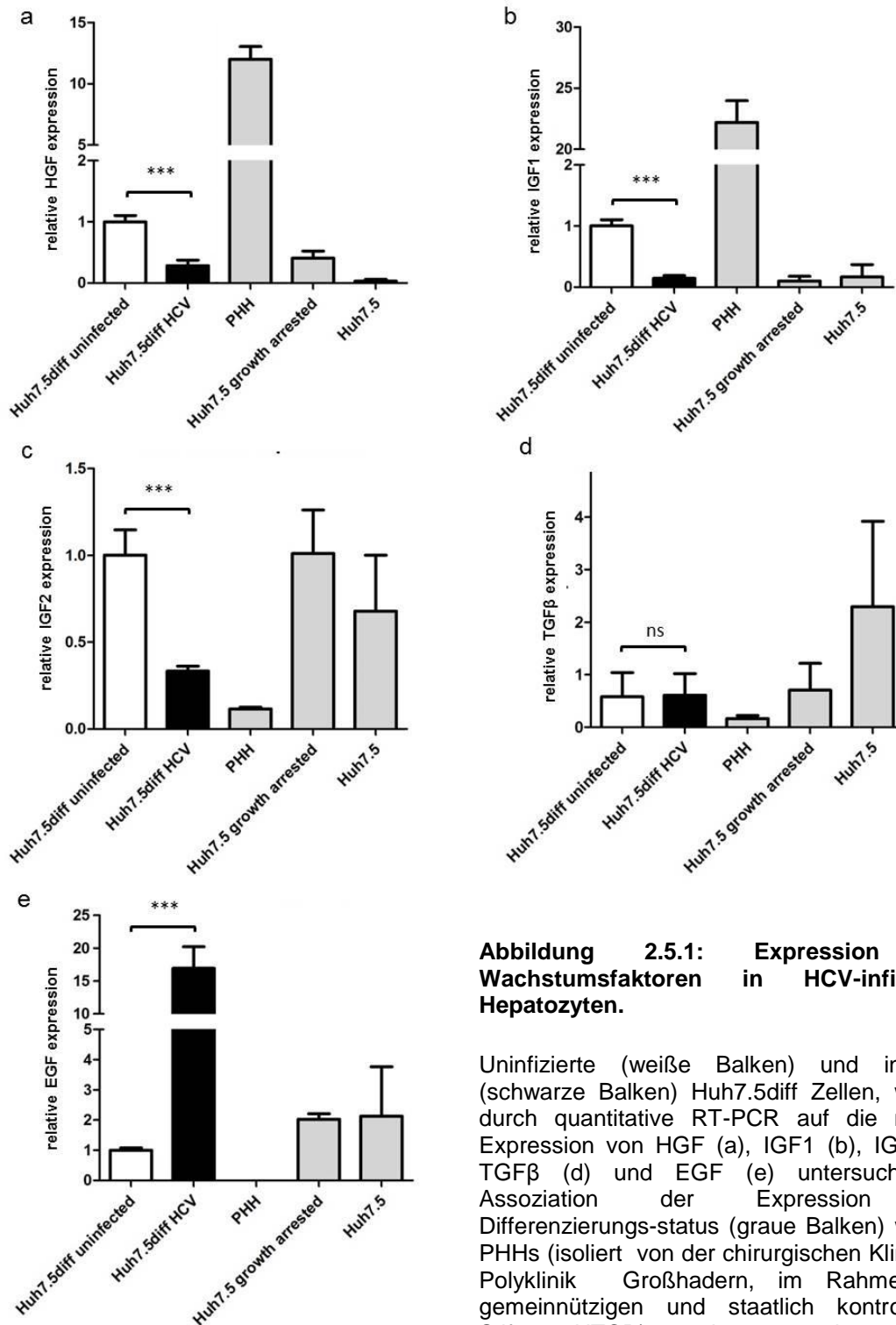
Untersuchungen auf Einzelzellebene, wie beispielweise die Ki67-Färbung (Abb. 2.4.3) zeigten, dass Veränderungen nicht nur in HCV-positiven Zellen, sondern auch in uninfizierten Nachbarzellen auftraten. Daher wurden verschiedene, auf Hepatozyten wirkende und von Hepatozyten produzierte Wachstumsfaktoren, die als parakrine Signale Dedifferenzierung und Proliferation verursachen könnten, auf Veränderungen ihrer Genexpression nach HCV-Infektion untersucht. Die Expression wurde mit proliferierenden sowie wachstumsarretierten Huh7.5 Zellen auf der einen Seite und PHHs auf der anderen Seite verglichen, um Veränderungen, die Folge der Dedifferenzierung waren (Veränderung, schwächer als der Unterschied zwischen Huh7.5diff und proliferierenden Huh7.5 Zellen) von Veränderungen, die Ursache der Dedifferenzierung sein könnten (Veränderung, stärker als der Unterschied zwischen Huh7.5diff und proliferierenden Huh7.5 Zellen) unterscheiden zu können.

Als typische, von adulten Hepatozyten produzierte Wachstumsfaktoren (siehe Abschnitt 1.4.3) zeigten HGF und IGF1 die niedrigste Expression in proliferierenden Huh7.5 Hepatomazellen, eine höhere Expression in wachstumsarretierten Zellen, eine nochmals höhere Expression in Huh7.5diff Zellen und die stärkste Expression in Primärzellen. IGF2, ein während der Embryonalentwicklung produzierter Wachstumsfaktor (siehe Abschnitt 1.4.3), zeigte in proliferierenden, wachstumsarretierten und differenzierten Huh7.5 Zellen im Vergleich zu PHHs eine höhere Expression. HCV-Infektion führte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression aller drei Wachstumsfaktoren (Abb. 2.5.1).

Die Expression von TGF $\beta$  und EGF war in Primärzellen äußerst niedrig und in proliferierenden Huh7.5 Zellen am höchsten. Die HCV-Infektion änderte die TGF $\beta$ -Expression nicht, führte aber zu einem dramatischen Anstieg der EGF-Expression. Die Expression lag etwa 18fach höher als in uninfizierten Huh7.5diff Zellen und damit noch 8fach höher als in proliferierenden Zellen, womit EGF die Kriterien als mögliche Ursache für die Dedifferenzierung erfüllt. Um zu überprüfen, ob die erhöhte Genexpression mit einer Sekretion korrelierte, wurden EGF-ELISA durchgeführt. Tatsächlich ergab die Quantifizierung von EGF im Überstand von HCV-infizierten Zellen eine ebenfalls signifikant erhöhte EGF Sekretion im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen (Abb. 2.5.2).

Um die ursächliche Beteiligung der erhöhten EGF-Produktion an dem in 2.4. gezeigten Wiedereintritt differenzierter Zellen in den Zellzyklus zu untersuchen, wurde überprüft, ob blockierende Antikörper gegen EGF, den Anstieg an S-phase Zellen in infizierten Proben verhindern können. Wie Abb. 2.5.3 zeigt, senkte die Zugabe von blockierenden EGF-Antikörpern die Zahl der HCV-positiver S-Phase Zellen um etwa 24%. Mit 5,8% S-Phase Zellen lag ihr Anteil jedoch immer noch höher als in uninfizierten Proben (3% S-Phase Zellen). In den uninfizierten Zellen aus infizierten Proben sank der Anteil der S-Phase Zellen um etwa ein Drittel, von absolut 5,9% auf 4,1% und lag damit nur noch unwesentlich höher als in uninfizierten Proben.

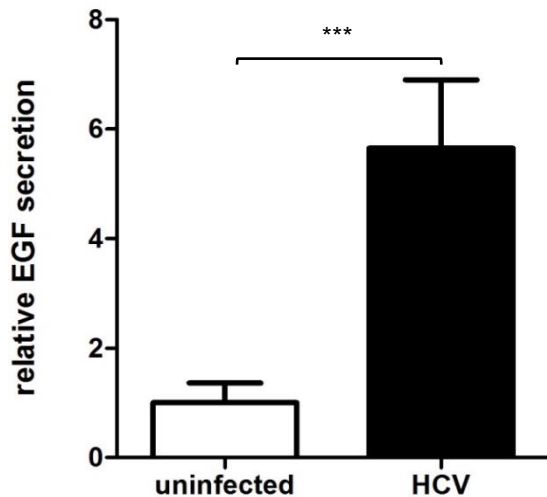




**Abbildung 2.5.1: Expression von Wachstumsfaktoren in HCV-infizierten Hepatozyten.**

Uninfizierte (weiße Balken) und infizierte (schwarze Balken) Huh7.5diff Zellen, wurden durch quantitative RT-PCR auf die mRNA-Expression von HGF (a), IGF1 (b), IGF2 (c), TGFβ (d) und EGF (e) untersucht. Zur Assoziation der Expression des Differenzierungs-status (graue Balken) wurden PHHs (isoliert von der chirurgischen Klinik und Polyklinik Großhadern, im Rahmen der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR), wachstumsarretierte Huh7.5 Zellen („Huh7.5 growth arrested“, gleichzeitig,

mit Huh7.5diff ausgesät, 4 Wochen Kultivierung in DMEM-Vollmedium) und proliferierende Huh7.5 Zellen („Huh7.5“ gleichzeitig mit Huh7.5diff ausgesät, Lyse bei 80-90% Konfluenz) verwendet. Die Expression wurde relativ zu 18sRNA gemessen und auf Werte unbehandelter, uninfizierter Huh7.5 Zellen normalisiert. Mittelwerte+SD aus zwei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in 3 biologischen Replikaten) sind dargestellt. \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



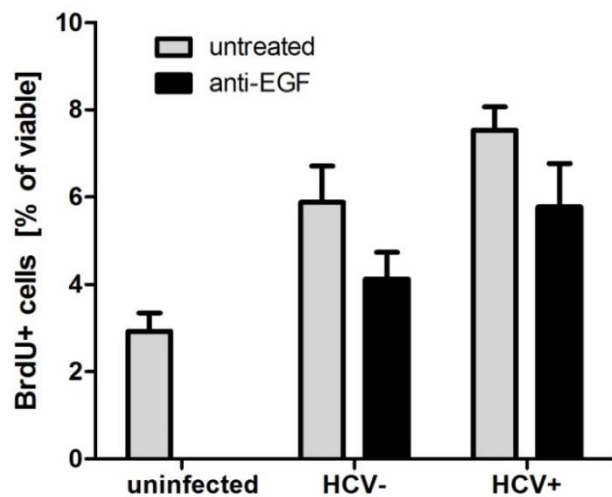
**Abbildung 2.5.2: HCV infizierte Huh7.5diff Zellen setzen erhöhte Mengen an EGF frei.**

EGF im Überstand uninfizierter und infizierter Huh7.5diff Zellen wurde durch ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mittels Cell-Titer-Blue Viabilitätstest auf die Zellzahl normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu uninfizierten Zelle als Mittelwerte+SD aus drei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in biologischen Triplikaten) dargestellt.

\*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

**Abbildung 2.5.3: anti-EGF-Antikörper reduzieren den Anteil an S-Phase Zellen in HCV-infizierten Proben.**

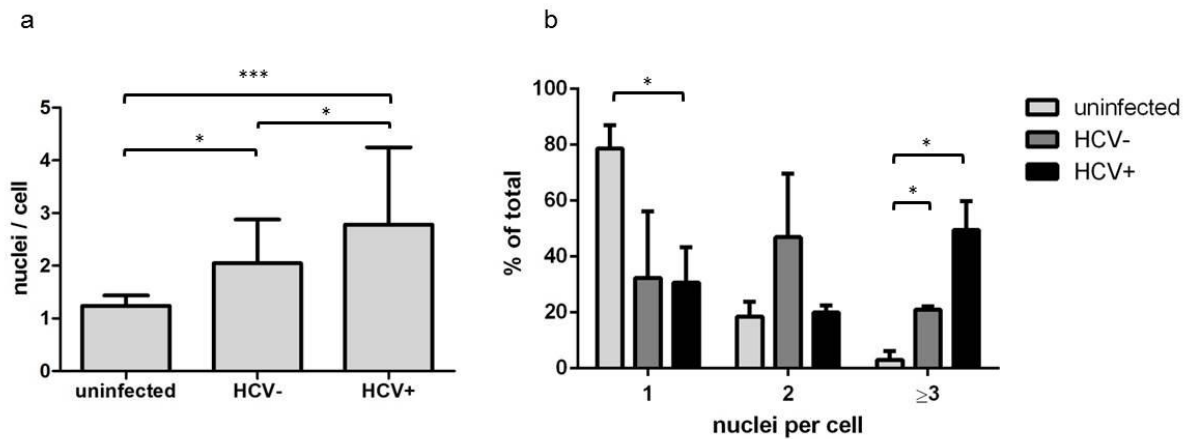
Blockierender EGF-Antikörper wurde, ab dem ersten Mediumwechsel nach Infektion mit HCV, bei jedem Mediumwechsel in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben (schwarze Balken). Nach 4 Wochen wurde BrdU für 90 min dem Zellkulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden intrazelluläre Antikörper-Färbungen auf HCV-core (zur Unterscheidung HCV- vs. HCV+ innerhalb der infizierten Proben) und BrdU durchgeführt. Der Anteil der BrdU-positiven Zellen ist als Mittelwert+SD aus drei biologischen Replikaten dargestellt.



## 2.6. BESTIMMUNG DER KERNZAHL HCV-INFIZIERTER HEPATOZYTEN

---

Wie bereits in 2.2 erwähnt, war in infizierten Proben die Entstehung von ungewöhnlich großen Zellen mit mehreren Zellkernen zu beobachten. Für verschiedene Viren ist die Entstehung von vielkernigen Zellen durch Zellfusion beschrieben und mit chromosomaler Instabilität und Tumorentstehung assoziiert [230]. Um Veränderungen in der Kernzahl zu erfassen, wurden, durch Färbung des Zell-Zell-Adhäsionsproteins  $\beta$ -Catenin, Zellmembranen sichtbar gemacht und Kerne/Zelle ausgezählt. Da auch in der gesunden Leber ein gewisser Anteil der Hepatozyten binukleär vorliegt, wurden dieselben Proben zudem mit der Unterscheidung „ein Kern“, „zwei Kerne“ oder „ $\geq$  drei Kerne“ ausgewertet. HCV-infizierte Zellen hatten im Mittel 2,8 Kerne, uninfizierte Nachbarzellen hatten durchschnittlich 2 Kerne und uninfizierte Huh7.5diff Zellen lagen bei 1,2 Kernen (Abb. 2.6.1a). Die Auswertung mit der Unterscheidung „ein Kern“, „zwei Kerne“ oder „ $\geq$  drei Kerne“ zeigte, dass uninfizierte Proben zu 79% aus Zellen mit einem Kern, zu 18% aus Zellen mit zwei Kernen und zu 3% zu Zellen mit drei oder mehr Kernen bestanden. Durch die HCV-Infektion nahm die Zahl der Zellen mit drei oder mehr Kernen signifikant zu: Unter HCV-positiven Zellen kamen sie 32mal häufiger und in benachbarten HCV-negativen Zellen immer noch 16mal häufiger vor als in uninfizierten Zellen uninfizierter Proben. Abb. 2.6.2 zeigt repräsentative Bilder für uninfizierte und infizierte Proben. Die Übersichtsbilder zeigen, dass zwar auch in den uninfizierten Proben in den einzelschichtigen Bereichen relativ große Zellen zu finden sind, diese aber dennoch vorwiegend nur einen Kern besitzen. Zudem sind die Kerne der uninfizierten Proben im Durchschnitt deutlich kleiner als die Zellkerne in den infizierten Proben.



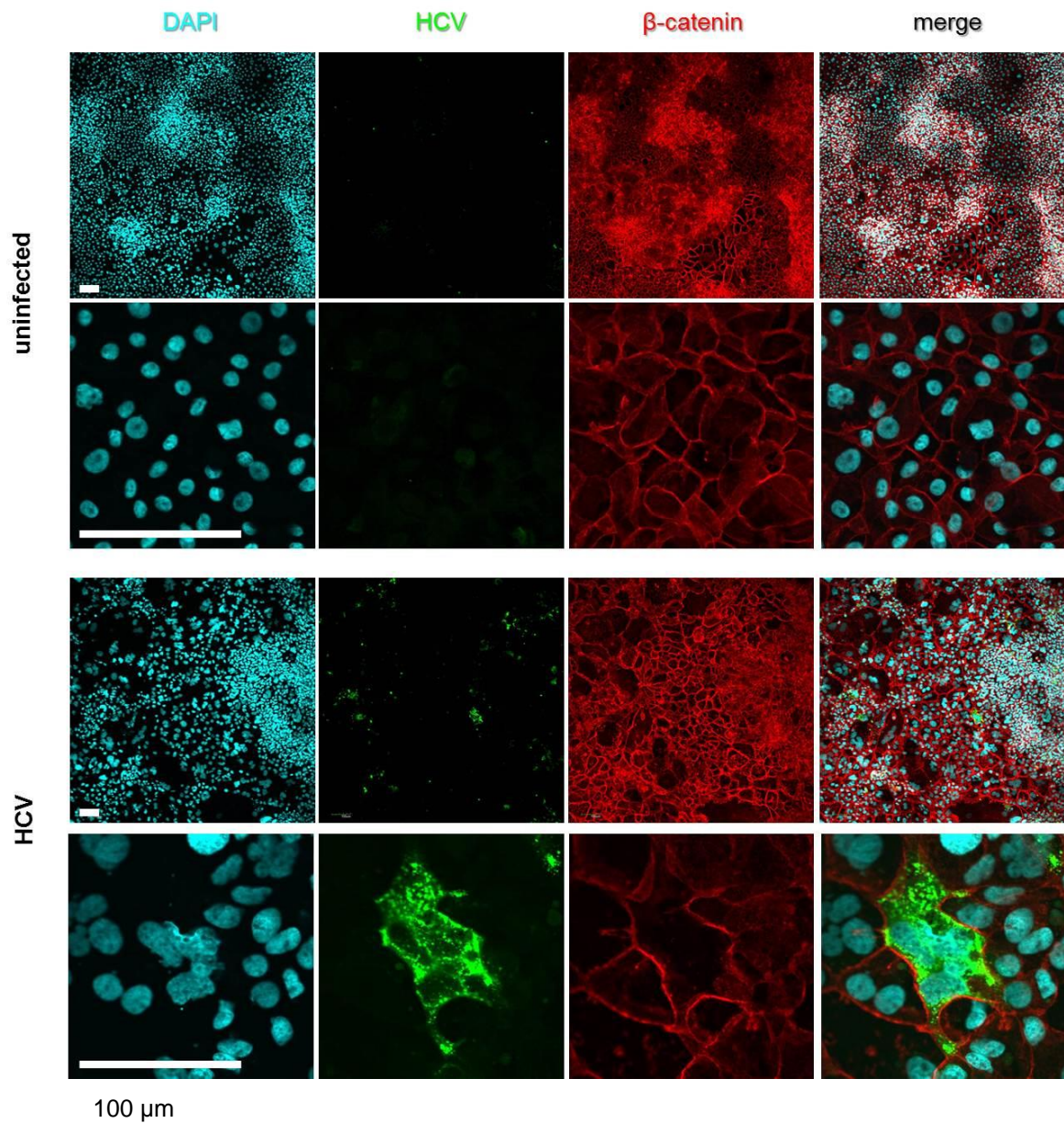
**Abbildung 2.6.1: HCV ist vermehrt in polynukleären Zellen zu finden.**

Durch Immunfluoreszenzfärbung auf  $\beta$ -Catenin wurden die Zellmembranen in uninfizierten und infizierten Huh7.5diff Zellen sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde eine Färbung auf HCV-core zur Unterscheidung zwischen HCV- und HCV+ innerhalb der infizierten Proben durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Kerne von insgesamt 222 uninfizierten, 77 HCV- und 77 HCV+ Zellen gezählt. Mittelwerte+SD sind dargestellt.

a.) zeigt die durchschnittliche Kernzahl pro Zelle.

b.) zeigt die Häufigkeit von Zellen mit einem, zwei bzw. drei oder mehr Kernen.

\* =  $p \leq 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 2.6.2: HCV infizierte Proben zeigen eine große Heterogenität in Bezug auf Zellgröße und Kernzahl.**

Durch Immunfluoreszenzfärbung auf  $\beta$ -Catenin wurden die Zellmembranen in uninifizierten und infizierten Huh7.5diff Zellen sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde eine Färbung auf HCV-core durchgeführt. Repräsentative Übersichtsbilder (jeweils obere Reihe) und charakteristische Ausschnitte (jeweils untere Reihe) sind gezeigt.

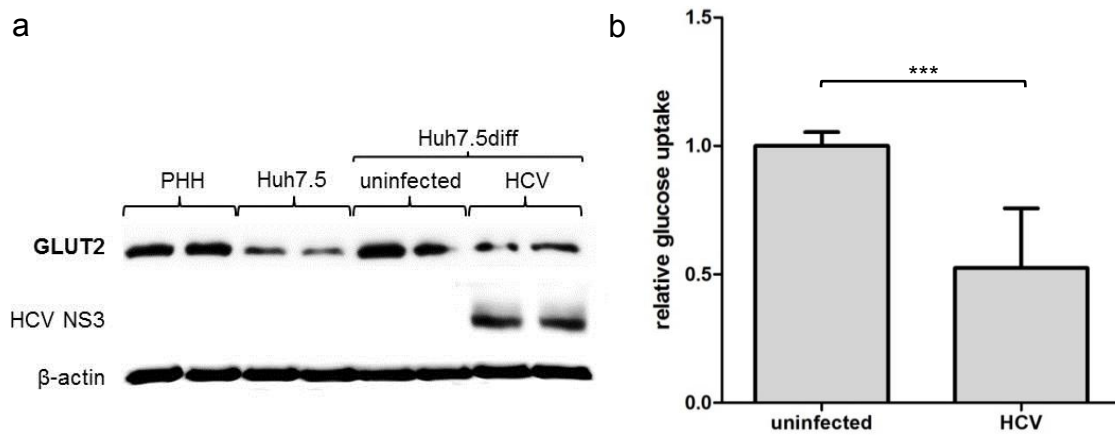
## 2.7. GLUCOSEAUFNAHMEFÄHIGKEIT VON HEPATOZYTEN NACH HCV INFEKTION

---

Da sich die ursprüngliche Hypothese der hepatischen IR nicht bestätigen ließ, fehlte mit den bis hier gezeigten Daten nach wie vor eine Erklärung für die beobachtete IR in CHC Patienten. Dabei können die erhöhte Glucosespiegel Ursache erhöhter Insulinspiegel sein. Daher wurden im Folgenden mögliche Ursachen für erhöhte Glucosespiegel untersucht, die sekundär eine IR verursachen. Da die Glucoseaufnahmefähigkeit der gesunden Leber enorm groß ist [110,113], könnte ihre Beeinträchtigung zu einem deutlichen Anstieg der Serumglucosespiegel führen. GLUT2 ist der leberspezifische Glucosetransporter, der für die hohe Glucoseaufnahmefähigkeit der Leber verantwortlich ist. Um zu untersuchen ob 1.) seine Expression vom Differenzierungsstatus der Zellen abhängig ist und 2.) die Expression durch HCV-Infektion verändert ist, wurde die GLUT2-Proteinexpression mittels Westernblotanalysen untersucht. Wie in Abb. 2.7a zu sehen ist, war die GLUT2 Proteinmenge in undifferenzierten Huh7.5 Zellen im Vergleich zu PHHs stark reduziert. Differenzierung erhöhte die GLUT2 Expression. Die Infektion mit HCV führte zu deutlich niedrigeren GLUT2 Spiegeln in Huh7.5diff Zellen.

Ob die reduzierte GLUT2 Proteinmenge für die Glucoseaufnahmefähigkeit der Zellen relevant war, wurde (in Imitation der Messung der, nach Passage der Leber, im Blut verbleibenden Glucose) indirekt, durch die Messung verbleibender Glucose im Medium erfasst. Die Ergebnisse zeigten, dass die Entfernung von Glucose aus dem Zellkulturmedium in HCV-infizierten Proben tatsächlich nur etwa halb so hoch war, wie in uninfizierten Proben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Abschnitts, dass die von HCV induzierte Dedifferenzierung von Huh7.5diff Zellen eine Reduktion des hepatischen Glucosetransporters GLUT2 mit sich zieht, was zu einer reduzierten Glucoseaufnahmefähigkeit der Zellen und daraus resultierend zu einer hohen im Überstand verbleibenden Glucose-Konzentration führt.



**Abbildung 2.7: HCV infizierte Huh7.5diff Zellen zeigen eine reduzierte Glucose-Aufnahmefähigkeit**

a.) Proteinlysate uninfizierter oder infizierter Huh7.5diff Zellen wurden mittels Westernblot auf die Expression von GLUT2 untersucht. Um einen Zusammenhang mit dem Differenzierungsstatus herstellen zu können, wurden zusätzlich Lysate von PHHs (isoliert von der chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, im Rahmen der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR), und proliferierende Huh7.5 Zellen („Huh7.5“, gleichzeitig mit Huh7.5diff ausgesät, Lyse bei 80-90% Konfluenz) analysiert. β-Aktin diente als Ladungskontrolle, HCV-NS3 als Kontrolle der Infektion. Pro Kondition wurden zwei biologische Replikate des selben Experiments aufgetragen. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

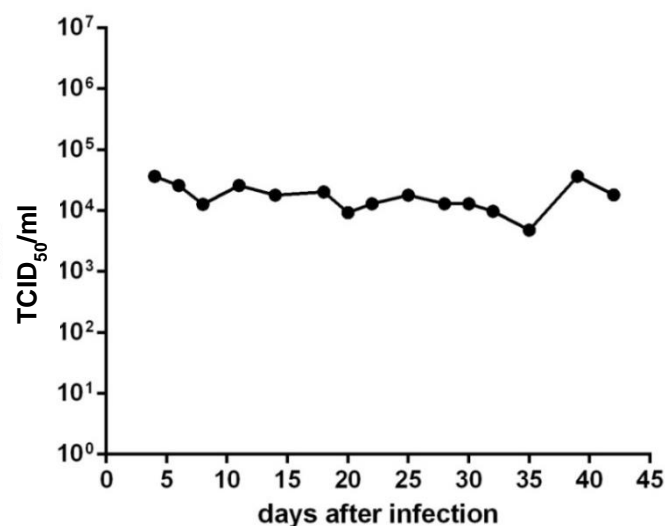
b.) Die Glucoseaufnahme uninfizierter und infizierter Huh7.5diff Zellen wurde indirekt durch die Messung verbleibender Glucose im Medium gemessen. Die berechnete Glucoseaufnahme wurde mittels Cell-Titer-Blue Viabilitätstest auf die Zellzahl normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu uninfizierten Zellen als Mittelwerte+SD aus drei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in biologischen Triplikaten) dargestellt.

\*\*\* =  $p \leq 0,001$ .

## 2.8. ÜBERPRÜFUNG DER BEOBACHTUNGEN IN OPTIMIERTEM VERSUCHSAUFBAU

Wie einleitend in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, zeigen proliferierende Zellen eine hohe Infizierbarkeit, wohingegen schon das Erreichen von Konfluenz und der dadurch induzierte zelluläre Wachstumsstopp die Infektion und Virusreplikation reduzieren. Da aufgrund der hohen Halbwertszeit von Hepatozyten (siehe Abschnitt 1.4.2) jedoch nicht davon auszugehen ist, dass das Hepatitis C Virus bei der Infektion einer gesunden Leber einen nennenswerten Anteil proliferierender Hepatozyten antrifft, wurden einige zentrale Experimente mit verändertem Aufbau wiederholt: Um die Situation im Menschen besser nachzustellen wurden Huh7.5-Zellen erst bei maximaler Differenzierung nach 4 Wochen mit Virusstock inokuliert und dann für weitere 4 Wochen kultiviert.

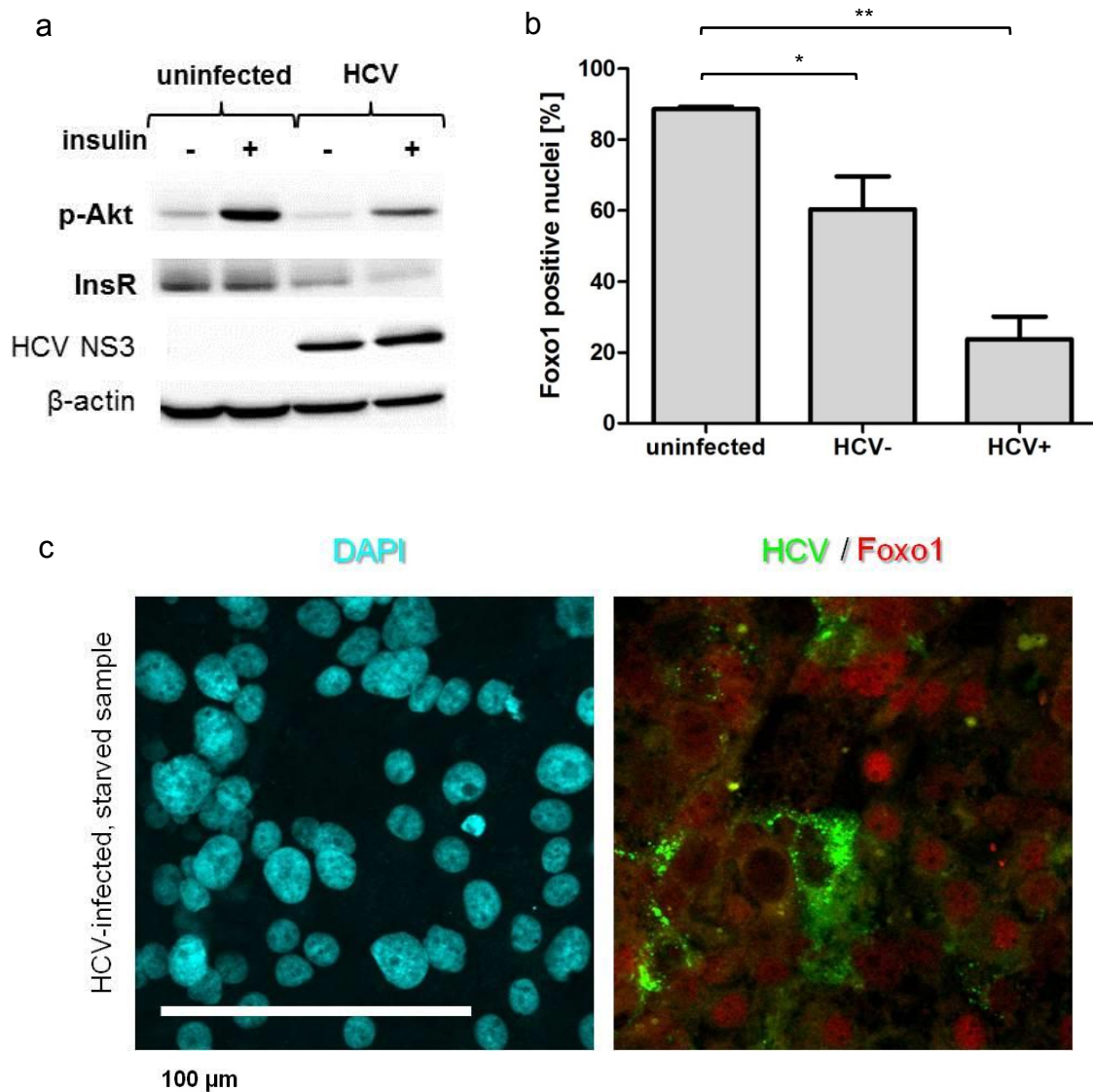
Abbildung 2.8.1 zeigt, dass auch in diesem, an die physiologische Situation angepassten, Versuchsaufbau eine dauerhafte, produktive Infektion möglich war. Die Virus-Titer im Überstand lagen im Bereich von  $10^4$  TCID<sub>50</sub> und damit etwa genauso hoch, wie im Versuchsablauf mit früher Infektion bei Erreichen der maximalen Differenzierung (Tag 28 oder später, Abschnitt 2.2.).



**Abbildung 2.8.1: Produktive Infektion von Huh7.5 Zellen nach maximaler Differenzierung**

Huh7.5 Zellen wurden differenziert und nach 4 Wochen mit HCV (0,01 TCID<sub>50</sub> / Zelle) infiziert. Im Zeitraum von 3-42 Tage nach Infektion wurde bei jedem Mediumwechsel Überstand zur späteren Titration bei -80°C eingefroren. Die Infektiösität des Überstands wurde durch TCID<sub>50</sub> bestimmt. Der erste Verdünnungsschritt der Titration betrug 1:18. Im Folgenden wurde 1:7 weiterverdünnt.





**Abbildung 2.8.2: Infektion von maximal differenzierten Huh7.5 Zellen mit HCV zeigt ähnliche Effekte auf den hepatozellulären Insulin-Signalweg, wie Infektion zu Beginn der Differenzierung.**

a.) Nach 8 min Insulinstimulation (+) oder Behandlung mit Kontroll-Medium (-) wurden Proteinlysate uninfizierter oder nach Differenzierung infizierter Huh7.5 Zellen hergestellt und mittels Westernblot auf aktiviertes Akt (p-Akt) und InsR untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle, HCV-NS3 als Kontrolle der Infektion. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

b.)/c.) Die hier gezeigten Färbungen wurden zum Großteil von Sören Fritsche im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt. Nach 16h Behandlung mit Depletionsmedium wurden uninfizierte oder nach Differenzierung infizierte Huh7.5 Zellen fixiert und auf Foxo1 sowie HCV-core-Protein gefärbt.

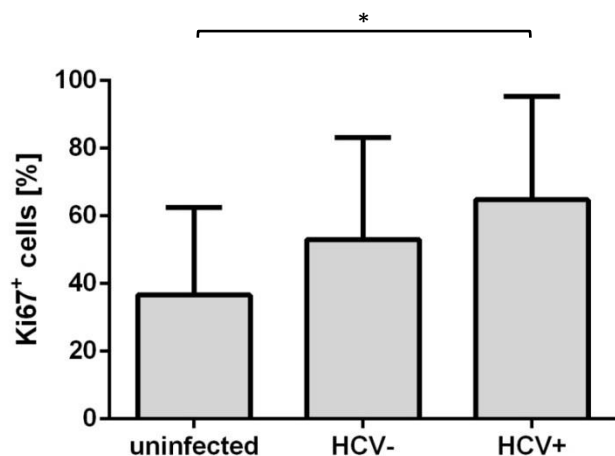
b.) zeigt die Quantifizierung der Foxo1-positiven Zellkerne. In drei unabhängigen Experimenten wurde insgesamt die Foxo1-Kernfärbung von 186 uninfizierten, 681 HCV- bzw. 256 HCV+ Zellen ausgewertet.

c.) zeigt ein repräsentatives Bild der HCV-Foxo1 Co-Färbung.

\* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ .

Im Folgenden wurden die Untersuchungen von InsR-Expression, Akt-Aktivierung, Foxo1-Lokalisation im Nukleus, Zellen mit Ki-67-positiven Kernen, Zellen in der S-Phase (BrdU-Färbung) und Glucose-Aufnahmefähigkeit mit Infektion nach maximaler Zelldifferenzierung wiederholt. Alle Experimente bestätigten die Beobachtungen aus dem Versuchsaufbau mit früher Infektion:

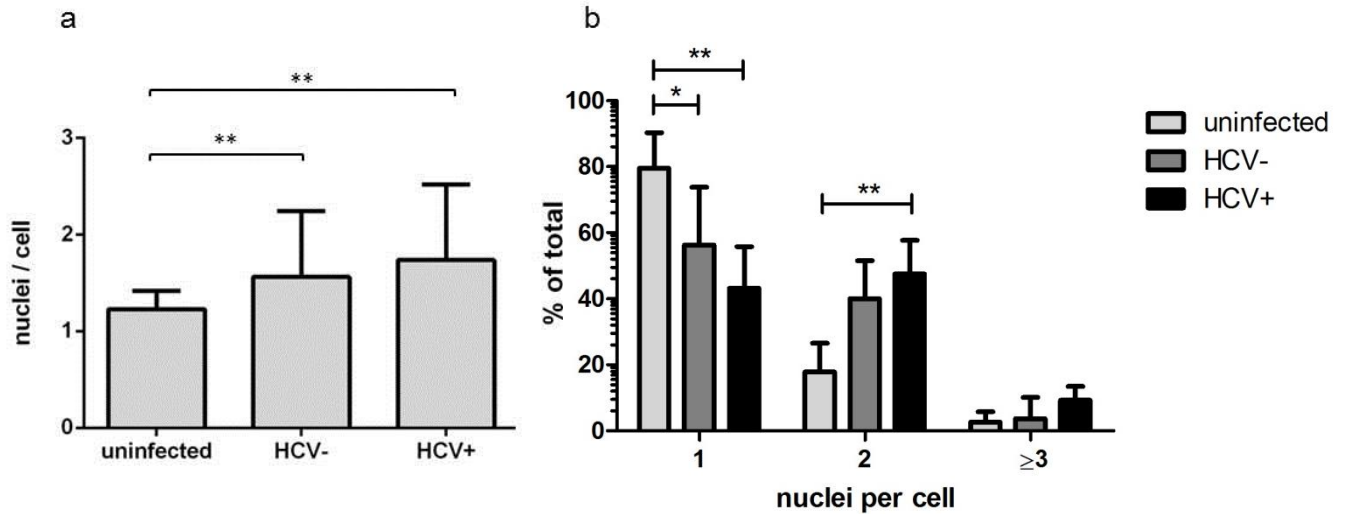
Westernblot-Analysen zeigten eine reduzierte Expression des InsR sowie eine reduzierte Akt-Aktivierung durch Insulin in HCV infizierten im Vergleich zu uninfizierten Proben (Abb. 2.8.2a). Auch der Anteil Foxo1-positiver Kerne war durch die HCV-Infektion, wie zuvor, signifikant reduziert. Wie in Abschnitt 2.3 war in uninfizierten Proben Foxo1 (nach 16h Insulin- und Glucose-Entzug) in knapp 90% aller Zellkerne zu detektieren. Im Gegensatz zu Proben in denen die Infektion zu einem frühen Zeitpunkt stattgefunden hatte, waren jedoch häufig Zellen mit Foxo1-positiven Kernen zwischen den HCV-positiven Zellen zu sehen (Abb 2.8.2c). Insgesamt zeigten 60% aller Kerne von uninfizierten Zellen infizierter Proben eine Foxo1-Kernfärbung. Auch HCV-infizierte Zellen zeigten 24% Foxo1-positive Zellkerne.



**Abbildung 2.8.3: Anstieg Ki67-positiver Kerne in maximal differenzierten Huh7.5 Zellen durch Infektion mit HCV.**

Immunfluoreszenzfärbungen auf Ki67 und HCV-core wurden an uninfizierten oder nach Differenzierung infizierten Huh7.5 Zellen durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten wurde in jeweils 10 mikroskopischen Feldern der Anteil Ki67-positiver Zellen ausgewertet. Daraus resultierende Mittelwerte+SD sind gezeigt.

\* =  $p \leq 0,05$ .



**Abbildung 2.8.4: Infektion von maximal differenzierten Huh7.5 Zellen mit HCV bestätigt eine Assoziation der Infektion mit Polynukleären Zellen.**

Durch Immunfluoreszenzfärbung auf  $\beta$ -Catenin wurden die Zellmembranen in uninfizierten oder nach Differenzierung infizierten Huh7.5 Zellen sichtbar gemacht. Zusätzlich wurde eine Färbung auf HCV-core durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten wurden die Kerne in insgesamt 273 uninfizierten, 118 HCV- und 118 HCV+ Zellen gezählt. Mittelwerte+SD sind dargestellt.

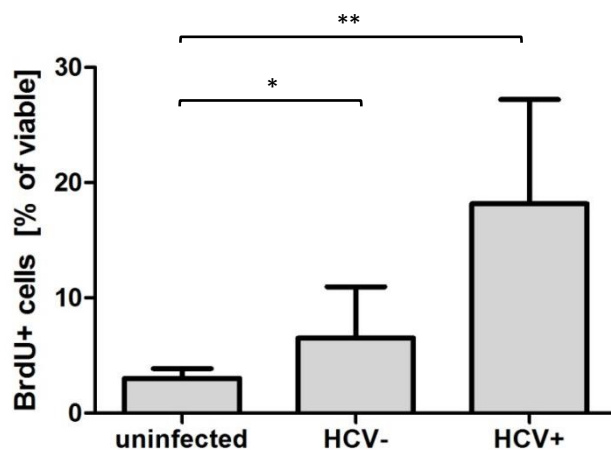
a.) zeigt die durchschnittliche Kernzahl pro Zelle.

b.) zeigt die Häufigkeit von Zellen mit einem, zwei bzw. drei oder mehr Kernen.

\* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ .

**Abbildung 2.8.5: Erhöhter Anteil an S-Phase Zellen in maximal differenzierten Huh7.5 Zellen durch Infektion mit HCV.**

Uninfizierten und nach Differenzierung infizierten Huh7.5 Zellen wurde für 90 min BrdU ins Zellkulturmedium hinzugefügt. Anschließend wurden intrazelluläre Antikörper-Färbungen auf HCV-core (zur Unterscheidung HCV- vs. HCV+ innerhalb der infizierten Proben) und BrdU durchgeführt. Mittelwerte+SD der BrdU-positiven Zellen aus drei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in biologischen Duplikaten bzw. Triplikaten) sind dargestellt. \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ .



Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten den in Abschnitt 2.4 beobachteten Anstieg Ki67-positiver Kerne (uninfiziert: 25%, HCV-: 43%, HCV+: 51% Ki67-positive Kerne) (Abb. 2.8.3) sowie das vermehrte Auftreten polynukleärer Zellen in den HCV-

infizierten Proben (binukleäre Zellen: 2,6mal bzw. 3,2mal häufiger; Zellen mit mehr als 3 Kernen: 1,8mal bzw. 7,5mal häufiger in HCV- bzw. HCV+ Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen aus uninfizierten Proben). Anders als bei den Experimenten mit frühem Infektionszeitpunkt war außerdem ein signifikanter Anstieg der Zellen mit zwei Kernen, von 18% in uninfizierten Proben auf 40% bzw. 48% in den HCV- bzw. HCV+ Zellen der infizierten Proben, zu beobachten (Abb. 2.8.4).

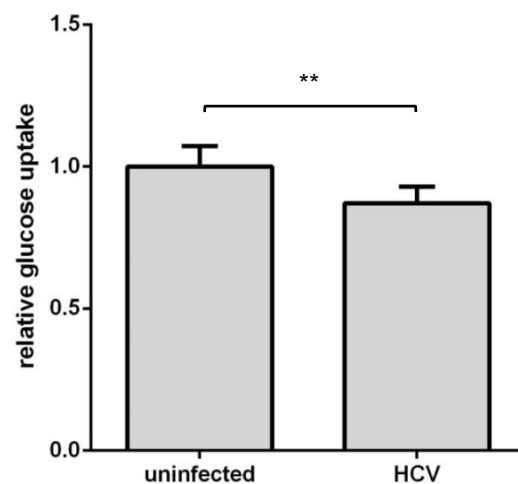
Der Anteil der S-Phase-Zellen stieg auch in diesem Versuchsaufbau von 3% in uninfizierten Proben auf 14% und 6% für HCV-core-positive bzw. -negative Zellen der infizierten Proben (Abb. 2.8.5).

Nicht zuletzt konnte wie zuvor eine signifikante Reduktion der Glucoseaufnahme um ca. 13% gemessen werden.

Zusammengefasst konnten alle Ergebnisse aus dem Versuchsaufbau mit frühem Infektionszeitpunkt, im optimierten, der physiologischen Situation angepassten Modell bestätigt werden.

**Abbildung 2.8.6: HCV-Infektion von Huh7.5 Zellen nach maximaler Differenzierung reduziert deren Glucose-Aufnahmefähigkeit.**

Die Glucoseaufnahme uninfizierter und nach Differenzierung infizierter Huh7.5 Zellen wurde indirekt durch die Messung verbleibender Glucose im Medium gemessen. Die berechnete Glucoseaufnahme wurde mittels Cell-Titer-Blue Viabilitätstest auf die Zellzahl normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu uninfizierten Zellen als Mittelwerte+SD aus zwei unabhängigen Experimenten (durchgeführt in biologischen Triplikaten) dargestellt. \*\* =  $p \leq 0,01$ .



### 3. DISKUSSION

---

---

#### 3.1. HUH7.5DIFF ZELLEN STELLEN EIN NEUES MODELL ZUR UNTERSUCHUNG METABOLISCHER VERÄNDERUNGEN IN CHRONISCHER HCV-INFEKTION DAR

---

Wie einleitend in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, war und ist die Erforschung von HCV und der durch HCV verursachten Veränderungen im infizierten Menschen stark durch die verfügbaren Modelle limitiert. Seit es Wakita et al. 2005 gelang, mit einem HCV-Isolat aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis Huh7 Zellen produktiv zu infizieren, wird dieses Modell bzw. seine Modifikationen weltweit verwendet [85,224]. Als proliferierende Tumorzellen unterscheiden sich Huh7 Zellen jedoch in vielerlei Hinsicht stark von den wachstumsarretierten, polarisierten Zellen, die HCV in einer gesunden Leber infiziert. Die Aussagekraft von mit diesem Modell erhaltenen Ergebnissen über die Situation im infizierten Menschen ist somit fraglich, vor allem wenn Effekte des Virus auf die Wirtszelle untersucht werden. Wie in Abschnitt 1.2 am Beispiel des Glucosestoffwechsels beschrieben wurde, unterscheiden sich der Stoffwechsel der Leber und seine Regulation stark von den entsprechenden Vorgängen in peripheren Organen. Durch Gluconeogenese sorgt die Leber unter großem Energieaufwand (6 Mol ATP für 1 Mol Glucose) für eine stabile Glucoseversorgung anderer Organe [231]. Obwohl solche Stoffwechselforgänge auf der Ebene des Gesamtorganismus essentiell sind, bedeuten sie für die einzelne Zelle einen Energieverlust. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Gluconeogenese in Tumorzellen, wie hier in der Hepatomazelllinie Huh7.5, kaum detektierbar ist (vgl. Abb. 2.1.3). Um dennoch mit diesen hoch permissiven Zellen arbeiten zu können, war das erste Ziel der hier vorgestellten Arbeit, ein Differenzierungsprotokoll zu entwickeln, dass wieder zur Expression eines hepatozyten-typischen Glucosestoffwechsel in Huh7.5 Zellen führte. Sainz und Chisari beschrieben 2006 ein Modell, bei dem durch Zugabe von 1% DMSO zum Kulturmedium von Huh7 Zellen für zwei Wochen die Differenzierung von Huh7 Zellen erreicht wurde [4]. Verschiedene Gruppen übertrugen das Protokoll seitdem auf Huh7.5 Zellen und zeigten beispielsweise, dass dies ein, im Vergleich zu undifferenzierten Huh7.5 Zellen, deutlich verbessertes Modell der IFN-induzierten antiviralen Reaktionen in persistenter HCV-infektion darstellt [94,232].

Obwohl DMSO für verschiedene Zelllinien zur Differenzierung eingesetzt wird, ist nach wie vor nicht genau verstanden wie DMSO zur Differenzierung von Zellen führt [98,233,234]. Man weiß jedoch, dass es eine Vielzahl von Signalwegen beeinflussen kann und somit deren Untersuchung – hier im Zusammenhang mit HCV Infektion – schwierig macht [93]. Obwohl die Differenzierung mit DMSO auch die Expression und Funktionalität der für die hier präsentierte Arbeit entscheidenden Signalwege erhöhte (Daten nicht gezeigt), wurde daher von der Verwendung von DMSO Abstand genommen. Stattdessen wurde durch Kombination von Medienzusätzen, die in unserem Labor zur Differenzierung von HepaRG Zellen und zur Kultivierung von PHHs verwendet werden, ein neues Protokoll zur Differenzierung von Huh7.5 Zellen etabliert. Durch dieses Protokoll stieg nicht nur die Expression aller untersuchten Moleküle des hepatischen Insulinsignalwegs an (der Insulin Rezeptor, die Kinase Akt, der Transkriptionsfaktor Foxo1 und schließlich die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese: PEPCK und G-6-Pase), sondern es wurde vor allem ihre Regulierbarkeit durch Insulin sichtbar (vgl. Abb. 2.1.3, Abb. 2.1.4). Differenzierung mit Expression und Regulierbarkeit des Insulinsignalwegs gleichzusetzen ist insofern gerechtfertigt, als, wie zuvor erwähnt, Gluconeogenese und ihre Regulation spezifisch für differenzierte Hepatozyten sind [161,226]. Ergebnisse aus den späteren Untersuchungen des Differenzierungsgrades von Huh7.5diff Zellen nach HCV Infektion an vom Insulinsignalweg unabhängigen Differenzierungsmarkern bestätigten nachträglich den hohen Differenzierungsgrad von Huh7.5diff Zellen: Die Expression von OATPC und BSEP, zwei Transportern die in der basolateralen bzw. caniculären Membran polarisierter Hepatozyten lokalisieren, lag beinahe so hoch wie in primären Hepatozyten und die Expression von Ki67 sowie die Aufnahme von BrdU, beides Marker für proliferierende Zellen, war nur in wenigen Zellen zu beobachten (vgl. Abb. 2.4.1) [156,228,235].

In Infektionskinetiken konnte gezeigt werden, dass eine persistierende, produktive Infektion von Huh7.5diff Zellen möglich war (vgl. Abb. 2.2.1, Abb. 2.2.3). Die Virustiter im Zellkulturüberstand waren mit ca.  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml in etwa genauso hoch, wie für mit DMSO differenzierte Huh7.5 Zellen beschrieben wurde [94]. Mit etwa 10-15% lag der Anteil infizierter Zellen deutlich niedriger als für die Differenzierung mit DMSO beschrieben (40% infizierte Zellen) [94]. Obwohl dies die Analyse der Proben erschwert, kann es gleichzeitig als Bestätigung des Modells gewertet werden, da bei chronischer HCV-Infektion in der humanen Leber ebenfalls nur etwa 7-20% der

Hepatozyten infiziert sind [52]. In der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei verschiedene Infektionszeitpunkte gewählt. In einem Fall wurden die Proben am Beginn der Differenzierung, an dem sich die Zellen noch in Proliferation befanden, infiziert, im anderen Fall fand die Infektion nach 4 Wochen, bei Erreichen der maximalen Zelldifferenzierung, statt. Aufgrund der hohen Halbwertszeit von Hepatozyten von 6-12 Monaten ist nicht davon auszugehen, dass das Hepatitis C Virus bei der Infektion einer gesunden Leber einen nennenswerten Anteil proliferierender Hepatozyten antrifft [167]. In der chronischen HCV-Infektion jedoch treffen neugebildete Viren durchaus auf undifferenzierte, proliferierende Zellen: Chronische HCV-infizierte Patienten weisen erhöhte Alanin-Aminotransferase (ALT)-Spiegel im Serum auf, die auf eine Leberzellschädigung hinweisen [236]. Diese scheint vorwiegend auf virusspezifische CD8+-T-Zell-Aktivität zurückzuführen zu sein – HCV selbst zeigt in Patienten keine Cytotoxizität [237,238]. Die immunvermittelte Leberschädigung bedingt eine kompensatorische Proliferation von Hepatozyten, und diese in Proliferation befindlichen oder noch nicht vollständig differenzierten Zellen können dann von im Blut zirkulierenden oder direkt von benachbarten Zellen freigesetzten Viren infiziert werden. Die Infektion undifferenzierter Hepatozyten kann diesen Aspekt indirekt nachstellen und erlaubt es, die Effekte von HCV-Infektion auf undifferenzierte Zellen im Verlauf der Differenzierung zu untersuchen. Im Großteil der Experimente (Abschnitte 2.3 – 2.7) fand die Infektion am Beginn der Differenzierung statt, Untersuchungen mit Infektion nach maximaler Differenzierung zeigten jedoch keine grundsätzlich unterschiedlichen Ergebnisse (Abschnitt 2.8). In den folgenden Abschnitten 3.2 und 3.3 wird daher nicht extra auf die Ergebnisse aus Experimenten mit letzterem Versuchsaufbau eingegangen. In Abschnitt 3.4 wird die Bedeutung der immunvermittelten Leberschädigung sowie anderer hepatotoxischer Noxen erneut aufgegriffen.

Zusammengefasst stellen die in dieser Arbeit etablierten Huh7.5diff Zellen in zwei Aspekten ein proliferierendes Zellen deutlich überlegenes Modell zur Untersuchung metabolischer Veränderungen in chronischer HCV-Infektion dar: Der typische Metabolismus von Hepatozyten wird deutlich besser wiedergespiegelt als in proliferierenden Huh7.5 Zellen und die Persistenz der Viren zeigt den Aspekt der Chronizität auf. Somit war es nun möglich, metabolische Veränderungen aufgrund chronischer HCV-Infektion im Zellkulturmodell genauer zu untersuchen.

### 3.2. HCV-INFektion FÜHRT ZU VERÄNDERUNGEN DES HEPATOZELLULÄREN INSULINSIGNALWEGS, JEDOCH NICHT ZU INSULIN RESISTENZ

---

Chronische HCV Infektion ist mit einem erhöhten Risiko T2DM zu entwickeln assoziiert [126]. Da auch im Vergleich zu chronischer HBV-Infektion bei CHC Patienten das T2DM-Risiko erhöht ist und außerdem keine Korrelation proinflammatorischer Cytokine mit T2DM vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die initialen Schritte in der T2DM-Entstehung bei CHC direkt auf HCV, d.h. auf Effekte viraler Proteine auf die Hepatozyten, zurückzuführen sind [133,239].

Bereits 1987 wurde hepatische IR bei Patienten mit T2DM beschrieben [240]. Heute ist allgemein akzeptiert, dass hepatische IR eine wichtige Rolle in der Entstehung von T2DM spielt [241–243]. Kim et al. zeigten 2002 in einem Modell für das Metabolische Syndrom, dass der peripheren IR eine hepatische IR vorangeht [134]. Die Ausgangshypothese dieser Arbeit war daher, dass die HCV-Infektion der Leber zu hepatischer IR führt, die dann eine sekundäre, periphere IR nach sich zieht. Bevor zugrundeliegende molekulare Mechanismen untersucht werden konnten, wurde zunächst überprüft, ob mit HCV infizierte Huh7.5diff Zellen die erwartete IR zeigten. Da IR in Hepatozyten nur die Regulation des Glucosestoffwechsels, aber nicht die Regulation des Lipidstoffwechsel zu betreffen schein, ist die Regulation der Gluconeogenese der am besten geeignet Messwert der Insulinsensitivität von Hepatozyten [123–125]. Daher wurde die Regulation der Gluconeogenese-Schlüsselenzyme (G-6-Pase und PEPCK) durch Insulin, sowie der für ihre Expression verantwortliche Transkriptionsfaktor (Foxo1) untersucht. Zusätzlich wurde die Aktivierung von der den Transkriptionsfaktor Foxo1 regulierenden Kinase Akt und die Expression des InsR in infizierten Huh7.5diff Zellen bestimmt. Insulin führt über die Aktivierung des InsR zur Aktivierung von Akt, das im Nukleus befindliches Foxo1 inaktivieren kann und damit die Transkription von G-6-Pase und PEPCK stoppt [220]. Demnach sollte, in insulinresistenten, HCV-infizierten Hepatozyten die Expression beider Enzyme trotz Insulinsignal fortgeführt werden. Überraschenderweise zeigten G-6-Pase und PEPCK mRNA Spiegel zwar signifikante Veränderungen in HCV-infizierten Proben, diese entsprachen aber in keiner Weise der erwarteten IR. Im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen war die Expression nach Insulinstimulation deutlich reduziert und selbst nach 16h Glucose-, FCS- und Insulinentzug blieb die Expression äußerst niedrig (vgl. Abb.2.3.3). Dong et al. zeigten, dass der Knockout von Insulin Rezeptor Substraten in der Leber von



Mäusen dazu führte, dass die Transkription von PEPCK und G-6-Pase dauerhaft stimuliert war. Eine zusätzliche Inaktivierung von Foxo1 führte zur Normalisierung der PEPCK und G-6-Pase Expression und zur Reversion des Diabetes [244]. Daher wurden in der hier vorgestellten Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen auf Foxo1 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente erklärten die Beobachtung der stark reduzierten PEPCK und G-6-Pase Expression: statt, wie unter der Hypothese der IR erwartet, trotz Insulinsignal im Zellkern zu lokalisieren und die Transkription der Gluconeogenese-Enzyme zu fördern, war Foxo1 in HCV-infizierten Zellen auch ohne Insulin nicht im Zellkern zu finden (vgl. Abb. 2.3.2). Westernblotergebnisse legten nahe, dass die fehlende Lokalisation im Kern auf reduzierte Foxo1-Expression zurück zu führen war (vgl. Abb. 2.3.2). Da die kurzfristige Regulation von Foxo1 durch Insulin über posttranslationale Modifikation (Phosphorylierung durch Akt) und nicht durch Änderung der Proteinexpression stattfindet, war nicht zu erwarten, die Erklärung für die verminderte Foxo1-Expression in oberhalb gelegenen Schritten des Insulinsignalwegs zu finden. Dennoch sind die Ergebnisse der Untersuchung der InsR Expression und Akt-Aktivierung interessant, denn auch hier zeigte sich eine Reduktion durch HCV, die, ohne die Daten zu Foxo1, PEPCK und G-6-Pase zu kennen, auf IR hätte schließen lassen. Die reduzierte Expression und Aktivierung von Akt (vgl. Abb. 2.3.1) ist auch unabhängig vom Insulinsignalweg von Interesse, da Akt eine zentrale Rolle im Signalweg vieler Wachstumsfaktoren spielt [245]. Die reduzierte Akt Aktivierung durch Insulin könnte zum Teil durch die beobachtete reduzierte Expression des Proteins selbst und zum anderen Teil durch reduzierte InsR Expression erklärt werden. In letzterem Fall wäre die reduzierte Aktivierung als spezifisch für das Insulinsignal anzusehen, im ersten Fall wäre jedoch auch von einer Einschränkung von Signalwegen verschiedener Wachstumsfaktoren auszugehen. Die zusätzliche Untersuchung der GSK3 $\beta$  Expression zeigte, dass keines von beidem der Fall war: GSK3 $\beta$  ist, wie zuvor erwähnt, ein Inhibitor der Glycogensynthese und ebenfalls Substrat von Akt. Akt-Aktivierung durch Insulinsignal führt zur Serin-Phosphorylierung und damit Inaktivierung von GSK3 $\beta$ . Somit wird die Glycogensynthese, entsprechend der Glucoseverfügbarkeit, über den Insulinsignalweg reguliert [246]. Überraschenderweise fand in infizierten Proben trotz reduzierter Akt-Aktivierung eine Serin-Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  durch Insulinsignal statt (vgl. Abb. 2.3.1). Dies bedeutet, dass der obere Bereich des Insulinsignalwegs trotz reduzierter InsR und Akt Expression weiterhin funktional war.

Bereits ohne Insulin war nach HCV-Infektion, im Vergleich zu uninfizierten Proben, eine verstärkte GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung zu beobachten (vgl. Abb. 2.3.1). GSK3 $\beta$  reguliert nicht nur die Glycogensynthese, sondern spielt eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg. Dieser reguliert über  $\beta$ -Catenin die Transkription einer Vielzahl von Genen, die für die Proliferation und Differenzierung wichtig sind. In Abwesenheit extrazellulärer Wnt-Liganden liegt  $\beta$ -Catenin in cytoplasmatischen Komplexen vor. Ein Bestandteil dieser Komplexe ist GSK3 $\beta$ . Kommt es durch Wnt-Liganden zur Aktivierung des Signalwegs, so wird GSK3 $\beta$ , in gleicher Weise wie durch Akt, phosphoryliert und dadurch inaktiviert [247]. Aktivierung des Wnt-Signalwegs könnte daher Ursache der verstärkten GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung sein. Tatsächlich wurden sowohl für HCV-core, als auch für HCV-NS5A Effekte auf den Wnt-Signalwege und eine erhöhte GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung beschrieben und die dadurch induzierte Zellproliferation in Zusammenhang der HCV-assoziierten Karzinogenese diskutiert [248,249].

Die Veränderungen im Insulinsignalweg in infizierten Huh7.5diff Zellen scheinen damit aus verschiedenen, unabhängigen Teilen zu bestehen: der reduzierten Foxo1 Expression und damit reduzierten Expression der Gluconeogenese-Enzyme, der reduzierten Expression und Aktivierung der ersten Schritte des Signalwegs (InsR, Akt) und der Aktivierung zusätzlicher, mit dem Insulinsignalweg verknüpfter Signalwege (Wnt-Signalweg, GSK3 $\beta$ ). Es ist jedoch auffallend, dass alle Veränderungen durch HCV den Ergebnissen in undifferenzierten Zellen ähneln (im Vergleich zu Huh7.5diff niedrigere InsR Expression, niedrigere Akt-Aktivierbarkeit, Foxo1 nicht im Nucleus detektierbar und niedrig exprimiert, niedrige Expression von G-6-Pase und PEPCK, siehe Abschnitt 2.1). Vor allem die Reduktion der häufig als Hepatozyten-Differenzierungsmarker verwendeten Enzyme PEPCK und G-6-Pase ließ daher eine Dedifferenzierung der Hepatozyten durch HCV vermuten [161,226].

Deng et al. untersuchten ebenfalls Veränderungen im Insulinsignalweg HCV-infizierter Hepatozyten, jedoch im Modell der undifferenzierten Huh7.5 Zellen. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Experimenten wurde dabei eine erhöhte Akt-Aktivierung, eine Akkumulation von Foxo1 im Nucleus, sowie eine erhöhte PEPCK- und G-6-Pase- Expression beobachtet [103]. Die Ergebnisse sind damit genau gegensätzlich zu den Beobachtungen der hier vorgestellten Arbeit und scheinen (auch wenn die Akkumulation von Foxo1 im Nucleus trotz erhöhter Akt-Aktivierung nicht erklärt werden kann) eine IR HCV-infizierter Zellen zu bestätigen. Allerdings

führten Deng et al. in ihren Experimenten keine Insulinstimulationen durch, d.h. sie verglichen lediglich die basale und nicht die insulinstimulierte Akt-Aktivierung, Foxo1-Lokalisation und PEPCK- bzw. G-6-Pase-Genexpression in uninfizierten und infizierten Proben [103]. Eigene im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente bestätigten die im Vergleich zu uninfizierten Zellen erhöhte basale Akt-Aktivierung in proliferierenden Huh7.5 Zellen (nicht gezeigt). Auch die insulinstimulierte Akt-Aktivierung fiel bei proliferierenden Huh7.5 Zellen in infizierten Proben stärker aus als in uninfizierten Proben (nicht gezeigt). Foxo1 konnte, wie zuvor beschrieben, in proliferierenden Huh7.5 Zellen nicht im Kern detektiert werden und dies änderte sich auch durch die HCV-Infektion nicht (nicht gezeigt). Auch die Untersuchung der Expression von G-6-Pase und PEPCK in proliferierenden Zellen bestätigte die Ergebnisse von Deng et al. nicht: in eigenen Experimenten führte HCV-Infektion in proliferierenden Huh7.5 Zellen zu einer minimalen weiteren Reduktion der ohnehin niedrigen Expression (nicht gezeigt). Wieso praktisch gleiche Experimente in unterschiedlichen Laboren für Foxo1, G-6-Pase und PEPCK zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, aktuell nicht erklärt werden. Die sowohl von Deng et al. als auch in eigenen Experimenten beobachtete Induktion von Akt durch HCV in proliferierenden Zellen im Vergleich zur Akt-Hemmung durch HCV in Huh7.5diff Zellen könnte durch die zuvor beschriebene, unterschiedliche basale Akt-Expression in proliferierenden vs. differenzierten Zellen erklärt werden. Da proliferierende Zellen nur geringe Mengen an Akt exprimieren und zudem allgemein wesentlich stressanfälliger sind als Huh7.5diff Zellen (nicht gezeigt), könnte eine Induktion von Akt als anti-apoptotisches Signal die Zellen davor schützen in Apoptose zu gehen, wie es für verschiedene andere Viren gezeigt wurde [250–252]. Ein direkter Vergleich infizierter und uninfizierter Proben proliferierender und differenzierter Huh7.5 Zellen könnte klären, ob die resultierende Akt-Aktivität durch HCV-induzierte Stimulation, ausgehend von einer niedrigen Aktivität in proliferierenden Zellen, bzw. die HCV-induzierte Reduktion, ausgehend von einer hohen Aktivität in Huh7.5diff Zellen, möglicherweise am Ende in gleicher Akt-Aktivierung resultiert.

Ergebnisse aus Biopsiematerial legen nahe, dass die Ergebnisse aus Huh7.5diff Zellen der Situation im Menschen entsprechen und die Beobachtungen aus proliferierenden Huh7.5 Zellen ein Artefakt des unnatürlichen Modells sind: Aytug et al. untersuchten die ersten Schritte des Insulinsignalwegs in Biopsiematerial von CHC Patienten und gesunden Kontrollen und zeigten, dass die Aktivierung von Akt

durch *ex-vivo* Stimulation mit Insulin in Proben aus CHC Patienten wesentlich schwächer ausfiel, als in Probenmaterial aus gesunden Personen [137]. Dies entspricht den Beobachtungen in HCV-infizierten im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen (vgl. Abb. 2.3.1). Auch die Expression des InsR war in HCV-infizierten Patienten, wie in HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen, im Vergleich zu uninfizierten Proben reduziert (vgl. Abb. 2.3.1)[137]. Da Foxo1, PEPCK und G-6-Pase in den Experimenten von Aytug et al. nicht untersucht wurden, folgerten sie, dass die reduzierte InsR Expression und Akt-Aktivierung die Ursache der in den Patienten beobachteten IR sein könnte. Geht man davon aus, dass Huh7.5diff Zellen die Situation im Patienten richtig widerspiegeln, so kann angenommen werden, dass auch bei Aytug et al. eine Dedifferenzierung die Ursache der reduzierten InsR Expression und Akt-Aktivierung war und eine Untersuchung von Foxo1, PEPCK und G-6-Pase ebenso wie in Huh7.5diff Zellen eine Reduktion in HCV-positiven Proben gezeigt hätten.

Die Abnahme der Zelldifferenzierung ist eine Voraussetzung für den Wiedereintritt in den Zellzyklus und beides gehört zu den ersten Schritten der Entstehung von Tumorzellen [253]. In Hinblick auf das bereits erwähnte hohe HCC Risiko bei CHC, untersuchten bereits einige Studien die mögliche onkogene Wirkung einzelner HCV Proteine [50]. Für NS3, NS5A und core-Protein konnten Interaktionen mit Tumorsuppresorproteinen bzw. Veränderungen der DNA-Reparaturmechanismen gezeigt werden [56–59]. Veränderungen im Differenzierungsstatus infizierter Zellen konnten, da die Experimente vorwiegend durch Expression der einzelnen Proteine in undifferenzierten Zellen durchgeführt wurden, nicht beobachtet werden. Dies unterstreicht ein weiteres Mal die Vorteile der Verwendung differenzierter gegenüber proliferierenden Zellen in der Untersuchung von HCV-induzierten zellulären Veränderungen.

Zusammenfassend konnte in Huh7.5diff Zellen nach HCV-Infektion wieder Erwartet keine IR beobachtet werden. Vielmehr deuten die Veränderungen auf eine Dedifferenzierung hin, die in weiteren Experimenten untersucht wurde und im nächsten Abschnitt diskutiert wird. Die einzelnen beobachteten Veränderungen im Insulinsignalweg stimmen soweit Daten aus Patientenmaterial verfügbar sind mit diesen überein, sind jedoch teilweise gegensätzlich zu Daten aus proliferierenden Huh7.5 Zellen. Dies unterstreicht einmal mehr die eingeschränkte Aussagekraft von aus dem Modell proliferierender Zellen erhaltenen Daten und bestätigt die in dieser

Arbeit etablierten Huh7.5diff Zellen als geeignetes Modell zu Untersuchung von Veränderungen in chronischer HCV-Infektion.

### **3.3. HCV INDUZIERT ÜBER WACHSTUMSFAKTOREN DIE DEDIFFERENZIERUNG UND DEN S-PHASE-ARREST VON HEPATOZYTEN**

---

Bereits die Ergebnisse aus der Infektionskinetik in Abschnitt 2.2 zeigten einen Zusammenhang zwischen HCV-Infektion und Differenzierungsgrad der infizierten Zellen. Wie für die Infektion von proliferierenden Huh7.5 Zellen mit HCV Jc1 beschrieben, kam es innerhalb weniger Tage zu einer Infektion aller Zellen [87]. Sobald jedoch Zellkonfluenz erreicht war, ging der Anteil infizierter Zellen und mit ihm die Menge freigesetzter Viren zurück (vgl. Abb. 2.2.1). Wachstumsarrest und Differenzierung scheinen sich also nachteilig auf die HCV-Replikation auszuwirken. Daten aus Experimenten mit HupaRG Zellen, die mit HCV aus Patientenserum infiziert wurden, bestätigen dies: nur undifferenzierte, proliferierende HepaRG Zellen waren zu einem gewissen Grad mit HCV infizierbar [254].

HCV-induzierte Dedifferenzierung würde daher eine aktive Induktion von offensichtlich für die virale Replikation günstigen, zellulären Gegebenheiten bedeuten.

Die Untersuchung von zusätzlichen Differenzierungsmarkern (OATPC und BSEP) bestätigte eine Dedifferenzierung HCV-infizierter Proben. Wie erwartet zeigten PHHs, als Kontrolle differenzierter Zellen, die höchste Expression, gefolgt von uninfizierten Huh7.5diff Zellen, wachstumsarretierten Huh7.5 Zellen und schließlich proliferierenden Huh7.5 Zellen. Die OATPC- und BSEP-Genexpression HCV-infizierter Huh7.5diff Zellen im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen war signifikant reduziert und lag sogar niedriger als in undifferenzierten, wachstumsarretierten Kontrollen (vgl. Abb. 2.4.1). Dies lässt vermuten, dass ein Teil der Zellen wieder in den Zellzyklus eingetreten war und proliferierte (es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass am Endpunkt der Experimente nur 10-15% der Zellen infiziert waren). Expressionsanalysen einer Zusammenstellung von 16 Genen, mit der sich Lebertumore in stark proliferative Tumoren und Tumore mit hohem Differenzierungsgrad unterscheiden lassen, sowie Immunfluoreszenzfärbungen auf den Proliferationsmarker Ki67 bestätigten diese Annahme: HCV infizierte Proben zeigten einen signifikant erhöhten Anteil Ki67-positiver Zellen und das Ergebnis der Expressionsanalysen zeigte ein Muster, wie es mit stark proliferativen Tumoren

assoziiert ist (vgl. Abb. 2.4.3, Abb. 2.4.2). Paradoxerweise war die Zellmasse in infizierten Zellen keineswegs höher, wie es durch den Anstieg der Proliferationsmarker zu vermuten wäre, sondern stark reduziert. Viabilitätsmessungen, Messungen des Proteingehalts und der isolierten gesamt RNA zeigten, dass der jeweilige Parameter in infizierten Proben zwischen einem Drittel und der Hälfte des Werts uninfizierter Proben lag (Messungen wurden zu Normalisierungszwecken durchgeführt, Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung vermehrter Proliferieration bei gleichzeitig reduzierter Zellmasse könnten hohe Apoptoseraten HCV-infizierter Zellen sein. Die Induktion von Apoptose in virusinfizierten Zellen ist ein wichtiger Mechanismus des Wirts, die virale Infektion zu bekämpfen [255]. Wie Referenz [256] zusammenfasst, wurden für beinahe alle HCV-Proteine Apoptose-beeinflussende Effekte gezeigt. Dabei sind für einige Proteine pro-apoptotische Effekte, für einige Proteine anti-apoptotische Effekte, für die Mehrzahl der Proteine jedoch sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Effekte publiziert. Mit der Etablierung des HCV-Infektionssystems mehrten sich Daten zu einer Apoptose-Induktion durch HCV. Wäre dies auch in Huh7.5diff Zellen der Fall, dann wäre der beobachtete Rückgang der Differenzierungsmarker und Anstieg der Proliferationsmarker nur indirekt auf HCV zurück zu führen, da HCV-induzierte Apoptose zur Proliferation benachbarter Zellen führen würde und nicht die infizierten Zellen selbst dedifferenzieren würden. Regelmäßige Mikroskopie der Proben zeigte jedoch keine Anzeichen von Apoptose und die Messung der Aktivität pro-apoptotischer Effektorcaspasen zeigte, dass HCV-Infektion die basale Caspase-Aktivität von Huh7.5diff Zellen sogar senkte (vgl. Abb. 2.4.5). Daten aus Patienten legen ebenfalls nahe, dass HCV seine Wirtszellen nicht-cytolytisch infiziert. Aus Patienten mit bekannter HCV-Neuinfektion und experimentell infizierten Chimpansen weiß man durch Messung der HCV-Titer im Blut, dass bereits wenige Tage nach Infektion große Mengen an viralen Partikeln gebildet werden. Zu diesem Zeitpunkt ist noch kein Anstieg der ALT-Werte messbar. Erst die Aktivierung cytotoxischer T-Zellen führt zur Leberzellschädigung, angezeigt durch erhöhte ALT-Spiegel [257,258].

Als weiterer Erklärungsansatz dafür, dass erhöhte Proliferationsmarker nicht mit erhöhten Zellzahlen korrelierten, wurde untersucht, ob HCV eine bestimmte Zellzyklusphase induziert und die Zellen dann in dieser Zellzyklusphase anhält. Das Verlassen der G<sub>0</sub>-Phase könnte das Auftreten von Zellzyklusmarkern erklären, der

Arrest in einer bestimmten Phase könnte (da sich die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion noch in Proliferation befanden) die erniedrigte Zellzahl erklären. Bei Ki67-Färbungen war aufgefallen, dass HCV-infizierte Proben vorwiegend eine gepunktete Kernfärbung aufwiesen, die typisch für G1- und S-Phase des Zellzyklus ist [229]. Daraufhin durchgeführte Zellzyklusanalysen zeigten, dass in der Tat ein starker Anstieg an S-Phase Zellen auftrat. Scholle et al. zeigten 2002 in proliferierenden Huh7 Zellen, dass die Replikation der HCV-RNA stark vom Zellzyklus abhängig ist. Wachstumsarrest hemmte die Replikation der viralen RNA, die stärkste Replikation wurde in der S-Phase des Zellzyklus beobachtet [219]. Da in der S-Phase die Verdopplung der genomischen DNA stattfindet, besteht in dieser Phase ein hoher Bedarf an Nucleotiden. Entsprechend ist ein starker Anstieg der Nucleotidbiosynthese in der S-Phase zu beobachten [259]. Die Synthese der Nucleosidtriphosphate (NTPs) und auch die, von der Ribonucleotid Reductase katalysierte Reduktion zu desoxy-NTPs (dNTPs), findet im Cytoplasma der Zellen statt [260]. Da die gebildeten Nucleotide, vermutlich über Kernporen, ungehindert vom Cytoplasma in den Kern gelangen können, herrschen in beiden Zellkompartimenten in etwa gleiche Nucleotidkonzentrationen und eine gesteigerte Nucleotidsynthese führt unmittelbar zu erhöhter Verfügbarkeit von Nucleotiden im Nukleus [261–263]. Dabei scheint die energieaufwändige Synthese genau an den Bedarf der Zelle angepasst zu sein, d.h. neusynthetisierte Nucleotide werden sofort in entstehende DNA/RNA eingebaut und es kommt zu keinem messbaren Anstieg der Nucleotide [259]. Vor diesem Hintergrund wird klar, dass, obwohl HCV im Cytoplasma repliziert und NTPs anstelle von dNTPs als Bausteine seines Genoms benötigt, ebenfalls die S-Phase der Zelle die höchste Verfügbarkeit an Nucleotiden zur viralen RNA-Replikation bietet. Wie bereits erwähnt, herrscht in der gesunden Leber ein sehr geringer Zell-„turnover“, d.h. das Virus trifft natürlicherweise auf sehr wenige in S-Phase befindliche Zellen [167]. Dennoch können in einem HCV-infizierten Patienten täglich etwa  $10^{12}$  virale Partikel gebildet werden [2]. Dies spricht dafür, dass auch im HCV-infizierten Patienten eine Induktion der S-Phase oder S-Phase-ähnlichen Gegebenheiten stattfinden muss, da andernfalls nicht von einer entsprechenden hohen Verfügbarkeit von Nucleotiden auszugehen ist.

Auch für andere Viren ist eine verbesserte Replikation in der S-Phase des Zellzyklus und teilweise eine S-Phase-Induktion beschrieben. Beispielsweise steigt die HIV-Replikation in Patienten, die mit Leishmanien co-infiziert sind, da letztere die

Nucleotidbiosynthese der infizierten Makrophagen und Monozyten erhöhen und für z.B. Epstein Barr Virus, Papyloviren oder Simian Virus 40 konnte ein viral induzierter Anstieg an S-Phase Zellen beobachtet werden [264–268].

Ergebnisse aus der Gruppe von J. McKeating legen nahe, dass die Dedifferenzierung neben der diskutierten Verbesserung der HCV-Replikation durch höhere Nukleotidverfügbarkeit in einem weiteren Aspekt von Vorteil für das Virus sein kann: Differenzierte Hepatozyten weisen, wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, eine starke Polarisierung auf. Mee et al. zeigten bereits 2007 an mit HCV-Pseudopartikeln infizierten Caco-2 Zellen, dass funktionale „tight junctions“ polarisierter Zellen die Aufnahme von Viren in die Zellen hemmt und folgerten, dass „tight junctions“ den Zugang von HCV zu lateral lokalisierten, für den Eintritt wichtigen Proteine wie Claudin1 verhindern [269]. 2010 bestätigte dieselbe Gruppe in mit DMSO differenzierten Huh7.5 Zellen, dass eine Depolarisierung den Zelleintritt von HCV verbessert und konnte ergänzen, dass HCV-Infektion zu einer Depolarisierung der Zellen führt [232]. Da zelluläre Dedifferenzierung in jedem Fall auch Depolarisierung bedeutet, unterstützt die Arbeit von Mee et al. die hier beobachtete Dedifferenzierung und zeigt einen weiteren Aspekt in dem diese von Vorteil für das Virus sein kann.

Ein weiterer Vorteil für die virale Replikation könnte durch Veränderungen im Lipidstoffwechsel gegeben sein, die mit Dedifferenzierung und Proliferation assoziiert sind. Proliferierende Zellen in Embryonen sowie viele Tumorzellen zeigen eine erhöhte Expression von an der Lipidsynthese beteiligten Enzymen wie der Fettsäuresynthetase (engl. fatty acid synthase, FASN) [270,271]. Der komplette HCV-Replikationszyklus ist eng mit dem Lipidstoffwechsel verknüpft und HCV induziert durch vermehrte FASN-Expression und Aktivität die Bildung von „lipid droplets“, die eine entscheidende Rolle in der Virusproduktion spielen [24,30,272,273]. Die Akkumulation von „lipid droplets“ führt zur Entstehung von Steatose in CHC Patienten, wobei das Maß der FASN-Induktion mit der Ausprägung der Steatose korreliert [272]. Eigene Experimente zeigten sowohl eine Korrelation der FASN Expression mit dem Differenzierungsstatus der Zellen, als auch eine Induktion der FASN Expression durch HCV in Huh7.5diff Zellen (nicht gezeigt). Die erhöhte Lipidsynthese kann daher ebenfalls als Folge der Dedifferenzierung und als weiterer Punkt in dem Dedifferenzierung vorteilhaft für die HCV Replikation ist, gewertet werden.



Im nächsten Schritt wurde nach den Mechanismen, über die HCV in der Lage ist, Hepatozyten zur Verbesserung der eigenen RNA-Replikation zu dedifferenzieren und in der S-Phase zu arretieren, gefragt. Betrachtet man die Ergebnisse derjenigen Versuche, die eine Auswertung auf Einzelzell-Ebene erlaubten (Foxo1, Ki67, Kerne/Zelle, S-Phase Zellen, vgl. Abb. 2.3.2, Abb. 2.4.3, Abb. 2.6.1 bzw. Abb. 2.4.4), so fällt auf, dass die beobachteten Veränderungen nicht nur in infizierten Zellen, sondern auch in den HCV-negativen Zellen der infizierten Proben auftraten. Dies lässt auf eine Rolle parakriner Signalmoleküle schließen.

Daher wurden verschiedene Wachstumsfaktoren, die bekanntermaßen eine Rolle in der Leber spielen, auf Veränderungen ihrer Genexpression nach HCV-Infektion untersucht. Um unterscheiden zu können, ob ein, in seiner Expression veränderter Wachstumsfaktor tatsächlich als Ursache der Dedifferenzierung in Frage kam, oder seine Veränderung nur eine Folge der Dedifferenzierung war, wurde die Expression mit proliferierenden sowie wachstumsarretierten Huh7.5 Zellen auf der einen Seite und PHHs auf der anderen Seite verglichen. Nur Veränderungen, die stärker als der Unterschied zwischen Huh7.5diff und proliferierenden Huh7.5 Zellen waren, kamen als Ursache der Dedifferenzierung in Frage. Veränderungen, die schwächer als der Unterschied zwischen Huh7.5diff und proliferierenden Huh7.5 Zellen waren, stellten vermutlich eine Folge der Dedifferenzierung dar.

Die Expression des antiproliferativen Cytokins TGF $\beta$  war durch HCV nicht verändert (vgl. Abb.2.5.1). HGF und IGF1 zeigten jeweils eine positive Korrelation mit dem Differenzierungsstatus der Zellen und ihre Expression sank durch HCV-Infektion in den Bereich proliferierender bzw. wachstumsarretierter Huh7.5 Zellen (vgl. Abb.2.5.1). Ihre Veränderung wurde daher als Konsequenz der Dedifferenzierung gewertet. Da sowohl für IGF1 also auch für HGF eine proliferative Wirkung auf Hepatozyten beschrieben ist, ist die im Vergleich zu Primärzellen reduzierte Expression in Hepatomazellen auf den ersten Blick verwunderlich [274,275]. Andererseits scheint HGF zwar in der Leberregeneration eine wichtige Rolle zu spielen, stammt dort aber vermutlich vorwiegend aus Kupferzellen [276]. Über die Expression in Hepatozyten ist in diesem Zusammenhang nichts bekannt und für Hepatoma-Zelllinien wurde sogar ein wachstumshemmender Effekt gezeigt [189]. Des Weiteren wurde von de Courtee et al. gezeigt, dass Insulin die HGF-Expression allgemein hemmt, sodass durch erhöhte Insulinspiegel in Patienten (wie in CHC IR bzw. erhöhten Insulinspiegel zustande kommen können, obwohl keine hepatische IR

auftritt wird im folgenden Kapitel diskutiert) eine weitere, in Zellkultur nicht messbare, Senkung der HGF Expression auftreten könnte [277]. Da HGF auch anti-fibrotisch und anti-inflammatorisch wirkt, könnte dies ein Grund sein, warum IR bei CHC mit schnellerer Progression der Lebererkrankung korreliert [132,178].

Auch für die in dieser Arbeit in Huh7.5 Zellen im Vergleich zu Primärzellen und in infizierten im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen reduzierte IGF1-Expression können Erklärungen gefunden werden: Die durch GH stimulierte IGF1 Produktion von Hepatozyten ist die Hauptquelle von zirkulierendem Serum-IGF1 und spielt damit vor allem für Wachstum und Differenzierung anderer Organe eine Rolle [278]. Zudem sind bei HCC Patienten eine reduzierte IGF1 Expression im Tumorgewebe und erniedrigte IGF1-Spiegel im Serum beschrieben [199,200]. Insofern stimmen die beobachtete Reduktion der IGF1-Expression durch HCV im Zusammenhang von Dedifferenzierung und der Entstehung von Tumorzellen und die niedrigen IGF1-Spiegel in Hepatomazellen durchaus mit der Literatur überein.

IGF2 spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine Rolle, wo es, wie IGF1 im Erwachsenen, ebenfalls vorwiegend in der Leber produziert wird [279,280]. In der adulten Leber geht die IGF2 Expression zurück, in Tumorzellen wird jedoch teilweise wieder eine erhöhte IGF2-Produktion gemessen [281,282]. In Übereinstimmung damit, wurde in den Huh7.5 Hepatomazellen im Vergleich zu PHHs eine erhöhte IGF2 Expression gemessen (vgl. Abb.2.5.1). Wachstumsarrest und Differenzierung veränderten die Expression in Huh7.5 Zellen nicht, was zeigt, dass die Zellen sich auch nach Differenzierung noch in einigen Aspekten von PHHs unterscheiden. Überraschenderweise reduzierte HCV-Infektion die IGF2 Expression, was eine gesonderte Regulation durch HCV, unabhängig von der beobachteten Dedifferenzierung, annehmen lässt. Die Reduktion im Zusammenhang mit der Entstehung von IR ist äußerst interessant, da erhöhte IGF2-Spiegel bei Patienten mit IGF2-produzierenden Tumoren zu Hypoglycämie durch erhöhte periphere Glucoseaufnahme führen und eine Reduzierte IGF2-Produktion folglich zu reduzierter peripherer Glucoseaufnahme und Hyperglycämie führen sollte [202–204].

Mit einer im Vergleich zu uninfizierten Huh7.5diff Zellen etwa 18fach erhöhten und im Vergleich zu undifferenzierten Zellen immer noch 8fach erhöhten Genexpression erfüllte EGF die Kriterien eines an der Dedifferenzierung beteiligten

Wachstumsfaktors (vgl. Abb.2.5.1). Messungen von sezerniertem EGF zeigten, dass die erhöhte Genexpression mit erhöhter EGF Sekretion korrelierte und die teilweise Reversion der HCV-induzierten S-Phase Induktion durch neutralisierende EGF-Antikörper bestätigen die Annahme, dass HCV durch Steigerung der EGF Produktion die S-Phase induziert (vgl. Abb.2.5.2, Abb.2.5.3). Interessanterweise ist zusätzlich zu der allgemeinen mitogenen Wirkung von EGF eine starke S-Phase-Induktion von EGF im Kombination mit Insulin beschrieben [195,196,283]. Erhöhte Insulinspiegel in IR könnten daher den Effekt des viral induzierten EGFs verstärken und dies könnte eine weitere Erklärung der beschleunigten Progression der chronischen Lebererkrankung bei IR sein.

Zusammenfassend kann also die beobachtete Expressionsveränderung von IGF1 und HGF als Folge der Dedifferenzierung interpretiert werden, wobei die Reduktion der HGF-Expression an der beschleunigten Krankheitsprogression bei CHC Patienten mit IR beteiligt sein könnte. Die Induktion der IGF2-Expression hingegen muss als gesonderter Effekt gesehen werden und könnte kausal an der Entstehung der für CHC Patienten beschriebenen IR beteiligt sein. Die starke Induktion von EGF und die Reduktion des Anteils an S-phase Zellen durch blockierende EGF-Antikörper zeigen, dass EGF (möglicherweise in Kombination mit anderen Faktoren) Ursache der Dedifferenzierung ist.

Die Wachstumsstimulation durch eine Kombination von EGF und Insulin scheint die Entstehung von binukleären Zellen zu fördern [284]. Im Menschen liegt natürlicherweise ein Teil der Hepatozyten polyploid vor (tetraploid-mononukleäre, tetraploid-binukleär, octaploid-mononukleär und octaploid-binukleär). Binukleäre Zellen machen bei Kleinkindern zusammen nur etwa 3% der Hepatozyten aus, bis zum Alter von 50 Jahren steigt ihr Anteil langsam auf 10% der Hepatozyten an. Im Alter zwischen 50 und 55 Jahren steigt ihr Anteil rasch auf ca 20% an und bleibt dann mit zunehmendem Alter weitgehend konstant [285]. Interessanterweise fällt die starke Zunahme binukleärer Zellen im Alter von 50 bis 55 Jahren mit dem Alter zusammen, in dem bei CHC Patienten am häufigsten ein HCC entsteht. Hiotis et al. verglichen die Häufigkeit der HCC-Entstehung in chronisch HBV- mit chronisch HCV-infizierten Patienten und stellten fest, dass während HCC bei HBV Patienten ab 30 Jahren in allen Altersgruppen etwa gleich häufig vorkommt, bei HCV Patienten aber nur 5% vor dem 51. Lebensjahr ein HCC entwickelten. 58% aller CHC Patienten

waren bei der Diagnose des HCC 51-60 Jahre alt [286]. Huh7.5 Zellen stammen ursprünglich aus einem Lebertumor eines 57 Jahre alten CHC Patienten. Das Auftreten von etwa 20% binukleären Zellen entspricht daher der für die Altersgruppe beschriebenen Häufigkeit (vgl. Abb.2.6.1).

Über die Entstehung von Zellen mit mehr als zwei Zellkernen durch sich wiederholende unvollständige Cytokinesen oder die Beteiligung von Wachstumsfaktoren ist in der Literatur nichts beschrieben. Vielmehr ist ihr Auftreten auf Zellfusionen zurück zu führen. Für viele Viren ist die Induktion von Zellfusionen bekannt und mit der Entstehung bzw. Progression von Tumoren assoziiert [230]. Der beobachtete Anstieg an Zellen mit mehr als 3 Kernen in infizierten Proben ist daher eine interessante Beobachtung im Zusammenhang der Tumorenstehung, kann aber nicht mit der beobachteten Dedifferenzierung in Verbindung gebracht werden.

#### **3.4. DIE DEDIFFERENZIERUNG VON HCV-INFIZIERTEN HEPATOZYTEN IST MIT REDUZIERTER ZELLULÄRER GLUCOSE-AUFNAHMEFÄHIGKEIT ASSOZIIERT**

---

Wie in Abschnitt 3.2. diskutiert wurde, zeigten HCV-infizierte Huh7.5diff Zellen zwar signifikante Veränderungen im hepatozellulären Insulinsignalweg, jedoch keine IR. Tatsächlich ist davon auszugehen, dass eine hepatozelluläre IR mit erhöhter Gluconeogeneseaktivität trotz Insulinsignals für die Replikation von HCV eher nachteilig wäre, da die energieaufwändige Synthese von Glucose die intrazellulär verfügbare Energie senken würde und somit der viralen Replikation weniger Energie zur Verfügung stünde [231]. Die Energie zur Gluconeogenese stammt aus Lipidoxidation. Da LDs, die intrazellulären Lipidspeicher, eine zentrale Rolle in der Replikation von HCV spielen, kann davon ausgegangen werden, dass erhöhte Gluconeogenese durch Reduktion der LDs einen zusätzlichen negativen Effekt auf die Virusreplikation ausüben würde [30,287]. Da die Einordnung der Probanden als "insulinresistent" in klinischen Studien, die das erhöhte IR Risiko für CHC-Patienten beschreiben, meistens alleine über die Messung von Serumglucose und Seruminsulin erfolgte, konnte in diesen Studien nicht unterschieden werden, ob eine hepatische oder eine periphere IR vorlag [126]. Obwohl eine periphere IR und die damit assoziierte Reduktion der peripheren Lipid- und Glucoseaufnahme dazu führen würden, dass die Leber, entsprechend ihrer „Schwammfunktion“, diese Nährstoffe aufnehmen und speichern würde, und dies durch erhöhte verfügbare Energie und

Bildung von LDs vorteilhaft für die HCV Replikation wäre, fällt es schwer zu erklären, wie ein in der Leber replizierendes Virus eine periphere IR verursachen sollte [288,289]. Dennoch scheint es, als wäre genau das der Fall: Zwei Studien befassten sich in den vergangenen Jahren durch aufwändige „clamp“-Experimente mit den Orten der IR in CHC-Patienten und beschrieben eine IR in der Peripherie [146,290]. Milner et al. erfassten zudem die Ausprägung der Lipideinlagerungen in der Leber und des viszeralen Fettgewebes der Patienten. Interessanterweise korrelierte die IR, im Gegensatz zu IR im Kontext des Metabolischen Syndroms, weder mit der Menge an viszeralem Fettgewebe der Patienten noch mit der intrahepatischen Lipidakkumulation [290–292]. Die in Abschnitt 2.7 beschriebenen Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit können eine mögliche Erklärung, sowohl für die beobachteten erhöhten Glucose- und Insulinspiegel, als auch für die Unterschiede zur IR wie sie im Metabolischen Syndrom beobachtet wird, geben:

Wie zuvor beschrieben wurde, ist die Leber, aufgrund der Expression des Hepatozyten-spezifischen Glucosetransporters GLUT2, zur schnellen Aufnahme großer Mengen an Glucose in der Lage [108]. Daher wurde untersucht ob HCV-induzierte Hepatozytendifferenzierung zu einer Reduktion des GLUT2 Transporters führt und dies mit einer reduzierten Glucoseaufnahmefähigkeit einhergeht. Tatsächlich korrelierte die Expression von GLUT2 mit dem Differenzierungsstatus der Zellen und HCV-infizierte Proben zeigten eine reduzierte GLUT2-Proteinexpression, die mit einer signifikanten Reduktion der Glucoseaufnahme einherging. Im Fall der Infektion am Beginn der Differenzierung betrug die Reduktion 50% (vgl. Abb. 2.7), bei Infektion nach maximaler Differenzierung waren es nur 13% (vgl. Abb. 2.8.6). Obwohl die Zahl infizierter Zellen und die produzierten Virustiter in beiden experimentellen Ansätzen zum Zeitpunkt der Analysen in etwa gleich hoch lagen (vgl. Abb. 2.2.3, Abb. 2.8.1), waren also die Effekte in Proben, in denen die Zellen sich zum Zeitpunkt der Infektion noch in Proliferation befanden, deutlich stärker als in Proben, die erst nach der Differenzierung infiziert wurden. Interessanterweise wurde auch in Patienten beobachtet, dass die Virustiter im Blut nicht mit der Intensität der Veränderungen (Grad der Lebererkrankung), wohl aber mit dem Anteil infizierter Hepatozyten korreliert [52,293]. Zum aktuellen Zeitpunkt kann über Ursachen für diesen Unterschied nur spekuliert werden. Möglicherweise ist die Induktion der Produktion von Wachstumsfaktoren in polarisierten Zellen gehemmt und HCV kann somit

weniger starke parakrine Signale zur Dedifferenzierung und Proliferation uninfizierter Zellen verursachen. Die unterschiedliche Ausprägung der Foxo1-Expression in den beiden Versuchsansätzen unterstützen diese Vermutung: Während bei Infektion zu Beginn der Differenzierung praktisch keine (HCV-positive oder HCV-negative) Zelle der infizierten Probe nukleäre Foxo1-Färbung zeigte (vgl. Abb. 2.3.2), fehlte Foxo1 bei Infektion nach maximaler Zelldifferenzierung zwar ebenfalls im Großteil der HCV-positiven Zellen, knapp 60% der HCV-negativen Zellen zeigten jedoch Foxo1 im Kern (vgl. Abb. 2.8.2). Die uninfizierten Zellen sind bei diesem Versuchsaufbau also wesentlich weniger stark von den infizierten Nachbarzellen beeinflusst, was auf reduzierte parakrine Stimulation schließen lässt. Weitere Experimente, wie beispielsweise die Untersuchung von Foxo1 nach Stimulation mit rekombinatem EGF und der direkte Vergleich der EGF-Produktion in früh vs. spät infizierten Zellen sind nötig, um diese Vermutung weiter zu untersuchen. Zum aktuellen Zeitpunkt kann keine Aussage darüber getroffen werden, was im hier verwendeten Zellkulturmodell darüber entscheidet, ob eine Zelle mit HCV infiziert werden kann oder nicht. Es ist denkbar, dass die Zellen, ähnlich wie es für die Antwort auf IFN $\alpha$  beschrieben wurde, nicht alle gleichermaßen auf EGF als Signal reagieren und somit ein Teil der Zellen trotz Proliferationssignal weiter differenziert (Versuchsaufbau mit frühem Infektionszeitpunkt) bzw. differenziert bleibt (Versuchsaufbau mit spätem Infektionszeitpunkt) und so die Replikation von HCV verhindert wird [94]. Dass Proliferation bzw. ein niedriger Differenzierungsgrad der Hepatozyten auch im Patienten für die produktive Infektion einer Zelle entscheidend ist, wird durch Ergebnisse Liang et al. unterstützt. Liang und seine Kollegen zeigten in Patientenbiopsien, dass vor allem fibrotische Bereiche viele HCV-positive Zellen aufwiesen [52].

Wie in Abschnitt 3.1 diskutiert wurde, führt die Aktivität cytotoxischer T-Zellen in der Leber chronisch HCV infizierter Patienten zu einer andauernden kompensatorischen Proliferation. Es kann daher zur Infektion proliferierender Hepatozyten, so wie es im Modell der Infektion am Beginn der Differenzierung der Fall ist, kommen. Die andauernde kompensatorische Proliferation führt zur Entstehung von Leberfibrose und, wenn über die Jahre (eventuell aufgrund von Telomerenverkürzung) die maximale Zahl der Teilungen der Hepatozyten ausgeschöpft ist, möglicherweise zur Entstehung von Leberzirrhose [237,294]. Das als IR interpretierte Auftreten erhöhter Glucose- und Insulinspiegel in CHC Patienten ist mit beschleunigter Leberfibrose

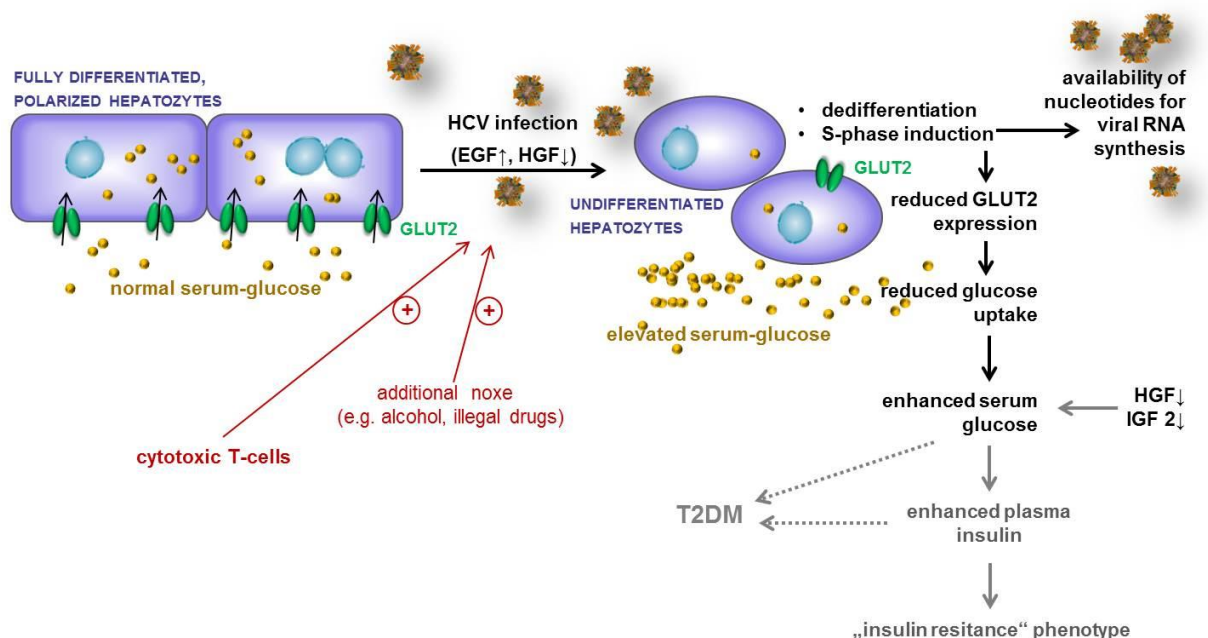
assoziiert [132]. Die zugrundeliegenden Daten stammen unter anderem aus einer Querschnittsstudie, bei der zusätzlich zur Erfassung von Fibrosegrad und HOMA-IR bei einigen Probanden, bei denen der Infektionszeitpunkt bekannt war, der Fibrosegrad relativ zur Dauer der Infektion untersucht wurde. Regressionsanalysen ergaben eine Korrelation mit der HOMA-IR. Geht man davon aus, dass der erhöhten HOMA-IR eine hepatische IR zugrunde liegt, so sähe ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen Fibrose und IR wie folgt aus: Die IR der Leber führt zu erhöhter Insulinproduktion des Pankreas und verstärkt aufgrund der pro-proliferativen Signale durch Insulin die Fibroseprogression. Allerdings trug die HOMA-IR mit einem Regressionskoeffizienten von 0,022 in der beschriebenen Studie nur zu einem geringen Grad zur Varianz im Fibrosegrad der CHC Patienten bei und die Autoren diskutieren selbst, dass die Assoziation keinen kausalen Zusammenhang beweist [132]. Durch die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigte Reduktion der GLUT2-Expression und Glucoseaufnahme in dedifferenzierten Hepatozyten kann eine umgekehrte Kausalität diskutiert werden: Fibrotisches Gewebe reduziert die Glucoseaufnahmefähigkeit der Leber, sodass eine phänotypische IR auftritt.

Damit kann, aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse, zusammenfassend folgendes Modell der Entstehung von IR in chronisch HCV-infizierten Patienten aufgestellt werden (Abb. 3.4):

HCV infiziert in gesunden Menschen differenzierte Hepatozyten und induziert in diesen die Expression von EGF (Abb. 2.5.2), was als parakrines Signal sowohl infizierte als auch uninfizierte Zellen zur Aufgabe der Differenzierung und zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert (Abb. 2.5.3, Abb. 2.4.1, Abb. 2.4.3, Abb. 2.8.3). Dabei findet ein Arrest der Zellen in der S-Phase statt (Abb. 2.4.4, Abb. 2.8.5), welche durch hohe Nukleotidverfügbarkeit eine für die Replikation der viralen RNA günstige Umgebung darstellt. Die Dedifferenzierung bringt eine Reihe von Veränderungen im hepatozellulären Stoffwechsel mit sich, darunter beispielsweise die Reduktion der Expression von Gluconeogenese-Schlüsselenzymen (Abb. 2.3.3). Auch die Expression des leberspezifischen Glucosetransporters GLUT2 sinkt im Zuge der Dedifferenzierung (Abb. 2.7a). Dies führt zu einer reduzierten Glucoseaufnahmefähigkeit der HCV-infizierten Leber (Abb. 2.7b). Postprandial erreichen die Leber über die Pfortader große Mengen an Nährstoffen. Aufgrund der extrem hohen Glucosetransportkapazität der GLUT2 Moleküle ist die gesunde Leber in der Lage rasch große Mengen an Glucose aufzunehmen und zu speichern, noch

bevor diese die Peripherie erreichen. Eine Reduktion der Glucoseaufnahmekapazität der Leber führt daher zu erhöhten peripheren Glucosespiegeln, die zu einer erhöhten Insulinsekretion durch die  $\beta$ -Zellen der Pankreas führen; phänotypisch ist damit eine IR gegeben. Dauerhaft erhöhte Insulin- und Glucosespiegel können zur Entwicklung peripherer IR führen und die Überbelastung des Pankreas kann, wie auch bei IR im Kontext des metabolischen Syndroms, zu einem progressiven Funktionsverlust des Organs führen [295–298].

Diese zentralen Vorgänge des Modells können um die Effekte der HGF- und IGF2-Reduktion erweitert werden: Da HGF und IGF2 die periphere Glucoseaufnahme stimulieren, führt die Reduktion in der Genexpression im Zuge der Dedifferenzierung (Abb. 2.5.1) unabhängig von der reduzierten hepatischen Glucoseaufnahme zu zusätzlich erhöhten Glucosespiegeln [182,202–204]. Da HGF zudem anti-fibrotisch und anti-inflammatorisch wirkt, beschleunigt die Reduktion der HGF-Expression (Abb. 2.5.1) die Krankheitsprogression und dies kann, da Insulin die HGF-Expression hemmt, im Patienten durch das Auftreten hoher Insulinspiegel noch verstärkt werden [178].



**Abbildung 3.4: Modell der Entstehung von Insulin Resistenz in chronisch HCV-infizierten Patienten**



Zusätzliche Faktoren wie die Aktivierung des Immunsystems oder Schädigung von Hepatozyten durch Alkohol oder illegale Drogen wie beispielsweise Kokain führen dazu, dass HCV auch direkt undifferenzierte Zellen infizieren kann [299]. Dies führt zu einer verstärkten Ausprägung der beschriebenen Veränderungen

Um die Richtigkeit des Modells weiter zu überprüfen, sind Experimente an Biopsiematerial von CHC Patienten in der Vorbereitung. In-situ-Hybridisierung von EGF- und HCV-RNA in diesen Proben soll zeigen, ob in HCV-infizierten Zellen im Patienten die EGF-Produktion im Vergleich zu uninfizierten Zellen erhöht ist. Zudem soll ein Mausmodell zum Einsatz kommen, das das vollständige HCV-Polyprotein unter dem  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Promotor exprimiert [105]. Diesem Modell fehlt zwar der Aspekt der viralen RNA-Replikation sowie der Bildung viraler Partikel und deren Zirkulation im Blut, doch bereits durch die leberspezifische Expression der HCV-Proteine kommt es zur Entstehung einer Steatose, der Infiltration von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und einer erhöhten Hepatozytenproliferation [105]. Der beobachtete Anstieg an Proliferationsmarkern legt nahe, dass auch in diesem Modell eine HCV-induzierte Dedifferenzierung stattfindet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die GLUT2 Expression sowie die Glucoseaufnahmefähigkeit der Hepatozyten reduziert sein sollte. Bestätigt sich dies, so handelt es sich um ein geeignetes Modell um zu überprüfen, ob die reduzierte hepatische Glucoseaufnahmefähigkeit wie erwartet zur Entstehung einer phänotypischen IR und schließlich zur Manifestation von Diabetes führt. Bestätigt sich als völlig neue Pathogenese der Hyperglycämie, dass reduzierte GLUT2 Expression in dedifferenzierten bzw. proliferierenden Hepatozyten tatsächlich eine relevante Auswirkung auf den Glucosespiegel hat, so könnte dies auch in anderen Zusammenhängen die Ursache von als IR interpretierten erhöhten Glucosespiegeln sein. Z.B. sind nach Resektion von Lebertumoren häufig stark erhöhte Serumglucosespiegel in den Patienten zu beobachten. Diese gehen mit einer schlechteren Prognose einher und sind nur schwer durch Insulin zu regulieren [300,301]. Die Proliferation eines großen Anteils der Hepatozyten in der verbleibenden gesunden Leber könnte durch übergangsweise reduzierte Differenzierung und die hiermit verbundene reduzierte GLUT2 Expression auch hier die Ursache der erhöhten Serumglucosespiegel sein. Selbst bei IR im Kontext des Metabolischen Syndroms, könnte die postulierte Pathogenese eine Rolle spielen. Unter den komplexen und nach wie vor nicht vollständig verstandenen systemischen

Veränderungen, die der Entstehung von IR und T2DM im Zusammenhang des Metabolischen Syndroms zugrundeliegen, können ebenfalls Verknüpfungen zum Hepatozyten-Differenzierungsstatus gefunden werden [130,131]. So wurde beispielsweise eine erhöhte hepatische Protein Kinase C Expression bei T2DM gefunden und dies ist allgemein mit Proliferation assoziiert [302,303]. Des Weiteren stammen, die bei der häufigen Steatoseentwicklung in Patienten mit Metabolischem Syndrom akkumulierten Lipide in der Leber, zu einem Großteil aus de-novo Synthese der Hepatozyten selbst [123,304]. Folglich ist eine erhöhte Expression der FASN zu beobachten, was wie zuvor erwähnt zudem ein Merkmal proliferierender Zellen ist [270,271]. Steatose kann zu Steatohepatitis fortschreiten und in diesem Zuge entstehenden Fibrosen zeigen klar, dass auch in diesem Fall Proliferation eine Rolle spielt und folglich eine reduzierte GLUT2 Expression und verminderte hepatische Glucoseaufnahmefähigkeit an der Pathogenese beteiligt sein könnten [304].

Die Validität der in dieser Arbeit aufgestellten These, die eine durch hepatozelluläre Dedifferenzierung herbeigeführte verminderte GLUT2-Expression als eine bisher nicht beschriebene Pathogenese einer peripheren IR und einem daraus resultierendem Diabetes Mellitus postuliert, muss durch weitere Untersuchungen wie z.B. an leberspezifischen GLUT2 „knockdown“ in Mäusen erbracht werden. Ein besseres Verständnis der verschiedenen Ursachen einer Deregulation des Glucosestoffwechsels kann helfen, die Behandlung von Patienten zu optimieren und Komplikationen zu minimieren.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. ANTIKÖRPER

##### PRIMÄRANTIKÖRPER

Antigen	Klon	Hersteller	Verwendung	Verdünnung
Akt	40D4	Cell Signaling	WB	1:1000
BrdU	3D4	BD	FACS	1:100
cleaved Casp3	poly	Cell Signaling	WB	1:1000
EGF	D8A1	Cell Signaling	Neutralisierung	0,3 µg/ml
Foxo1	C29H4	Cell Signaling	WB IF	1:1000 1:400
GLUT2	poly	Millipore	WB	1:1000
HCV core	C7-50	Pierce	IF	1:400
HCV NS3	2E3	Biofront technologies	TCID <sub>50</sub>	1:3000
HCV NS3	poly	Molekulare Virologie Heidelberg	WB	1:3000
InsR	poly	Cell Signaling	WB	1:1000
Ki67	SP6	Thermo Scientific	IF	1:400
p-Akt	D9E	Cell Signaling	WB	1:1000
p-GSK3β	poly	Abcam	WB	1:1000
β-actin	AC-15	Sigma Aldrich	WB	1:10000
β-catenin	14	BD	IF	1:200

##### SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Beschreibung	Hersteller	Verwendung	Verdünnung
Ziege anti Kaninchen IgG, Alexa 594 markiert	Invitrogen	IF	1:1000
Ziege anti Maus IgG, Alexa 594 markiert	Invitrogen	IF	1:1000
Ziege anti Kaninchen IgG (Fc spezifisch), HRP markiert	Sigma Aldrich	WB	1:10000
Ziege anti Maus IgG (Fc spezifisch), HRP markiert	Sigma Aldrich	WB	1:10000
Ziege anti Maus IgG (ganzes Molekül), HRP markiert	Sigma Aldrich	TCID <sub>50</sub>	1:200

**4.1.2. ZELLKULTURMEDIEN****DMEM-VOLLMEDIUM**

Dulbeccos MEM	500ml
Penicillin/Streptavidin (10000 I.U./ml bzw. 10000 µg/ml)	5 ml
L-Glutamin (200 mM)	5 ml
NEAA (100x)	5 ml
Na Pyruvat	5 ml
FCS	50 ml

**DIFFERENZIERUNGSMEDIUM**

Williams E Medium	500ml
5% Glucose	6 ml
1M Hepes pH 7,5	11,5 ml
L Glutamin (200 mM)	5,6 ml
Penicillin/Streptavidin (10000 I.U./ml bzw 10000 µg/ml)	2,8 ml
Insulin (155 nM)	320 µl
Inosin (25 mg/ml)	280 µl
Hydrocortison (5,5 µg/ml)	600 µl
FCS	25 ml

**DEPLETIONSMEDIUM**

Williams E Medium ohne Glucose	500ml
1M Hepes pH 7,5	11,5 ml
L Glutamin (200 mM)	5,6 ml
Penicillin/Streptavidin (10000 I.U./ml bzw 10000 µg/ml)	2,8 ml
Inosin (25 mg/ml)	280 µl
Hydrocortison (5,5 µg/ml)	600 µl

**EINFRIERMEDIUM**

Dulbeccos MEM	70%
FCS	20%
DMSO	10%

### 4.1.3. PRIMER

Gen	Primer "forward" (5' → 3')	Primer "reverse" (5' → 3')	Produktlänge
BESP	GGGAAGGTGATGATAGATGGTC	TTTCATATTTCTCTGGGAGTGACA	226
EGF	GGATGCTGGTGTCTCAGTGAT	TCCTCCTGTTGATTTGACCA	202
G-6-Pase	CGTCTTTAAGTGATTCTCTTTGG	CATTCAAGCACCGAAATCTG	239
HCV	TCTGCGGAACCGGTGAGT	GGGCATAGAGTGGGTTTATCC	73
HGF	CGAGGCCATGGTGCTATACT	TGCATTCAAGTTGTTTCCAAAGG	117
IGF1	TGATTTCTTGAAGGTGAAGATGC	ACCCTGTGGGCTTGTGTA	185
IGF2	GACACCCTCCAGTTCGTCTG	GGGGTATCTGGGGAAGTTGT	213
OATPC	GAGCACTAGGAGGAATTCTAGCTC	GACCCTTGAAAATGATGTGGA	134
PEPCK	GACAACCTGCTGGTTGGCTCT	GTACATGGTGGACCTTTCAT	402
TGFβ	CCCTGGACACCAACTATTGC	AAGTTGGCATGGTAGCCCTT	125
18s RNA	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	117

### 4.1.4. VERBRAUCHSMATERIEN UND CHEMIKALIEN

#### 4.1.4.1. MEDIEN UND ZUSÄTZE

Produkt	Hersteller
Dulbeccos MEM	life technologies, Carlsbad, USA
Dymethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	life technologies, Carlsbad, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutamin	life technologies, Carlsbad, USA
HEPES pH 7.4	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hydrocortison	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Inosin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Insulin "Insuman Rapid"	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland
Natriumpyruvat	life technologies, Carlsbad, USA
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS	life technologies, Carlsbad, USA
PBS – Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Versene (EDTA)	life technologies, Carlsbad, USA
William's Medium E ohne Glucose	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Williams Medium E	life technologies, Carlsbad, USA

**4.1.4.2. CHEMIKALIEN**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-Amino-9-ethyl-carbazole	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Alexa Fluor® 488	Molecular Probes, Eugene, USA
Amine-Reactive Probes	Invitrogen, Carlsbad, USA
Amino-Capron-Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DEPC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoromount-G™, with DAPI	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Insulin "Insuman Rapid"	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalilauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland

L-Glutathion (GSH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumflourid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP40	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NTPs	Promega, Madison, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
PAGERuler Prestained ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenol/TE	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Polyacrylamid (40%PAA/BisPAA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglycol 8000	Promega, Madison, USA
Protease Inhibitor "Complete"	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
PVDF-Membran	Zefa, Harthausen, Germany
Rnase Zap	Invitrogen, Carlsbad, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spermidin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sybr Green Mix	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TritonX100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Versene	life technologies, Carlsbad, USA
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, UK

**4.1.4.3. VERBRAUCHSMATERIALIEN**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
"chamber slides" "Lab Tak" für Zellkultur	Nunc, New York, USA
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Elektroprationsküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ELISA 96-Well-Platte	Maxisorb, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Brand, Wertheim, Deutschland
FACS Röhrchen	BD Falcon, Bedford, USA
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg, Germany
Handschuhe "Aloecare"	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Laborflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Laborflaschen/Bechergläser	Brand, Wertheim, Deutschland
Laborflaschen/Bechergläser	Duran, Wertheim, Deutschland
Monolayer-Flaschen 75 cm <sup>2</sup> /150 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen 50 ml	Perfusor, Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter	Stericup/Steritop Filter Unit, Millipore, Billerica, USA
Whatman Papier "thick"	BIO-RAD, Hercules, USA
Zellkulturplatten (12/24 Loch)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifugenröhren	BD Falcon, Bedford, USA

**4.1.4.4. ENZYME**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
DNase	Promega, Madison, USA
Kollagenase	Worthington, Lakewood, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

**4.1.4.5. KITS**

<b>Verwendung</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
PCR	PuReTaq Ready-to-go PCR Beads, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England
Toxizität-Test	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, Promega, Madison, USA
Caspase Aktivitäts Test	Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems, Promega, Madison, USA



cDNA-Synthese	SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Real time PCR, allgemein	LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 96-Loch Mikrotiterplatten; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
EGF ELISA	Human EGF ELISA Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
RNA Isolation	NucleoSpin®RNAII kit, Macherey Nagel, Dueren, Deutschland
Größenausschlusschromatographie	Bio-Gel P-30 Gel, BIO-RAD, Hercules, USA
Zellzyklusanalyse	APC BrdU Flow Kit BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Real time PCR, HCV (mit Sonde)	QuantiTect Virus Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Aufreinigung	NucleoBond® Xtra, Macherey Nagel, Dueren, Deutschland

#### 4.1.5. GERÄTE

Produkt	Hersteller
Absaugsystem "VACUSAFE comfort"	Integra LifeSciences, New York, USA
Blotkammer "Transblot SD Semi-dry"	BIO-RAD, Hercules, USA
Brutschrank Cell 150	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Camera "N70.30"	Olympus, Tokyo, Japan
Centrifuge, 5430	Eppendorf, Hamburg, Germany
CO2 Incubator, "HERAcell" 150i	Thermo Scientific, Rockford, USA
Confocales Mikroskop "Fluoview FV10i"	Olympus, Tokyo, Japan
Durchflußzytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierhilfe "Nalgene Cell Freezing Containers"	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ELISA-Reader infinite F200	TECAN, Crailsheim, Deutschland
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage R160P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fusion FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gene Pulser Xcell™ Eukaryotic System	BIO-RAD, Hercules, USA
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konfokales Mikroskop Fluoview FV101	Olympus, Hamburg, Deutschland
Lightcycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Minifuge "Sprout"	HeathrowScientific, Nottingham, UK
Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System	BIO-RAD, Hercules, USA
Minishaker, MS3 basic	IKA, Staufen, Germany, Deutschland

Multichannel Pipette 300 µl "ErgOne"	Star Lab, USA
NanoVue4282	GE Healthcare, Penzberg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetierhilfe "Pipetboy"	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetierhilfe "Pipetus"	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten, "Research" (2.5, 10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe "Accu-jet pro"	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank (Zellkultur)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler T300	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifuge 54173	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD, Hercules, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waagen Kern 440-47	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Hannover, Deutschland
Westernblot Gel-Apparatur	BIO-RAD, Hercules, USA
Zentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg, Germany

#### 4.1.6. SOFTWARE

Produkt	Hersteller
cell <sup>^</sup> A	Olympus, Tokyo, Japan
FacsDIVA 5.0.3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FlowJo version 8.8.6	Treestar, Ashland, USA
Fusion	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Graphpad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
Light Cycler 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Magellan 6	Stüber Systems GmbH, Berlin, Deutschland
TCID <sub>50</sub> calculator	Molekulare Virologie, Heidelberg, Deutschland
Windows Vista/7/XP, Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA

## 4.2. METHODEN

### 4.2.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN

#### 4.2.1.1. WESTERNBLOT ANALYSE

Zellkulturproben wurden mit 150µl Protein-Lysepuffer (s.u.) 20 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation bei 14.000 g wurden Nukleinsäuren abgetrennt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden Bradford Assays durchgeführt, wie im Herstellerprotoll beschrieben. Da das der verwendete Lysepuffer 1 % Tritonx100 enthält und Tritonx100 in Konzentrationen >0,125 % zu unspezifischem Signal führt (Beyotime Institute of Biotechnology), wurden alle Proben vor der Proteinquantifizierung mindestens 1:8 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Alle Lysate wurden mit dH<sub>2</sub>O auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt; pro Probe wurden 30 µg Protein 1:4 mit Proteinladepuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Einlaufen der Proben bei 15 mA in ein 5% Acrylamid Sammelgel bei 20 mA in ein 7,5% Acrylamid Trenngel.

#### Protein-Lysepuffer

- 50 mM Tris pH 7.5
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA
- 4 mM EGTA
- 1% Triton X100
- 0,5% NP40
- 10 % Glycerol
- 42 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>
- Protease-Inhibitor "Complete" (Roche)
- 50 mM NaF
- 6,25 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>

#### Protein-Ladepuffer

- 8% SDS
- 200 mM Tris/HCl pH 6,8
- 50% Glycerol
- 1,92 M Glycin
- 10% β-Mercaptoethanol
- 0,04% Bromphenolblau

#### Sammelgel: 5% Acrylamid

- 40% PAA/BisAA 0,24 ml
- 1M Tris pH 8,8 0,5 ml
- 10% SDS 20 µl
- VE-Wasser 1,25 ml
- TEMED 2µl
- 10% APS 15µl

#### Trenngel: 7.5% Acrylamid

- 40% PAA/BisAA 1,5 ml
- 1M Tris pH 8.8 3 ml
- 10% SDS 80 µl
- dH<sub>2</sub>O 3,4 ml
- TEMED 7µl
- 10% APS 40µl

#### Elektrophorese Laufpuffer

- 25 mM Tris
- 200 mM Glycin
- 0,1% SDS

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte bei 20 V für 90 min durch ein System aus drei Puffern geblottet (s.u.).

Zur parallelen Detektion verschiedener Proteine wurde die Membran nach dem blotten horizontal geschnitten. Nach Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen durch 5% Milchpulver in TBS-T pH7,5 wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert (siehe 4.1.2). Die Inkubation mit Peroxidase-markiertem Sekundärantikörper erfolgte 2 h bei RT. Zur Analyse verschiedener Proteine unterschiedlicher Größen in denselben Proben wurden die Membranen teilweise nach der Proteinübertragung horizontal geschnitten und separat mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Bei der Analyse von phosphoryliertem Akt und gesamt-Akt in denselben Proben wurden parallel zwei Westernblot durchgeführt. Zu jedem untersuchten Protein ist die  $\beta$ -Aktin-Bande derselben Membran als Ladungskontrolle gezeigt.

#### Anoden-Puffer 1

- 0,3 M Tris
- 20 % MetOH

#### Kathoden-Puffer

- 25 mM Tris
- 40 mM Amino-Capron-Säure
- 20 % MetOH

#### Anoden-Puffer 2

- 25 mM Tris
- 20 % MetOH

#### TBS-T Puffer, pH 7.4

- 20 mM Tris
- 140 mM NaCl
- 0,1% Tween 20
- Eingestellt auf pH 7,4 mit HCl

#### 4.2.1.2. RNA EXTRAKTION UND cDNA SYNTHESE

Die Extraktion von zellulärer RNA erfolgte mit dem „NucleoSpin®RNAII kit“ (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben. Die Umschreibung in cDNA wurde mit dem „Superscript III – first strand synthesis kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Um gleiche RNA Mengen in die cDNA Synthese einsetzen zu können wurde zuvor photometrisch bei 260 nm die RNA Ausbeute bestimmt.

#### 4.2.1.3. PRIMER-DESIGN

Das Primer-Design erfolgte mit Hilfe der online verfügbaren Programme „Ensembl“ und „Primer3“. Es wurden ausschließlich Intron-Grenzen überspannende Primer verwendet. Die Spezifität der entworfenen Primer wurde mit dem Programm „NCBI Primer-BLAST“ kontrolliert und nach der ersten PCR im Agarose Gel überprüft.

#### 4.2.1.4. QUANTITATIVE LIGHT CYCLER® PCR MITTELS SYBR GREEN

Die Expression verschiedener Gene wurde am LightCycler 480 von Roche durch relative Quantifizierung gegen ein nicht-reguliertes Gen („house-keeping“-Gen) bestimmt. Als „house-keeping“-Gen wurde 18sRNA verwendet, die im Vergleich zu anderen bekannten house-keeping Genen (ACTB, B2M, GAPDH, PGK1, RPII, RPL13A, TBPB, TUBB) die stabilste Expression unter den gegebenen Behandlungen (Insulin-Stimulation, HCV-Infektion) zeigt. Um die Expression der einzelnen Gene mit der tatsächlichen Effizienz der jeweiligen Primerpaare berechnen zu können, beinhaltete jede PCR eine Verdünnungskurve einer Probe aus mindestens 4 Verdünnungsstufen. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte mit der, auf das Gerät und die verwendeten Reagenzien optimierten LightCycler Software.

PCR-Reaktionsansatz:

- 4 µl cDNA
- 0,5 µl Forward Primer
- 0,5 µl Reverse Primer
- 6 µl Sybr Green Mix, Roche

PCR Programm:

- Initiale Denaturierung: 95°C, 5 min
- 40 x 

{	Zyklische Denaturierung: 95°C, 15 sec Primer Annealing: 60°C, 10 sec Elongation: 72°C, 25 sec
---	---
- Schmelzkurve: von 65°C auf 95°C, 0,11°C/sec
- Kühlen: 40°C, 30 sec

**4.2.1.5. „ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY“ (ELISA)**

Sezernierter EGF im Überstand wurde mit dem „Human EGF ELISA Kit“ von Thermo Scientific dem Herstellerprotokoll folgend bestimmt. Zur Inaktivierung von HCV wurde nach dem Abstoppen der Farbreaktion zusätzlich 30 µl 37% Formaldehyd zum bestehenden Reaktionsvolumen von 200 µl gegeben.

**4.2.1.6. FLUORESZENZMARKIERUNG VON ANTIKÖRPERN**

Um HCV-core Protein und andere Proteine für Mikroskopie oder Durchflusszytometrie Zellen mit Antikörpern derselben Spezies anfärben zu können wurde der maus-anti-HCV-core Antikörper fluoreszenzmarkiert. 100 µg anti-HCV core Antikörper (1µg/µl in PBS) wurden mit 10 µl amine-reactivem Alexa fluor 488 Farbstoff 1h bei 500 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde mittels Größenausschlusschromatographie (P-30 Gel, Biorad) abgetrennt.

#### **4.2.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN**

##### **4.2.1.1. ALLGEMEINE KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON HUH7.5 ZELLEN**

Huh7.5 Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit) gehalten, alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig durch PCR auf Mycoplasmen getestet, für Experimente wurden ausschließlich negativ getestete Zellen ausgesät. Die Zellen wurden ein bis zweimal pro Woche passagiert, dabei wurde nicht höher als 1:10 gesplittet.

Zum aussäen definierter Zellzahlen wurden trypsinierte Zellen 1:2 mit Trypanblau verdünnt (Anfärbung toter Zellen). Die Zahl lebender Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Kryokonservierung wurden 2 – 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen in einem ml Einfriermedium (70% DMEM, 20% FCS , 10% DMSO) zuerst 24 h in einer Einfrierhilfe auf -80 °C tiefgekühlt und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert.

Zur Differenzierung wurden Huh7.5 Zellen mit einer Dichte von 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup> in DMEM-Vollmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte der Wechsel auf Differenzierungsmedium. Im Folgenden wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt, wobei immer nur die benötigte Menge Medium auf 37°C erwärmt wurde. Die Infektion mit HCV erfolgte entweder am Tag 3 (Abschnitte 2.3-2.7) oder Tag 28 (Abschnitt 2.8) nach dem Aussähen. Experimente wurden soweit nicht anders angegeben ca. 4 Wochen nach dem Aussähen durchgeführt.

##### **4.2.1.2. INSULINSTIMULATION VON HUH7.5, HUH7.5DIFF UND PHHS**

Vor der Insulinstimulation wurde den Zellen durch Wechsel auf das Depletionsmedium Insulin und Glucose entzogen. Im selben Medium erfolgte 16 h später die Stimulation mit 100 nM Insulin für die im jeweiligen Experiment angegebene Dauer.

##### **4.2.1.3. VIABILITÄTSTEST**

Zur Normalisierung von Ergebnissen auf die Zahl lebender Zellen wurde der „Cell titer blue assay“ (Promega) verwendet. Im 12-well wurden 400 µl Medium mit 100 µl Cell titer blue Reagenz zugegeben. Nach 1,5 bis 2 h Inkubation bei 37°C wurden jeweils 80 µl in eine 96-well Platte übertragen. Vor der Fluoreszenzmessung des

umgesetzten Farbstoffs ( $560_{Ex}/590_{Em}$ ) wurde zur Inaktivierung von HCV 40  $\mu$ l Formaldehyd 37% zugegeben.

#### **4.2.1.4. CASPASE AKTIVITÄTS TEST**

Die Aktivität der Effektor Caspasen 3 und 7 kann durch Zugabe eines prolumineszenten Caspasesubstrats zu nativen Zelllysaten in Form des entstehenden Lumineszenzsignals gemessen werden. Hier wurde das Caspase-Glo™ 3/7 Assay Kit (Promega) verwendet. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ l 0,5% TritonX100 in PBS (Inaktivierung von HCV) und 100  $\mu$ l „Assay buffer“ pro 12-well für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstandene Signal wurde pro Probe über 10 sec gemessen und auf die Proteinmenge im selben Lysat (Messung mittels Bradfordassay (Sigma), nach Herstellerangaben) normalisiert.

#### **4.2.1.5. BESTIMMUNG DER GLUCOSEAUFGNAHMEFÄHIGKEIT VON ZELLEN**

Die Glucoseaufnahmefähigkeit von Zellen wurde indirekt über verbleibende Glucose im Medium bestimmt. Nach 20 h in Depletionsmedium wurde Medium mit 240 mg/dl Glucose zugegeben. Nach weiteren 16h wurden zu je 400  $\mu$ l Medium 100  $\mu$ l 3% TritonX100 (HCV-Inaktivierung) hinzugefügt und in der Klinischen Chemie der Klinikums Rechts der Isar am Cobas 8000 (Roche) gemessen.

#### **4.2.1.6. S-PHASE-BESTIMMUNG MITTELS BRDU**

Nach Zugabe ins Zellkulturmedium kann BrdU (Bromeodeoxyuridine) aufgrund seiner Ähnlichkeit anstelle von Thymidin in die DNA der Zellen eingebaut werden. Durch eine spätere Antikörperfärbung von BrdU können so Zellen die sich im Zeitraum der BrdU Zugabe in der S-Phase befunden haben quantifiziert werden. Durch zusätzliche Färbung mit 7-amino-actinomycin D (7-AAD), das doppelsträngige DNA können BrdU-negative Zellen weiter in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase Zellen und G<sub>2</sub>/M-Phase Zellen unterschieden werden.

Pro Probe wurden 10  $\mu$ l 1 mM BrdU für 90 Minuten zum Zellkulturmedium gegeben.

Zum Entfernen extrazellulärer Strukturen über den differenzierten Zellen wurden differenzierte Zellen zunächst 10 min bei 37°C mit 1 mg/ml Collagenase in Williams E Medium + 1,5  $\mu$ l/ml CaCl<sub>2</sub> behandelt. Anschließend wurden die Zellen durch 10 min



Versene-Behandlung bei Raumtemperatur und 5-10 min Trypsin-Verdau bei 37°C gelöst und schließlich durch intensives pipettieren in Kulturmedium vereinzelt.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und im Folgenden gemäß den Angaben im Herstellerprotokoll fixiert und gefärbt. Anschließend an die Zugabe des BrdU-Antikörpers wurde eine Färbung auf HCV mit Alexa488 markiertem HCV-core Antikörper (siehe 4.1.2) (1:50 in Perm/Wash-Puffer mit 3% BSA, über Nacht bei 4°C) angeschlossen.

Einzelfärbungen mit BrdU-Antikörper (APC-markiert), 7AAD und HCV-core Antikörper sowie ungefärbte Zellen wurden zur Abgrenzung von spezifischem Signal gegen Hintergrundfärbung durchgeführt.

## 4.2.2. VIROLOGISCHE METHODEN

### 4.2.2.1. EXTRAKTION VON VIRALER RNA AUS DEM ZELLKULTUR-ÜBERSTAND

Die Extraktion von viraler RNA aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mit dem wie die Extraktion von zellulärer RNA mit dem „NucleoSpin®RNAII kit“ (Macherey Nagel). Zellkulturüberstand wurde bei 1000 g zentrifugiert und 100 µl des Überstands wurden mit 350 µl des Lysepuffers (Puffer RA1) versetzt. Die Aufreinigung erfolgte unter Auslassung des DNase Verdaus und des ersten anschließenden Waschschritts nach dem Herstellerprotokoll für Zellysate.

### 4.2.2.2. HCV-SPEZIFISCHE QUANTITATIVE LIGHT CYCLER® PCR

Die Bestimmung Kopienzahl des HCV RNA-Genoms im Zellkulturüberstand erfolgte am Light Cycler® Gerät in einer „one-step-PCR“ (cDNA Synthese und Amplifikation im selben Reaktionsansatz) mit Detektion über eine HCV spezifische Hydrolyse-Sonde. Als Referenz diente *in-vitro* synthetisierte HCV Jc1 RNA.

Die Kopienzahl einer einzelsträngigen RNA mit durchschnittlicher Nukleotid-Verteilung kann wie folgt berechnet werden:

$$y \text{ Kopien} = \frac{x \text{ g}}{z \text{ Nukleotide} \cdot 340} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}$$

Dabei steht 340 für die durchschnittliche atomare Masse eines RNA Nucleotids und  $6,022 \times 10^{23}$  für die Zahl an Partikeln in einem Mol.

1 µg HCV RNA mit 9,6 kb Länge enthält somit  $1,845 \times 10^{14}$  Kopien.

Der HCV-Standard wurde von  $10^7$ - $10^3$  in 1:10 Verdünnungsschritten in DEPC H<sub>2</sub>O angesetzt. Bereits untersuchtes Patientenmaterial aus der Virologischen Diagnostik des Klinikums Rechts der Isar wurde bei der Etablierung der Methode als Kontrolle verwendet.

Die Sequenzen für Primer und Sonde wurden in der Virologischen Diagnostik des Klinikums Rechts der Isar etabliert. Die PCR amplifiziert eine 100 bp lange Region in der 5'NTR des Virus. Die angegebenen Sequenzen sind für die JFH1 Sequenz optimiert.

Primer fw1: 5' GCT AGC CGA GTA GCG TTG GGT 3'

Primer rev1: 5' TGC TCA TGG TGC ACG GTC TAC 3'

Sonde: 5' FAM TAC TGC CTG ATA GGG CGC TTG CGA GTG TAMRA 3'

PCR-Reaktionsansatz:

- 4 µl RNA
  - 0,5 µl 20xPrimer-Probe mix (0,2 µM Sonde, 0,4 µM je Primer in DEPC H<sub>2</sub>O)
  - 2 µl 5xQuantiTect Virus NR Master Mix
  - 0,1 µl 100xQuanti Tect Virus RT Mix
  - 3,5µl DEPC H<sub>2</sub>O
- } QuantiTect Virus Kit, Quiagen

PCR Program:

- Reverse Transkription: 50°C, 20 min
- Initiale Denaturierung: 95°C, 5 min
- 45 x { Zyklische Denaturierung: 95°C, 15 sec  
Primer Annealing: 60°C, 45 sec
- Kühlen: 40°C, 5 min

#### 4.2.2.3. BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS

Virus Titer von Zellkulturüberständen oder Virusstocks werden für HCV üblicherweise als „Tissue-Infectious Dose 50“ (TCID<sub>50</sub>) pro ml angegeben. Die TCID<sub>50</sub> sagt aus wie viel Virus benötigt wird, um 50% einer Zellkultur zu infizieren.

Zur Bestimmung der TCID<sub>50</sub> wurde das Ausgangsmaterial, seriell verdünnt und auf am Vortag mit einer Dichte von 10<sup>4</sup> Zellen/ 96-well ausgesäten Huh7.5 Zellen gegeben. Nach weiteren 72 h erfolgte die Fixierung der Zellen mit -20°C Methanol für ≥ 30 min, Permeabilisierung mit 0,5% TritonX100 in PBS für 8 min, Blockierung unspezifischer Proteinbindestellen mit 3% BSA in PBS für 30-60 min bei Raumtemperatur und die Inkubation mit 1:3000 in 1%BSA verdünntem HCV-NS3 Antikörper (hergestellt in Maus, Klon 2E3) über Nacht bei 4°C. Nach Inkubation mit HRP-markiertem anti-Maus Antikörper konnten infizierte Zellen durch Zugabe von frisch angesetztem Peroxidase-Substrat (s.u.) sichtbar gemacht werden.

Es wurden alle Wells als positiv gewertet, in denen mindestens eine Zelle eindeutiges HCV positives Signal zeigte. Die Berechnung der TCID<sub>50</sub> erfolgte nach

der Methode von Spearman und Kärber mit einem auf der Seite der Molekularen Virologie Heidelberg verfügbaren Programm.

Peroxidase Substrat Puffer:

- 5 ml Puffer "Acetate"
- 1,5 ml Puffer "Carbazole"
- 20 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

partikelfrei filtriert mit 0,45 µm Filtern

Puffer "Carbazole"

- 0,1 g 3-Amino-9-ethyl-carbazole
- 31,25 ml N-N-Dimethylformamid

lichtgeschützt bei 4°C für 3 Monate verwendbar

Puffer "Acetate"

- 75ml Sodium Acetate 0,5 M
- 30ml Acetic Acid 0,5 M
- 945 ml H<sub>2</sub>O

#### **4.2.2.4. PRODUKTION VON Jc1-VIRUSSTOCKS IN HUH7.5 ZELLEN**

##### **4.2.2.4.1. TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN *E. COLI* BAKTERIEN MIT HCV-PLASMIDEN**

Ausgangsmaterial für die Produktion von HCV Jc1 Virusstocks war das von Pietschmann et al. 2006 als pFK-J6-C3 beschriebene Plasmid [87].

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli* (Stbl3) mit ca. 0,1 µg Plasmid 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf Ampicillin enthaltenden LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

##### **4.2.2.4.2. PLASMIDAUFREINIGUNG AUS *E. COLI* KULTUREN**

Zur Auplizierung der Plasmide wurde zunächst eine Kolonie der auf LB-Agar gewachsenen, transformierten *E. coli* Bakterien in 4 ml LB-Medium bei 37°C, 220 rpm angesetzt. Nach ca. 16h wurde die Vorkultur auf 500 ml LB-Medium expandiert und weitere 16 h kultiviert. Die Aufreinigung der Plasmide mit dem NucleoBond® Xtra Kit (Macherey Nagel) erfolgte gemäß der Herstellerangaben für den „Maxi“ Ansatz.

Im Anschluss wurde eine zusätzliche Aufreinigung der Plasmide durchgeführt. 10 µg Plasmid wurden mit 30 µl 3 M NaAc pH 6 versetzt und mit DEPC H<sub>2</sub>O auf 200 µl

aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/TE (4°C) wurde fest geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 13.000 g die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, wiederum mit 200 µl kaltem Phenol/TE gemischt und erneut durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Mischen mit 200 µl Chloroform und erneuter Zentrifugation, wurde die wässrige Phase schließlich mit 500 µl 100% Ethanol versetzt und die Plasmid DNA durch 20 minütige Inkubation bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 13.000 rpm, 4°C, wurde die ausgefallene DNA präzipitiert. Der Ethanol wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **4.2.2.4.3. *IN VITRO*-RNA SYNTHESE**

Als Ausgangsmaterial für die *in-vitro* RNA Synthese dienten jeweils 10 µg aufgereinigtes Plasmid in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O. Pro Ansatz wurden 20 µl 5x RRL Puffer (400 mM Hepes pH 7.5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Spermidin, 200 mM DTT), 12,5 µl NTP Solution (25 mM pro NTP), 100 U RNAsin und 60 U T7-RNA-Polymerase zugegeben. Es wurde 2 h bei 37°C und nach Zugabe von weiteren 30 U T7-RNA-Polymerase nochmal 2 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 7,5 U DNaseQ für 30 Minuten verdaut.

#### **4.2.2.4.4. RNA-AUFREINIGUNG**

*In-vitro* transkribierte HCV RNA (ca. 50 µl) wurde mit 60 µl 2 M NaAc (pH 4,0), 440 µl DEPC H<sub>2</sub>O und 440 µl Phenol/H<sub>2</sub>O gemischt und 10 Minuten aus Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 g, 4°C für 10 Minuten wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 550 µl Chloroform vermischt. Nach erneuter Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die wässrige Phase mit 385 µl (= 0,7 Vol.) 2-Propanol gemischt und die RNA durch Zentrifugation bei 13.000 g (Raumtemperatur) für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde durch Zugabe von 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und nochmals für 5 Minuten zentrifugiert. Der Ethanol wurde restlos abgenommen und das trockene Pellet in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der RNA wurden die Proben 3x 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dazwischen stark geschüttelt.

#### 4.2.2.4.5. ÜBERPRÜFUNG DER RNA MENGE UND QUALITÄT

Die Menge an neu synthetisierter RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei guter Ausbeute ( $\geq 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde die Qualität der RNA (keine Degradation durch RNasen) im Agarosegel überprüft. Eventuelle RNase in Gelkammer und verwendeten Glasflaschen wurden durch Behandlung mit RNaseZap® zerstört. Es wurde ein 5%iges Agarose Gel in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,3 (68,5 ml 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 31,5 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  = 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 6,3) angesetzt. Zu untersuchende RNA wurde 1:20 vorverdünnt und zu gleichen Teilen mit Glyoxal gemischt und 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Migration erfolgte bei 5V/cm Gelkantenlänge in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,3 unter ständiger Pufferzirkulation.

#### 4.2.2.4.6. ELEKTROPORATION VON HUH7.5 ZELLEN MIT HCV RNA

Für die Elektroporation mit HCV RNA wurden Einzelzellsuspension von zuvor 50-90% konfluenten Huh7.5 Zellen hergestellt (Trypsinbehandlung und auf- und abpipettieren in DMEM-Vollmedium). Die Zellen wurden gezählt abzentrifugiert (300 g für 7 Minuten) und in PBS resuspendiert. 10µg RNA wurden pro Elektroporation in RNase freie, sterile Eppendorf Röhrchen vorgelegt und auf Eis gestellt. Erst dann wurden die Zellen im PBS abzentrifugiert und in 1 ml Cytomix (s.u.) pro  $1,5 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Jeweils 400 µl der Suspension wurden zu den je 10 µl RNA gegeben, in eine Elektroporationsküvette übertragen und bei 975 µF, 270V elektroporiert. Die Zellen wurden sofort in DMEM-Vollmedium aufgenommen und zu 1,3 Elektroporationen pro 150 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät und ins S3 Labor gebracht. Ab ca. 4 h nach der Elektroporation ist mit Virus im Überstand zu rechnen.

Bis zum Erreichen von 100% Konfluenz wurde alle 24h Zellkulturüberstand zur Viruspräzipitation gesammelt.

#### Cytomix

- 120 mM KCl
- 0,15 mM  $\text{CaCl}_2$
- 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH7.6
- 25 mM Hepes

- 2 mM EGTA
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - ➔ mit KOH auf pH 7,6 eingestellt, sterilfiltriert
  - ➔ für jede Elektroporation frisch ATP und GSH zugeben:
- 2 mM ATP (Stock: 100 mM, aufbewahrt bei -20°C, zuvor ebenfalls mit KOH auf pH 7,6 gebracht, sterilfiltriert)
- 5 mM GSH (Stock: 250 mM, aufbewahrt bei -20°C, zuvor ebenfalls mit KOH auf pH 7,6 gebracht, sterilfiltriert)

#### **4.2.2.4.7. VIRUSPRÄZIPITATION AUS DEM ZELLKULTURÜBERSTAND**

Zellkulturüberstand wurde bei 1000 g abzentrifugiert und anschließend 1:5 mit sterilem, 40%igem PEG 8.000 mindestens 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 2,5 h bei 5.000 g, 4°C abzentrifugieren und die Viruspellets wurden in ca. 1% des Ausgangsvolumens resuspendiert. Der entstandene Virusstock wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert; der jeweilige Titer wurde mittels TCID<sub>50</sub> bestimmt.

### 4.2.3. MIKROSKOPIE

#### 4.2.3.1. IMMUNFLUORESCENZ MIKROSKOPIE

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden Zellen mit 4% PFA 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Zum Blocken wurden die Proben 60 min mit 5% Ziegenserum in PBS mit 0,3% TritonX-100 inkubiert. Die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C in Antikörper-Puffer (PBS, 1% BSA, 0,3% TritonX-100).

Alexa594-Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurden 1:1000 in Antikörper-Puffer verdünnt und 1-2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Co-Färbung auf HCV erfolgte mit Alexa488 markiertem anti-HCV core Antikörper (siehe 4.2.1.6), über Nacht, bei 4°C. Die Kernfärbung und das Versiegeln der Proben erfolgten in einem Schritt durch DAPI enthaltendes Eindeckelmedium. Die Proben wurden am konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop untersucht.

#### 4.2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Program Graphpad Prism. Signifikanzberechnung erfolgte bei Vergleichen von lediglich zwei Bedingungen durch t-test, bei Vergleichen von drei oder mehr Konditionen durch „one-way ANOVA“ bzw. two-way ANOVA“ und Tukey- bzw Bonferoni-post test. Signifikanzniveaus wurden wie folgt eingeteilt:

$p \leq 0,05$  = signifikant = \*

$p \leq 0,01$  = hoch signifikant = \*\*

$p \leq 0,001$  = höchst signifikant = \*\*\*



## 5. ABKÜRZUNGEN

---

<b>A</b>	Adenin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µg</b>	Microgramm
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>7-AAD</b>	7-amino-actinomycin D
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>BESP</b>	Bile Salt Export Pump
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BrdU</b>	Bromeodeoxyuridine
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>ca.</b>	circa
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>cDNA</b>	zur mRNA komplementäre DNA
<b>CHC</b>	chronische Hepatitis C
<b>c-MET</b>	HGF-Rezeptor
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CSFV</b>	Classical Swine Fever Virus
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	zweifach destilliertes Wasser
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP</b>	desoxy-NTP
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>DV</b>	Dengue Virus
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	Epithelial Growth Factor
<b>EGTA</b>	Grad Celsius
<b>EGTA</b>	Ethylenglycoltetraessigsäure
<b>eIF</b>	eukaryotische Translations-Initiations Faktor
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>EphA2</b>	Ephrin Type-A Receptor 2
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Reticulum
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>F</b>	Farad

<b>FASN</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>Foxo1</b>	Forkhead box protein O1
<b>g</b>	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
<b>G</b>	Guanin
<b>G-6-Pase</b>	Glucose-6-phosphatase
<b>GLUT</b>	Glucose Transporter
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogensynthasekinase 3 beta
<b>GTP</b>	Guanosinetriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>HBV</b>	Hepatitis B Virus
<b>HCC</b>	Hepatozelluläres Karzinom
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>HGF</b>	hepatocyte growth factor
<b>HGF</b>	Hepatozyte Growht Factor
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HOMA-IR</b>	Homeostasis Model of Assessment - Insulin Resistance
<b>HRP</b>	horse radish peroxidase
<b>IF</b>	Immunofluoreszenz
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IGF</b>	Insulin Like Growth Factor
<b>IL</b>	Interleukin
<b>InsR</b>	Insulin Rezeptor
<b>IR</b>	Insulinresistenz
<b>IRES</b>	Internal Ribosome Entry Site
<b>IRS</b>	Insulin Rezeptor Substraten
<b>kb</b>	Kilobasenpaar
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Broth
<b>LD</b>	Lipid Droplet
<b>LSEC</b>	Liver Sinoidal Endothelial Cells
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mRNA</b>	Boten-RNA (messenger RNA)
<b>MRP2</b>	Multi Drug Related Protein 2
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NP40</b>	"Tergitol-type NP-40"; Nonylphenoxypolyethoxylethanol
<b>NS-Protein</b>	Nicht-Struktur-Protein
<b>NTCP</b>	Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide
<b>NTP</b>	Nucleosidtriphosphat
<b>OATPC</b>	Organic Anion Transporting Polypeptide
<b>ORF</b>	offenes Leseraster

<b>p.i.</b>	post infection
<b>PA28γ</b>	Proteasome Activator 28gamma
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PDK</b>	PIP3-abhängige Kinase
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>pegIFNα</b>	pegyliertes Interferon alfa
<b>PEPCK</b>	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
<b>pg</b>	Picogramm
<b>PHH</b>	primäre humane Hepatozyten
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-Bisphosphat
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Phosphatidylinositol-Triphosphat
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>Pol</b>	Polymerase
<b>PP2A</b>	Protein Phosphatase 2A
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>RBV</b>	Ribavirin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>RT</b>	Promega
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SOCS3</b>	Suppressor of Cytokine Signaling 3
<b>SR-BI</b>	Scavenger Rezeptor-BI
<b>ss</b>	Einzelsträngig (single stranded)
<b>T2DM</b>	Typ 2 Diabetes Mellitus
<b>TBS</b>	Tris buffered saline
<b>TCID</b>	Tissue-Infectious Dose 50
<b>TDO</b>	2,3-Tryptophandioxygenase
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TGFβ</b>	Transforming Growth Factor beta
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose Faktor
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>Tween 20</b>	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
<b>uPA</b>	Urokinase Plasminogen Activator
<b>UPR</b>	unfolded protein response
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Grow Factor
<b>vgl</b>	vergleiche
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein
<b>YFV</b>	Yellow Fever Virus

## 6. ABBILDUNGEN

	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1.1.1.1	Replikationszyklus des Hepatitis C Virus.	2
Abbildung 1.1.1.2	HCV Genomorganisation und Polyproteinsynthese und –prozessierung.	3
Abbildung 1.1.1.	Modell der Entstehung und Freisetzung von Lipo-Viro-Partikeln.	6
Abbildung 1.1.2.1	Globale Epidemiologie der HCV Infektion.	7
Abbildung 1.1.2.2	Natürlicher Verlauf einer HCV Infektion.	8
Abbildung 1.2.1	Position der Leber im Blutkreislauf	14
Abbildung 1.2.2	Periphere vs. hepatische Glucoseaufnahme.	15
Abbildung 1.2.3	Glucosstoffwechsel im Hepatozyten	17
Abbildung 1.2.4	Insulin-Signalweg in Hepatozyten.	19
Abbildung 1.4.2	Polarisierte Ausrichtung der Hepatozyten in der Leber	25
Abbildung 1.4.3	Wachstumsfaktor-aktivierte Signalwege	28
Abbildung 1.4.3	Zellzyklusphasen und Differenzierungsstatus schaffen unterschiedliche Voraussetzungen für virale Infektion und Replikation	33
Abbildung 2.1.1	Etablierung eines Modells zur Untersuchung des Insulin Signalwegs in Huh7.5 Zellen	37
Abbildung 2.1.2	Maximale Differenzierung von Huh7.5 Zellen nach 4 Wochen	39
Abbildung 2.1.3	Huh7.5diff Zellen zeigen erhöhte InsR $\beta$ -, Akt, G-6-Pase und PEPCK-Expression sowie ein verbessertes Ansprechen auf Insulin.	40
Abbildung 2.1.4	Huh7.5diff Zellen zeigen insgesamt erhöhte Foxo1 Expression und Foxo1-Translokation nach Stimulation mit Insulin.	41
Abbildung 2.2.1	Anteil HCV infizierter Zellen im Verlauf der Differenzierung von Huh7.5 Zellen	43
Abbildung 2.2.2	Veränderter Zellkulturphänotyp in HCV-infizierten Huh7.5diff Zellen	44
Abbildung 2.2.3	Intrazelluläre und extrazelluläre Virusmarker im Verlauf der Zelldifferenzierung	45
Abbildung 2.3.1	HCV verändert die Expression und Aktivierung zentraler Signalmoleküle des hepatischen Insulinsignalwegs.	47
Abbildung 2.3.2:	HCV reduziert Expression und nukleäre Lokalisation von Foxo1.	48/49
Abbildung 2.3.3	HCV reduziert die Expression von Gluconeogenese Enzymen.	49
Abbildung 2.4.1	HCV reduziert die Expression hepatischer Differenzierungsmarker	51

Abbildung 2.4.2	Veränderungen in der Genexpression durch HCV führen zu einem Expressions-muster wie es in stark proliferativem HCC zu finden ist.	52
Abbildung 2.4.3	HCV erhöht den Anteil Ki67-positiver Zellen.	53
Abbildung 2.4.4	HCV ist vermehrt in S-Phase Zellen zu finden und erhöht ihren Anteil in HCV- infizierten Proben.	54
Abbildung 2.4.5	HCV reduziert die Aktivierung von Signal-Caspasen.	55
Abbildung 2.5.1	Expression von Wachstumsfaktoren in HCV-infizierten Hepatozyten.	58
Abbildung 2.5.2	HCV infizierte Huh7.5diff Zellen setzten erhöhte Mengen an EGF frei.	59
Abbildung 2.5.3	anti-EGF-Antikörper reduzieren den Anteil an S-Phase Zellen in HCV-infizierten Proben.	59
Abbildung 2.6.1	HCV ist vermehrt in polynukleären Zellen zu finden.	61
Abbildung 2.6.2	HCV infizierte Proben zeigen eine große Heterogenität in Bezug auf Zellgröße und Kernzahl.	62
Abbildung 2.7	HCV infizierte Huh7.5diff Zellen zeigen eine reduzierte Glucose-Aufnahmefähigkeit	64
Abbildung 2.8.1	Produktive Infektion von Huh7.5 Zellen nach maximaler Differenzierung	65
Abbildung 2.8.2	Infektion von maximal differenzierten Huh7.5 Zellen mit HCV zeigt ähnliche Effekte auf den hepatozellulären Insulin-Signalweg, wie Infektion zu Beginn der Differenzierung.	66
Abbildung 2.8.3	Anstieg Ki67-positiver Kerne in maximal differenzierten Huh7.5 Zellen durch Infektion mit HCV.	67
Abbildung 2.8.4	Infektion von maximal differenzierten Huh7.5 Zellen mit HCV bestätigt eine Assoziation der Infektion mit Polynukleären Zellen.	68
Abbildung 2.8.5	Erhöhter Anteil an S-Phase Zellen in maximal differenzierten Huh7.5 Zellen durch Infektion mit HCV.	68
Abbildung 2.8.6:	HCV-Infektion von Huh7.5 Zellen nach maximaler Differenzierung reduziert deren Glucose-Aufnahmefähigkeit.	69
Abbildung 3.4	Modell der Entstehung von Insulin Resistenz in chronisch HCV-infizierten Patienten	89

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] D. Moradpour, F. Penin, C.M. Rice, Replication of hepatitis C virus., *Nature Reviews. Microbiology*. 5 (2007) 453–63.
- [2] A.U. Neumann, N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, et al., Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy., *Science (New York, N.Y.)*. 282 (1998) 103–7.
- [3] X. Forns, R.H. Purcell, J. Bukh, Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus., *Trends in Microbiology*. 7 (1999) 402–10.
- [4] P. Simmonds, A. Alberti, H.J. Alter, F. Bonino, D.W. Bradley, C. Brechot, et al., A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 19 (1994) 1321–4.
- [5] P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet, G. Deléage, N. Enomoto, S. Feinstone, et al., Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 42 (2005) 962–73.
- [6] H. Okamoto, M. Kojima, S. Okada, H. Yoshizawa, H. Iizuka, T. Tanaka, et al., Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability., *Virology*. 190 (1992) 894–9.
- [7] H. Barth, E.K. Schnober, F. Zhang, R.J. Linhardt, E. Depla, B. Boson, et al., Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction., *Journal of Virology*. 80 (2006) 10579–90.
- [8] M.J. Evans, T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wölk, et al., Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry., *Nature*. 446 (2007) 801–5.
- [9] J. Lupberger, M.B. Zeisel, F. Xiao, C. Thumann, I. Fofana, L. Zona, et al., EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy., *Nature Medicine*. 17 (2011) 589–95.
- [10] P. Pileri, Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, et al., Binding of hepatitis C virus to CD81., *Science (New York, N.Y.)*. 282 (1998) 938–41.
- [11] A. Ploss, M.J. Evans, V.A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y.P. de Jong, et al., Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells., *Nature*. 457 (2009) 882–6.
- [12] E. Scarselli, H. Ansuini, R. Cerino, R.M. Roccasecca, S. Acali, G. Filocamo, et al., The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus., *The EMBO Journal*. 21 (2002) 5017–25.
- [13] M.B. Zeisel, G. Koutsoudakis, E.K. Schnober, A. Haberstroh, H.E. Blum, F.-L. Cosset, et al., Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 46 (2007) 1722–31.
- [14] E. Blanchard, S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, et al., Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis., *Journal of Virology*. 80 (2006) 6964–72.

- [15] G. Koutsoudakis, A. Kaul, E. Steinmann, S. Kallis, V. Lohmann, T. Pietschmann, et al., Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses., *Journal of Virology*. 80 (2006) 5308–20.
- [16] D.M. Tscherne, C.T. Jones, M.J. Evans, B.D. Lindenbach, J.A. McKeating, C.M. Rice, Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry., *Journal of Virology*. 80 (2006) 1734–41.
- [17] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S.C. Harrison, Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion., *Nature*. 427 (2004) 313–9.
- [18] D.L. Gibbons, M.-C. Vaney, A. Roussel, A. Vigouroux, B. Reilly, J. Lepault, et al., Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus., *Nature*. 427 (2004) 320–5.
- [19] N. Malys, J.E.G. McCarthy, Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated., *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 68 (2011) 991–1003.
- [20] G.A. Otto, J.D. Puglisi, The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation., *Cell*. 119 (2004) 369–80.
- [21] A. Grakoui, D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, C.M. Rice, A second hepatitis C virus-encoded proteinase., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 (1993) 10583–7.
- [22] M. Hijikata, H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, et al., Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus., *Journal of Virology*. 67 (1993) 4665–75.
- [23] A. Awad, S. Sar, R. Barre, C. Cariven, M. Marin, J.P. Salles, et al., SHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product that binds to Dlg1, a pathway subverted by Hepatitis C virus core protein, *Molecular Biology of the Cell*. (2013).
- [24] F. Negro, Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection., *Gut*. 59 (2010) 1279–87.
- [25] T.-Y. Shiu, S.-M. Huang, Y.-L. Shih, H.-C. Chu, W.-K. Chang, T.-Y. Hsieh, Hepatitis C virus core protein down-regulates p21(Waf1/Cip1) and inhibits curcumin-induced apoptosis through microRNA-345 targeting in human hepatoma cells., *PloS One*. 8 (2013) e61089.
- [26] S. Li, X. Xing, Q. Yang, H. Xu, J. He, Z. Chen, et al., The effects of hepatitis C virus core protein on the expression of miR-122 in vitro., *Virology Journal*. 10 (2013) 98.
- [27] H.T.T. Ngo, L. V Pham, J.-W. Kim, Y.-S. Lim, S.B. Hwang, Modulation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 by hepatitis C virus core protein., *Journal of Virology*. 87 (2013) 5718–31.
- [28] H. Miyamoto, K. Moriishi, K. Moriya, S. Murata, K. Tanaka, T. Suzuki, et al., Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein., *Journal of Virology*. 81 (2007) 1727–35.
- [29] J.-W. Yu, L.-J. Sun, W. Liu, Y.-H. Zhao, P. Kang, B.-Z. Yan, Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1-AMPK signaling pathway., *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*. 17 (2013) e539–45.
- [30] Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, et al., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production., *Nature Cell Biology*. 9 (2007) 1089–97.

- [31] F. Helle, G. Vieyres, L. Elkrief, C.-I. Popescu, C. Wychowski, V. Descamps, et al., Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions., *Journal of Virology*. 84 (2010) 11905–15.
- [32] A. Sakai, M.S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S.U. Emerson, R.H. Purcell, et al., The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (2003) 11646–51.
- [33] V. Serebrov, A.M. Pyle, Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase., *Nature*. 430 (2004) 476–80.
- [34] K. Li, E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C.M. Ferreon, M. Ikeda, et al., Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 2992–7.
- [35] E. Meylan, J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, et al., Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus., *Nature*. 437 (2005) 1167–72.
- [36] D. Egger, B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, et al., Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex., *Journal of Virology*. 76 (2002) 5974–84.
- [37] A. Salonen, T. Ahola, L. Kääriäinen, Viral RNA replication in association with cellular membranes., *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 285 (2005) 139–73.
- [38] S.-L.T. Yupeng He, Kirk A Staschke, HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication, (2006).
- [39] L.P. Tripathi, H. Kambara, Y.-A. Chen, Y. Nishimura, K. Moriishi, T. Okamoto, et al., Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach., *Journal of Proteome Research*. (2013).
- [40] D. Moradpour, V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H.E. Blum, et al., Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication., *Journal of Virology*. 78 (2004) 13278–84.
- [41] S.J. Butcher, J.M. Grimes, E. V Makeyev, D.H. Bamford, D.I. Stuart, A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization., *Nature*. 410 (2001) 235–40.
- [42] Q.M. Wang, M.A. Hockman, K. Staschke, R.B. Johnson, K.A. Case, J. Lu, et al., Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase., *Journal of Virology*. 76 (2002) 3865–72.
- [43] R. Bartenschlager, F. Penin, V. Lohmann, P. André, Assembly of infectious hepatitis C virus particles., *Trends in Microbiology*. 19 (2011) 95–103.
- [44] K. Mohd Hanafiah, J. Groeger, A.D. Flaxman, S.T. Wiersma, Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 57 (2013) 1333–42.
- [45] WHO | Hepatitis C, (n.d.) Fact sheet N°164.
- [46] J.F. Perz, G.L. Armstrong, L.A. Farrington, Y.J.F. Hutin, B.P. Bell, The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide., *Journal of Hepatology*. 45 (2006) 529–38.



- [47] F. V Chisari, Unscrambling hepatitis C virus-host interactions., *Nature*. 436 (2005) 930–2.
- [48] J.H. Hoofnagle, Course and outcome of hepatitis C., *Hepatology* (Baltimore, Md.). 36 (2002) S21–9.
- [49] S. Naggie, Management of hepatitis C virus infection: the basics., *Topics in Antiviral Medicine*. 20 (2012) 154–61.
- [50] S.L. Chen, T.R. Morgan, The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection., *International Journal of Medical Sciences*. 3 (2006) 47–52.
- [51] S. Pal, M.C. Shuhart, L. Thomassen, S.S. Emerson, T. Su, N. Feuerborn, et al., Intrahepatic hepatitis C virus replication correlates with chronic hepatitis C disease severity in vivo., *Journal of Virology*. 80 (2006) 2280–90.
- [52] Y. Liang, T. Shilagard, S.-Y. Xiao, N. Snyder, D. Lau, L. Cicalese, et al., Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy., *Gastroenterology*. 137 (2009) 1448–58.
- [53] L. Akkari, D. Grégoire, N. Floc'h, M. Moreau, C. Hernandez, Y. Simonin, et al., Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors., *Journal of Hepatology*. 57 (2012) 1021–8.
- [54] M. Ripoli, R. Barbano, T. Balsamo, C. Piccoli, V. Brunetti, M. Coco, et al., Hypermethylated levels of E-cadherin promoter in Huh-7 cells expressing the HCV core protein., *Virus Research*. 160 (2011) 74–81.
- [55] A. Arzumanyan, H.M.G.P. V Reis, M. a Feitelson, Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma., *Nature Reviews. Cancer*. 13 (2013) 123–35.
- [56] C.-F. Kao, S.-Y. Chen, J.-Y. Chen, Y.-H. Wu Lee, Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein., *Oncogene*. 23 (2004) 2472–83.
- [57] L. Deng, M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, et al., NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner., *The Journal of General Virology*. 87 (2006) 1703–13.
- [58] K.-H. Lan, M.-L. Sheu, S.-J. Hwang, S.-H. Yen, S.-Y. Chen, J.-C. Wu, et al., HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis., *Oncogene*. 21 (2002) 4801–11.
- [59] G. Benegiamo, M. Vinciguerra, G. Mazzoccoli, A. Piepoli, A. Andriulli, V. Paziienza, DNA methyltransferases 1 and 3b expression in Huh-7 cells expressing HCV core protein of different genotypes., *Digestive Diseases and Sciences*. 57 (2012) 1598–603.
- [60] R.E.T. Smith, Hepatitis C virus therapies., *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5 (2006) 715–6.
- [61] M.W. Fried, M.L. Shiffman, K.R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F.L. Gonçalves, et al., Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection., *The New England Journal of Medicine*. 347 (2002) 975–82.
- [62] M.P. Manns, J.G. McHutchison, S.C. Gordon, V.K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, et al., Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial., *Lancet*. 358 (2001) 958–65.
- [63] J.G. McHutchison, E.J. Lawitz, M.L. Shiffman, A.J. Muir, G.W. Galler, J. McCone, et al., Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection., *The New England Journal of Medicine*. 361 (2009) 580–93.

- [64] H.L. Tillmann, J.G. Mchutchison, Hepatitis C, Sixth Edit, Elsevier Inc., n.d.
- [65] H.S. Yee, M.F. Chang, C. Pocha, J. Lim, D. Ross, T.R. Morgan, et al., Update on the management and treatment of hepatitis C virus infection: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program Office., *The American Journal of Gastroenterology*. 107 (2012) 669–89; quiz 690.
- [66] C. Hézode, Boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C: safety management in clinical practice., *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 32 Suppl 1 (2012) 32–8.
- [67] P.Y. Kwo, E.J. Lawitz, J. McCone, E.R. Schiff, J.M. Vierling, D. Pound, et al., Efficacy of boceprevir, an NS3 protease inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2b and ribavirin in treatment-naive patients with genotype 1 hepatitis C infection (SPRINT-1): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial., *Lancet*. 376 (2010) 705–16.
- [68] C. Hézode, N. Forestier, G. Dusheiko, P. Ferenci, S. Pol, T. Goeser, et al., Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection., *The New England Journal of Medicine*. 360 (2009) 1839–50.
- [69] J.G. McHutchison, G.T. Everson, S.C. Gordon, I.M. Jacobson, M. Sulkowski, R. Kauffman, et al., Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection., *The New England Journal of Medicine*. 360 (2009) 1827–38.
- [70] E.J. Gane, S.K. Roberts, C.A.M. Stedman, P.W. Angus, B. Ritchie, R. Elston, et al., Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial., *Lancet*. 376 (2010) 1467–75.
- [71] S.M. Feinstone, A.Z. Kapikian, R.H. Purcell, H.J. Alter, P. V Holland, Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B., *The New England Journal of Medicine*. 292 (1975) 767–70.
- [72] Q.L. Choo, G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, M. Houghton, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome., *Science (New York, N.Y.)*. 244 (1989) 359–62.
- [73] A.A. Kolykhalov, S.M. Feinstone, C.M. Rice, Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA., *Journal of Virology*. 70 (1996) 3363–71.
- [74] A.A. Kolykhalov, E. V Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, C.M. Rice, Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA., *Science (New York, N.Y.)*. 277 (1997) 570–4.
- [75] N. Yao, P. Reichert, S.S. Taremi, W.W. Prosser, P.C. Weber, Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase., *Structure (London, England : 1993)*. 7 (1999) 1353–63.
- [76] C.A. Lesburg, M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, P.C. Weber, Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site., *Nature Structural Biology*. 6 (1999) 937–43.
- [77] S. Bressanelli, L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R.L. Vitale, M. Mathieu, et al., Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (1999) 13034–9.

- [78] H. Ago, T. Adachi, A. Yoshida, M. Yamamoto, N. Habuka, K. Yatsunami, et al., Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus., *Structure (London, England : 1993)*. 7 (1999) 1417–26.
- [79] R. Bartenschlager, L. Ahlborn-Laake, J. Mous, H. Jacobsen, Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing., *Journal of Virology*. 68 (1994) 5045–55.
- [80] A. Grakoui, D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, C.M. Rice, Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites., *Journal of Virology*. 67 (1993) 2832–43.
- [81] M. Hsu, J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C.M. Rice, et al., Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (2003) 7271–6.
- [82] B. Bartosch, J. Dubuisson, F.-L. Cosset, Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes., *The Journal of Experimental Medicine*. 197 (2003) 633–42.
- [83] V. Lohmann, F. Körner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager, Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line., *Science (New York, N.Y.)*. 285 (1999) 110–3.
- [84] K.J. Blight, J.A. Mckeating, C.M. Rice, Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication, *Society*. 76 (2002) 13001–13014.
- [85] T. Wakita, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, et al., Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome., *Nature Medicine*. 11 (2005) 791–6.
- [86] B.D. Lindenbach, M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wölk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, et al., Complete replication of hepatitis C virus in cell culture., *Science (New York, N.Y.)*. 309 (2005) 623–6.
- [87] T. Pietschmann, A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, et al., Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 7408–13.
- [88] R. Thomssen, S. Bonk, C. Propfe, K.H. Heermann, H.G. Köchel, A. Uy, Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein., *Medical Microbiology and Immunology*. 181 (1992) 293–300.
- [89] P. André, F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J.L. Berland, M. Sodoyer, et al., Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles., *Journal of Virology*. 76 (2002) 6919–28.
- [90] B.D. Lindenbach, P. Meuleman, A. Ploss, T. Vanwolleghem, A.J. Syder, J. a McKeating, et al., Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (2006) 3805–9.
- [91] V. Icard, O. Diaz, C. Scholtes, L. Perrin-Cocon, C. Ramière, R. Bartenschlager, et al., Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins., *PloS One*. 4 (2009) e4233.

- [92] C. Gondeau, L. Pichard-garcia, P. Maurel, Pharmacology & Therapeutics Cellular models for the screening and development of anti-hepatitis C virus agents, *Pharmacology and Therapeutics*. 124 (2009) 1–22.
- [93] B. Sainz, F. V Chisari, Production of infectious hepatitis C virus by well-differentiated, growth-arrested human hepatoma-derived cells., *Journal of Virology*. 80 (2006) 10253–7.
- [94] O. Bauhofer, A. Ruggieri, B. Schmid, P. Schirmacher, R. Bartenschlager, Persistence of HCV in quiescent hepatic cells under conditions of an interferon-induced antiviral response., *Gastroenterology*. 143 (2012) 429–38.e8.
- [95] Z.W. Yu, P.J. Quinn, Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology., *Bioscience Reports*. 14 (1994) 259–81.
- [96] T. Asselah, I. Bièche, A. Mansouri, I. Laurendeau, D. Cazals-Hatem, G. Feldmann, et al., In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C., *The Journal of Pathology*. 221 (2010) 264–74.
- [97] H. Kudo, T. Nakayama, Y. Mano, S. Suzuki, S. Sassa, S. Sakamoto, Early progression from dimethyl sulfoxide-induced G(0)/G(1) arrest in L(1210) cells., *Cell Biology International*. 26 (2002) 211–5.
- [98] M.H. Grant, K. Anderson, G. McKay, M. Wills, C. Henderson, C. MacDonald, Manipulation of the phenotype of immortalised rat hepatocytes by different culture configurations and by dimethyl sulphoxide., *Human & Experimental Toxicology*. 19 (2000) 309–17.
- [99] M. Fiore, R. Zanier, F. Degrassi, Reversible G(1) arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells., *Mutagenesis*. 17 (2002) 419–24.
- [100] Y.M. Song, S.-O. Song, Y.-K. Jung, E.-S. Kang, B.S. Cha, H.C. Lee, et al., Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction., *Autophagy*. 8 (2012) 1085–97.
- [101] A.P. McCaffrey, K. Ohashi, L. Meuse, S. Shen, A.M. Lancaster, P.J. Lukavsky, et al., Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice., *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*. 5 (2002) 676–84.
- [102] C.-Y. Park, H.-J. Jun, T. Wakita, J.H. Cheong, S.B. Hwang, Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway., *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 9237–46.
- [103] L. Deng, I. Shoji, W. Ogawa, S. Kaneda, T. Soga, D. Jiang, et al., Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway., *Journal of Virology*. 85 (2011) 8556–68.
- [104] K. Machida, J.-C. Liu, G. McNamara, A. Levine, L. Duan, M.M.C. Lai, Hepatitis C virus causes uncoupling of mitotic checkpoint and chromosomal polyploidy through the Rb pathway., *Journal of Virology*. 83 (2009) 12590–600.
- [105] T. Alonzi, Steatosis and intrahepatic lymphocyte recruitment in hepatitis C virus transgenic mice, *Journal of General Virology*. 85 (2004) 1509–1520.
- [106] D.F. Mercer, D.E. Schiller, J.F. Elliott, D.N. Douglas, C. Hao, A. Rinfret, et al., Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers., *Nature Medicine*. 7 (2001) 927–33.
- [107] M. Dorner, J.A. Horwitz, J.B. Robbins, W.T. Barry, Q. Feng, K. Mu, et al., A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection., *Nature*. 474 (2011) 208–11.

- [108] L.P. Bechmann, R. a Hannivoort, G. Gerken, G.S. Hotamisligil, M. Trauner, A. Canbay, The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases., *Journal of Hepatology*. 56 (2012) 952–64.
- [109] L. Berg, Jeremy M; Tymoczko, John L; Stryer, *Biochemie*, 5th ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 2003.
- [110] H. Rehner, Gertrud; Daniel, *Biochemie der Ernährung*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 2002.
- [111] N.N. Abumrad, A.D. Cherrington, P.E. Williams, W.W. Lacy, D. Rabin, Absorption and disposition of a glucose load in the conscious dog, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 242 (1982) E398–406.
- [112] R. a DeFronzo, E. Ferrannini, R. Hendler, P. Felig, J. Wahren, Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man., *Diabetes*. 32 (1983) 35–45.
- [113] H. Boxenbaum, Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin., *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 8 (1980) 165–76.
- [114] T.G. Paradox, *The Glucose Paradox. Is Glucose a Substrate for Liver Metabolism?*, (1901) 1901–1909.
- [115] L. Ma, L.N. Robinson, H.C. Towle, ChREBP.Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver., *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006) 28721–30.
- [116] L. Agius, Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism., *The Biochemical Journal*. 414 (2008) 1–18.
- [117] S.J. Pilkis, D.K. Granner, Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis., *Annual Review of Physiology*. 54 (1992) 885–909.
- [118] R.C. Nordlie, J.D. Foster, A.J. Lange, Regulation of Glucose Production by the Liver., (1999) 379–406.
- [119] D. Argaud, Q. Zhang, W. Pan, S. Maitra, S.J. Pilkis, A.J. Lange, Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence., *Diabetes*. 45 (1996) 1563–71.
- [120] A. Ichihara, T. Nakamura, K. Tanaka, Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions., *Molecular and Cellular Biochemistry*. 43 (1982) 145–60.
- [121] J.D. Horton, N. a Shah, J. a Warrington, N.N. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown, et al., Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (2003) 12027–32.
- [122] J.L. Yecies, H.H. Zhang, S. Menon, S. Liu, D. Yecies, I. Alex, et al., Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways., 14 (2013) 21–32.
- [123] G.F. Lewis, A. Carpentier, K. Adeli, A. Giacca, Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes., *Endocrine Reviews*. 23 (2002) 201–29.
- [124] C. Wolfrum, E. Asilmaz, E. Luca, J.M. Friedman, M. Stoffel, Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes, *Nature*. 432 (2004).

- [125] M.O. Weickert, a F.H. Pfeiffer, Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism., *Diabetologia*. 49 (2006) 1732–41.
- [126] D.L. White, V. Ratziu, H.B. El-Serag, Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis., *Journal of Hepatology*. 49 (2008) 831–44.
- [127] J.H. Warram, B.C. Martin, A.S. Krolewski, J.S. Soeldner, C.R. Kahn, Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents., *Annals of Internal Medicine*. 113 (1990) 909–15.
- [128] B.C. Martin, J.H. Warram, A.S. Krolewski, J.S. Soeldner, C.R. Kahn, R.N. Bergman, Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study, *The Lancet*. 340 (1992) 925–929.
- [129] J.E. Shaw, P.Z. Zimmet, D. McCarty, M. de Courten, Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria., *Diabetes Care*. 23 Suppl 2 (2000) B5–10.
- [130] M.Y. Donath, S.E. Shoelson, Type 2 diabetes as an inflammatory disease., *Nature Reviews. Immunology*. 11 (2011) 98–107.
- [131] S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes., *Nature*. 444 (2006) 840–6.
- [132] J.M. Hui, A. Sud, G.C. Farrell, P. Bandara, K. Byth, J.G. Kench, et al., Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression., *Gastroenterology*. 125 (2003) 1695–704.
- [133] I.H.Y. Cua, J.M. Hui, P. Bandara, J.G. Kench, G.C. Farrell, G.W. McCaughan, et al., Insulin resistance and liver injury in hepatitis C is not associated with virus-specific changes in adipocytokines., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 46 (2007) 66–73.
- [134] S.P. Kim, M. Ellmerer, G.W. Van Citters, R.N. Bergman, Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog., *Diabetes*. 52 (2003) 2453–60.
- [135] Y. He, H. Nakao, S. Tan, S.J. Polyak, P. Neddermann, S. Vijaysri, et al., Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase, *Society*. 76 (2002) 9207–9217.
- [136] S. Banerjee, K. Saito, M. Ait-Goughoulte, K. Meyer, R.B. Ray, R. Ray, Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance., *Journal of Virology*. 82 (2008) 2606–12.
- [137] S. Aytug, D. Reich, L.E. Sapiro, D. Bernstein, N. Begum, Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 38 (2003) 1384–92.
- [138] T. Kawaguchi, T. Yoshida, M. Harada, T. Hisamoto, Y. Nagao, T. Ide, et al., Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3., *The American Journal of Pathology*. 165 (2004) 1499–508.
- [139] V. Paziienza, S. Clément, P. Pugnale, S. Conzelman, M. Foti, A. Mangia, et al., The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 45 (2007) 1164–71.

- [140] D. Sir, W.-L. Chen, J. Choi, T. Wakita, T.S.B. Yen, J.-H.J. Ou, Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response., *Hepatology* (Baltimore, Md.). 48 (2008) 1054–61.
- [141] K.D. Tardif, K. Mori, R.J. Kaufman, A. Siddiqui, Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response., *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (2004) 17158–64.
- [142] A.M. Gorman, S.J.M. Healy, R. Jäger, A. Samali, Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis., *Pharmacology & Therapeutics*. 134 (2012) 306–16.
- [143] G.S. Hotamisligil, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease., *Cell*. 140 (2010) 900–17.
- [144] V. Christen, S. Treves, F.H.T. Duong, M.H. Heim, Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A., *Hepatology* (Baltimore, Md.). 46 (2007) 558–65.
- [145] C. Bernsmeier, F.H.T. Duong, V. Christen, P. Pugnale, F. Negro, L. Terracciano, et al., Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C., *Journal of Hepatology*. 49 (2008) 429–40.
- [146] E. Vanni, M.L. Abate, E. Gentilcore, I. Hickman, R. Gambino, M. Cassader, et al., Sites and Mechanisms of Insulin Resistance in Nonobese, Nondiabetic Patients with Chronic Hepatitis C, (2009).
- [147] K.D. Lam, P. Bacchetti, F. Abbasi, C.E. Ayala, S.M. Loeb, V. Shah, et al., Comparison of surrogate and direct measurement of insulin resistance in chronic hepatitis C virus infection: impact of obesity and ethnicity., *Hepatology* (Baltimore, Md.). 52 (2010) 38–46.
- [148] N. a Mukhtar, P. Bacchetti, C.E. Ayala, J. Melgar, S. Christensen, J.J. Maher, et al., Insulin sensitivity and variability in hepatitis C virus infection using direct measurement., *Digestive Diseases and Sciences*. 58 (2013) 1141–8.
- [149] F. Negro, Mechanisms of hepatitis C virus-related insulin resistance., *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 35 (2011) 358–63.
- [150] R. Moucari, T. Asselah, D. Cazals-Hatem, H. Voitot, N. Boyer, M.-P. Ripault, et al., Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis., *Gastroenterology*. 134 (2008) 416–23.
- [151] I. Hickman, In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy, *Journal of Hepatology*. 39 (2003) 1042–1048.
- [152] M. Romero-Gómez, M. Del Mar Vioria, R.J. Andrade, J. Salmerón, M. Diago, C.M. Fernández-Rodríguez, et al., Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients, *Gastroenterology*. 128 (2005) 636–641.
- [153] Y. Kawamura, Y. Arase, K. Ikeda, M. Hirakawa, T. Hosaka, M. Kobayashi, et al., Diabetes enhances hepatocarcinogenesis in noncirrhotic, interferon-treated hepatitis C patients., *The American Journal of Medicine*. 123 (2010) 951–956.e1.
- [154] B.J. Veldt, W. Chen, E.J. Heathcote, H. Wedemeyer, J. Reichen, W.P. Hofmann, et al., Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus., *Hepatology* (Baltimore, Md.). 47 (2008) 1856–62.
- [155] K.M.O. Goyak, E.M. Laurenzana, C.J. Omiecinski, *Hepatocytes*, 640 (2010).

- [156] D. Cassio, R.I.R. Macias, B. Grosse, J.J.G. Marin, M.J. Monte, Expression, localization, and inducibility by bile acids of hepatobiliary transporters in the new polarized rat hepatic cell lines, Can 3-1 and Can 10., *Cell and Tissue Research*. 330 (2007) 447–60.
- [157] A. Obaidat, M. Roth, B. Hagenbuch, The Expression and Function of Organic Anion Transporting Polypeptides in Normal Tissues and in Cancer, (2013) 135–151.
- [158] X. Cheng, D. Buckley, C.D. Klaassen, Regulation of hepatic bile acid transporters Ntcp and Bsep expression, 74 (2009) 1665–1676.
- [159] M. Quasdorff, M. Hösel, M. Odenthal, U. Zedler, F. Bohne, P. Gripon, et al., A concerted action of HNF4alpha and HNF1alpha links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation., *Cellular Microbiology*. 10 (2008) 1478–90.
- [160] S.J. Rippin, B. Hagenbuch, P.J. Meier, B. Stieger, Cholestatic expression pattern of sinusoidal and canalicular organic anion transport systems in primary cultured rat hepatocytes., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 33 (2001) 776–82.
- [161] S.M. Zamule, D.M. Coslo, F. Chen, C.J. Omiecinski, Differentiation of Human Embryonic Stem Cells along a Hepatic Lineage, 190 (2012) 62–72.
- [162] S. Gupta, Hepatic polyploidy and liver growth control., *Seminars in Cancer Biology*. 10 (2000) 161–71.
- [163] S.H. Sigal, S. Gupta, D.F. Gebhard, P. Holst, D. Neufeld, L.M. Reid, Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver., *Differentiation; Research in Biological Diversity*. 59 (1995) 35–42.
- [164] G. Margall-Ducos, S. Celton-Morizur, D. Couton, O. Bregerie, C. Desdouets, Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis, *Journal of Cell Science*. 120 (2007) 3633–3639.
- [165] J.-E. Guidotti, O. Brégerie, A. Robert, P. Debey, C. Brechot, C. Desdouets, Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes., *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 19095–101.
- [166] D.T. Fox, R.J. Duronio, Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease., *Development (Cambridge, England)*. 140 (2013) 3–12.
- [167] C. Seeger, W.S. Mason, Hepatitis B Virus Biology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (2000) 51–68.
- [168] G. Higgins, G. Anderson, Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal., *Arch Pathol*. 12 (1931) 186–202.
- [169] E. Stöcker, H.K. Wullstein, G. Bräu, Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine., *Virchows Archiv. B: Cell Pathology*. 14 (1973) 93–103.
- [170] I. Kam, S. Lynch, G. Svanas, S. Todo, L. Polimeno, A. Francavilla, et al., Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 7 (1987) 362–6.
- [171] T.E. Starzl, J. Fung, A. Tzakis, S. Todo, A.J. Demetris, I.R. Marino, et al., Baboon-to-human liver transplantation., *Lancet*. 341 (1993) 65–71.
- [172] G.K. Michalopoulos, Liver Regeneration, *Science*. 276 (1997) 60–66.



- [173] E. Stöcker, W.D. Heine, Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions., *Beiträge Zur Pathologie*. 144 (1971) 400–8.
- [174] P.S. Olsen, S.S. Poulsen, P. Kirkegaard, Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands., *Gut*. 26 (1985) 920–7.
- [175] R.J. St Hilaire, G.T. Hradek, A.L. Jones, Hepatic sequestration and biliary secretion of epidermal growth factor: evidence for a high-capacity uptake system., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 80 (1983) 3797–801.
- [176] G.K. Michalopoulos, Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas., *The American Journal of Pathology*. 176 (2010) 2–13.
- [177] T. Nakamura, K. Nawa, A. Ichihara, Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 122 (1984) 1450–9.
- [178] T. Nakamura, S. Mizuno, The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 86 (2010) 588–610.
- [179] T. Cramer, D. Schuppan, M. Bauer, D. Pfander, P. Neuhaus, H. Herbst, Hepatocyte growth factor and c-Met expression in rat and human liver fibrosis., *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 24 (2004) 335–44.
- [180] T. Takehara, K. Matsumoto, T. Nakamura, Cell density-dependent regulation of albumin synthesis and DNA synthesis in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor., *Journal of Biochemistry*. 112 (1992) 330–4.
- [181] A. Bertola, S. Bonnafeous, M. Cormont, R. Anty, J.-F. Tanti, A. Tran, et al., Hepatocyte growth factor induces glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes through A Gab1/phosphatidylinositol 3-kinase/Glut4 pathway., *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (2007) 10325–32.
- [182] G. Perdomo, M.A. Martinez-Brocca, B.A. Bhatt, N.F. Brown, R.M. O'Doherty, A. Garcia-Ocaña, Hepatocyte growth factor is a novel stimulator of glucose uptake and metabolism in skeletal muscle cells., *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (2008) 13700–6.
- [183] J. Roccisana, V. Reddy, R.C. Vasavada, J.A. Gonzalez-Pertusa, M.A. Magnuson, A. Garcia-Ocaña, Targeted inactivation of hepatocyte growth factor receptor c-met in beta-cells leads to defective insulin secretion and GLUT-2 downregulation without alteration of beta-cell mass., *Diabetes*. 54 (2005) 2090–102.
- [184] A. García-Ocaña, R.C. Vasavada, A. Cebrian, V. Reddy, K.K. Takane, J.C. López-Talavera, et al., Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice., *Diabetes*. 50 (2001) 2752–62.
- [185] A. Fafalios, J. Ma, X. Tan, J. Stoops, J. Luo, M.C. Defrances, et al., A hepatocyte growth factor receptor (Met)-insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism., *Nature Medicine*. 17 (2011) 1577–84.
- [186] B. de Courten, M.P.J. de Courten, S. Dougherty, J.M. Forbes, J.R. Potts, R. V Considine, Insulin infusion reduces hepatocyte growth factor in lean humans., *Metabolism: Clinical and Experimental*. 62 (2013) 647–50.
- [187] A. Hiratsuka, H. Adachi, Y. Fujiura, S.-I. Yamagishi, Y. Hirai, M. Enomoto, et al., Strong association between serum hepatocyte growth factor and metabolic syndrome., *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90 (2005) 2927–31.

- [188] E. Tsukagawa, H. Adachi, Y. Hirai, M. Enomoto, A. Fukami, K. Ogata, et al., Independent association of elevated serum hepatocyte growth factor levels with development of insulin resistance in a 10-year prospective study., *Clinical Endocrinology*. 79 (2013) 43–8.
- [189] H. Tajima, K. Matsumoto, T. Nakamura, Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines., *FEBS Letters*. 291 (1991) 229–32.
- [190] G. Shiota, D.B. Rhoads, T.C. Wang, T. Nakamura, E. V Schmidt, Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 (1992) 373–7.
- [191] L. Goyal, M.D. Muzumdar, A.X. Zhu, Targeting the HGF/c-MET Pathway in Hepatocellular Carcinoma., *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 19 (2013) 2310–8.
- [192] S. Cohen, Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal., *The Journal of Biological Chemistry*. 237 (1962) 1555–62.
- [193] P.U. Heitz, M. Kasper, S. van Noorden, J.M. Polak, H. Gregory, A.G. Pearse, Immunohistochemical localisation of urogastrone to human duodenal and submandibular glands., *Gut*. 19 (1978) 408–13.
- [194] M. Scaltriti, J. Baselga, The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy, (2006) 5268–5272.
- [195] B. Mullhaupts, A. Feren, E. Fodorl, A. Jones, Liver Expression of Epidermal Growth Factor RNA, 2883 (1994) 19667–19670.
- [196] J. Borlak, T. Meier, R. Halter, R. Spanel, K. Spanel-Borowski, Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours., *Oncogene*. 24 (2005) 1809–19.
- [197] K. Maaser, J. Borlak, A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-induced cell cycle regulators., *British Journal of Cancer*. 99 (2008) 1635–43.
- [198] S. Djiogue, A.H. Nwabo Kamdje, L. Vecchio, M.J. Kipanyula, M. Farahna, Y. Aldebasi, et al., Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs., *Endocrine-related Cancer*. 20 (2013) R1–R17.
- [199] T. Su, W. Liu, S. Han, M. Jansen, T. Yang-Fen, F. P'eng, et al., Transcripts of the insulin-like growth factors I and II in human hepatoma., *Cancer Research*. 49 (1989) 1773–7.
- [200] S.O. Stuver, H. Kuper, A. Tzonou, P. Lagiou, C.C. Hsieh, C. Mantzoros, et al., Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men.tle, *Int J Cancer*. 87 (2000) 118–21.
- [201] J. Jeng, L. Chuang, W. Chuang, J. Chang, J. Tsai, Insulin-like growth factor II in hepatocellular carcinoma, 1 (2007) 261–271.
- [202] S. Zachariah, A. Brackenbridge, D. Russell Jones, Effects of IGF-2 on glucose metabolism, in: *Endocrine Abstracts*, 2006: p. 220.
- [203] I. Fukuda, N. Hizuka, Y. Ishikawa, K. Yasumoto, Y. Murakami, A. Sata, et al., Clinical features of insulin-like growth factor-II producing non-islet-cell tumor hypoglycemia., *Growth Hormone & IGF Research : Official Journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 16 (2006) 211–6.

- [204] J.O. Chung, S.I. Hong, D.H. Cho, J.H. Lee, D.J. Chung, M.Y. Chung, Hypoglycemia associated with the production of insulin-like growth factor II in a pancreatic islet cell tumor: a case report., *Endocrine Journal*. 55 (2008) 607–12.
- [205] L. Kubiczko, L. Sedlarikova, R. Hajek, S. Sevcikova, TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master., *Journal of Translational Medicine*. 10 (2012) 183.
- [206] K. Breitkopf, S. Haas, E. Wiercinska, M. V Singer, S. Dooley, Anti-TGF-beta Strategies for the Treatment of Chronic Liver Disease, *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. 29 (2005) 121S–131S.
- [207] H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, et al., Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus., *eLife*. 1 (2012) e00049.
- [208] M. Quasdorff, U. Protzer, Control of hepatitis B virus at the level of transcription., *Journal of Viral Hepatitis*. 17 (2010) 527–36.
- [209] B.S. Salvant, E.A. Fortunato, D.H. Spector, Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription., *Journal of Virology*. 72 (1998) 3729–41.
- [210] C. Meyers, M.G. Frattini, J.B. Hudson, L. a Laimins, Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation., *Science (New York, N.Y.)*. 257 (1992) 971–3.
- [211] L. Cassetta, E. Cassol, G. Poli, Macrophage polarization in health and disease., *TheScientificWorldJournal*. 11 (2011) 2391–402.
- [212] N.D. Maynard, M. V Gutschow, E.W. Birch, M.W. Covert, The virus as metabolic engineer., *Biotechnology Journal*. 5 (2010) 686–94.
- [213] K.K. Wiman, The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation, *FASEB J*. 7 (1993) 841–845.
- [214] L. Hertel, S. Chou, E.S. Mocarski, Viral and cell cycle-regulated kinases in cytomegalovirus-induced pseudomitosis and replication., *PLoS Pathogens*. 3 (2007) e6.
- [215] B. Dove, G. Brooks, K. Bicknell, T. Wurm, J.A. Hiscox, Cell Cycle Perturbations Induced by Infection with the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus and Their Effect on Virus Replication Cell Cycle Perturbations Induced by Infection with the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus and Their Effect on Virus R, (2006).
- [216] C.-J. Chen, K. Sugiyama, H. Kubo, C. Huang, S. Makino, Murine coronavirus nonstructural protein p28 arrests cell cycle in G0/G1 phase., *Journal of Virology*. 78 (2004) 10410–9.
- [217] H.B. Nelson, H. Tang, Effect of Cell Growth on Hepatitis C Virus ( HCV ) Replication and a Mechanism of Cell Confluence-Based Inhibition of HCV RNA and Protein Expression, *Journal of Virology*. 80 (2006) 1181–1190.
- [218] X.-J. Yang, J. Liu, L. Ye, Q.-J. Liao, J.-G. Wu, J.-R. Gao, et al., HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression., *Virus Research*. 121 (2006) 134–43.
- [219] F. Scholle, K. Li, F. Bodola, M. Ikeda, B.A. Luxon, S.M. Lemon, Virus-Host Cell Interactions during Hepatitis C Virus RNA Replication : Impact of Polyprotein Expression on the Cellular Transcriptome and Cell Cycle Association with Viral RNA Synthesis Virus-Host Cell Interactions during Hepatitis C Virus RNA Replicatio, (2004).

- [220] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, 414 (2001) 799–806.
- [221] C.R. Bruce, M.A. Febbraio, It ' s what you do with the fat that matters ! Keeping quiet : microRNAs in HIV-1 latency, Obesity. 13 (2007) 1137–1138.
- [222] R.A. DeFronzo, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus., The Medical Clinics of North America. 88 (2004) 787–835, ix.
- [223] J.-F. Huang, M.-L. Yu, C.-Y. Dai, W.-L. Chuang, Glucose abnormalities in hepatitis C virus infection., The Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 29 (2013) 61–8.
- [224] B.D. Lindenbach, New cell culture models of hepatitis C virus entry, replication, and virus production., Gastroenterology. 139 (2010) 1090–3.
- [225] L.C. Cantley, The phosphoinositide 3-kinase pathway., Science (New York, N.Y.). 296 (2002) 1655–7.
- [226] Y. Chen, X.-J. Dong, G.-R. Zhang, J.-Z. Shao, L.-X. Xiang, In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes., Journal of Cellular Biochemistry. 102 (2007) 52–63.
- [227] S. Cairo, C. Armengol, A. De Reyniès, Y. Wei, E. Thomas, C.-A. Renard, et al., Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer., Cancer Cell. 14 (2008) 471–84.
- [228] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67., Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950). 133 (1984) 1710–5.
- [229] I.R. Kill, Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component., Journal of Cell Science. 109 ( Pt 6 (1996) 1253–63.
- [230] P. Gao, J. Zheng, Oncogenic virus-mediated cell fusion: new insights into initiation and progression of oncogenic virus--related cancers., Cancer Letters. 303 (2011) 1–8.
- [231] J.R. Williamson, a Jákob, R. Scholz, Energy cost of gluconeogenesis in rat liver., Metabolism: Clinical and Experimental. 20 (1971) 13–26.
- [232] C.J. Mee, M.J. Farquhar, H.J. Harris, K. Hu, W. Ramma, A. Ahmed, et al., Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner., Gastroenterology. 138 (2010) 1134–42.
- [233] R. Pal, M.K. Mamidi, A.K. Das, R. Bhonde, Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells., Archives of Toxicology. 86 (2012) 651–61.
- [234] C. Tarella, D. Ferrero, E. Gallo, G.L. Pagliardi, F.W. Ruscetti, Induction of differentiation of HL-60 cells by dimethyl sulfoxide: evidence for a stochastic model not linked to the cell division cycle., Cancer Research. 42 (1982) 445–9.
- [235] F. Pera, P. Mattias, K. Detzer, Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine., Cell and Tissue Kinetics. 10 (1977) 255–64.
- [236] C.-Y. Dai, M.-L. Yeh, C.-F. Huang, C.-H. Hou, M.-Y. Hsieh, J.-F. Huang, et al., Chronic hepatitis C infection is associated with insulin resistance and lipid profiles., Journal of Gastroenterology and Hepatology. (2013).

- [237] L.G. Guidotti, F. V Chisari, Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis., *Annual Review of Pathology*. 1 (2006) 23–61.
- [238] R. Thimme, D. Oldach, K.M. Chang, C. Steiger, S.C. Ray, F. V Chisari, Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection., *The Journal of Experimental Medicine*. 194 (2001) 1395–406.
- [239] F. Imazeki, O. Yokosuka, K. Fukai, T. Kanda, H. Kojima, H. Saisho, Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients., *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 28 (2008) 355–62.
- [240] P. Bratusch-Marrain, W. Waldhäusl, Hepatic and peripheral insulin resistance as a cause of hyperglycemia in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus: a review., *Wiener Klinische Wochenschrift*. 99 (1987) 211–6.
- [241] C. Koliaki, M. Roden, Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease., *Molecular and Cellular Endocrinology*. (2013).
- [242] R. Medina-Santillán, J.A. López-Velázquez, N. Chávez-Tapia, G. Torres-Villalobos, M. Uribe, N. Méndez-Sánchez, Hepatic manifestations of metabolic syndrome., *Diabetes/metabolism Research and Reviews*. (2013).
- [243] I. Magnusson, D.L. Rothman, L.D. Katz, R.G. Shulman, G.I. Shulman, Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study., *The Journal of Clinical Investigation*. 90 (1992) 1323–7.
- [244] X.C. Dong, K.D. Copps, S. Guo, Y. Li, R. Kollipara, R.A. DePinho, et al., Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation., *Cell Metabolism*. 8 (2008) 65–76.
- [245] B. Fang, Genetic interactions in translational research on cancer, *World Journal of Medical Genetics*. 1 (2011) 14.
- [246] C.A. Grimes, R.S. Jope, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling., *Progress in Neurobiology*. 65 (2001) 391–426.
- [247] B.T. MacDonald, K. Tamai, X. He, Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases., *Developmental Cell*. 17 (2009) 9–26.
- [248] J. Liu, X. Ding, J. Tang, Y. Cao, P. Hu, F. Zhou, et al., Enhancement of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activity by HCV core protein promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells., *PloS One*. 6 (2011) e27496.
- [249] C.-Y. Park, S.-H. Choi, S.-M. Kang, J.-I. Kang, B.-Y. Ahn, H. Kim, et al., Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis., *Journal of Hepatology*. 51 (2009) 853–64.
- [250] C.-D. Chang, P.-Y. Lin, M.-H. Liao, C.-I. Chang, J.-L. Hsu, F.-L. Yu, et al., Suppression of apoptosis by pseudorabies virus Us3 protein kinase through the activation of PI3-K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways., *Research in Veterinary Science*. (2013).
- [251] Y. Huo, L. Fan, S. Yin, Y. Dong, X. Guo, H. Yang, et al., Involvement of unfolded protein response, p53 and Akt in modulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-mediated JNK activation., *Virology*. (2013).

- [252] M. Cai, Q. Chen, C. Chen, X. Liu, J. Hou, C. Zeng, et al., Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 protects monocyte from apoptosis through regulation of myeloid cell leukemia-1., *Anesthesiology*. 118 (2013) 1140–9.
- [253] D. Hanahan, R.A. Weinberg, S. Francisco, The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco, 100 (2000) 57–70.
- [254] N. Ndongo-Thiam, P. Berthillon, E. Errazuriz, I. Bordes, S. De Sequeira, C. Trépo, et al., Long-term propagation of serum hepatitis C virus (HCV) with production of enveloped HCV particles in human HepaRG hepatocytes., *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 54 (2011) 406–17.
- [255] S.M. Best, Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row., *Annual Review of Microbiology*. 62 (2008) 171–92.
- [256] P.-Y. Ke, S.S.-L. Chen, Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases., 2012.
- [257] R. Thimme, J. Bukh, H.C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, et al., Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (2002) 15661–8.
- [258] B. Rehermann, Science in medicine Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses : a tale of coevolution and coexistence, 119 (2009) 1745–1754.
- [259] F.D. Sigoillot, J.A. Berkowski, S.M. Sigoillot, D.H. Kotsis, H.I. Guy, Cell cycle-dependent regulation of pyrimidine biosynthesis., *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 3403–9.
- [260] J.M. Leeds, M.B. Slabaugh, C.K. Mathews, DNA precursor pools and ribonucleotide reductase activity: distribution between the nucleus and cytoplasm of mammalian cells., *Molecular and Cellular Biology*. 5 (1985) 3443–50.
- [261] J.M. Leeds, C.K. Mathews, Cell cycle-dependent effects on deoxyribonucleotide and DNA labeling by nucleoside precursors in mammalian cells., *Molecular and Cellular Biology*. 7 (1987) 532–4.
- [262] C.K. Mathews, M.B. Slabaugh, Eukaryotic DNA metabolism. Are deoxyribonucleotides channeled to replication sites?, *Experimental Cell Research*. 162 (1986) 285–95.
- [263] M. Rechensteiner, The Distribution of Pyridine Nucleotides between Nucleus and Cytoplasm, *J. Cell. Physiol*. 84 (1974) 481–485.
- [264] D.J. Mock, J.A. Hollenbaugh, W. Daddacha, M.G. Overstreet, C.A. Lazarski, D.J. Fowell, et al., Leishmania induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection., *PLoS Pathogens*. 8 (2012) e1002635.
- [265] G. Rohaly, K. Korf, S. Dehde, I. Dornreiter, Simian virus 40 activates ATR-Delta p53 signaling to override cell cycle and DNA replication control., *Journal of Virology*. 84 (2010) 10727–47.
- [266] A. Pedroza-Saavedra, E.W.-F. Lam, F. Esquivel-Guadarrama, L. Gutierrez-Xicotencatl, The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1)., *Virology*. 400 (2010) 44–52.
- [267] A. Kudoh, M. Fujita, T. Kiyono, K. Kuzushima, Y. Sugaya, S. Izuta, et al., Reactivation of lytic replication from B cells latently infected with Epstein-Barr virus occurs with high S-phase cyclin-dependent kinase activity while inhibiting cellular DNA replication., *Journal of Virology*. 77 (2003) 851–61.

- [268] R. Nascimento, H. Costa, R.M.E. Parkhouse, Virus manipulation of cell cycle., *Protoplasma*. 249 (2012) 519–28.
- [269] C.J. Mee, J. Grove, H.J. Harris, K. Hu, P. Balfe, J. a McKeating, Effect of cell polarization on hepatitis C virus entry., *Journal of Virology*. 82 (2008) 461–70.
- [270] R.E. Wilentz, L.A. Witters, E.S. Pizer, Lipogenic enzymes fatty acid synthase and acetyl-coenzyme A carboxylase are coexpressed with sterol regulatory element binding protein and Ki-67 in fetal tissues., *Pediatric and Developmental Pathology : the Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 3 (n.d.) 525–31.
- [271] J.A. Menendez, L. Vellon, R. Lupu, Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene., *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 16 (2005) 1253–67.
- [272] J. Joven, E. Espinel, A. Rull, R. Beltrán-Debón, G. Aragonès, E. Rodríguez-Gallego, et al., Serum fatty acid synthase concentration is increased in patients with hepatitis viral infection and may assist in the prediction of liver steatosis., *Journal of Clinical Virology : the Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 51 (2011) 199–201.
- [273] N. Naseri, M. Joyce, Y. Rouleau, P. Yang, S. Yao, D.L. Tyrrell, et al., Modulation of fatty acid synthase enzyme activity and expression during hepatitis C virus replication., *Chemistry & Biology*. 20 (2013) 570–82.
- [274] A.K. Kundu, M. Nagaoka, E.H. Chowdhury, S. Hirose, T. Sasagawa, T. Akaike, IGF-1 induces growth, survival and morphological change of primary hepatocytes on a galactose-based polymer through both MAPK and beta-catenin pathways., *Cell Structure and Function*. 28 (2003) 255–63.
- [275] D. Geoffrey, J. Locker, W.C. Bowen, B.E. Petersen, S. Katyal, S.C. Strom, et al., Population Expansion, Clonal Growth, and Specific Differentiation Patterns in Primary Cultures of Hepatocytes Induced by HGF/SF, EGF and TGF $\alpha$  in a Chemically Defined (HGM) Medium, 132 (1996) 1133–1149.
- [276] S. Noji, K. Tashiro, E. Koyama, T. Nohno, K. Ohyama, S. Taniguchi, et al., Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by in situ hybridization., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 173 (1990) 42–7.
- [277] B. de Courten, M.P.J. de Courten, S. Dougherty, J.M. Forbes, J.R. Potts, R. V Considine, Insulin infusion reduces hepatocyte growth factor in lean humans., *Metabolism: Clinical and Experimental*. 62 (2013) 647–50.
- [278] J.E. Puche, I. Castilla-Cortázar, Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency., *Journal of Translational Medicine*. 10 (2012) 224.
- [279] V.K. Han, A.J. D'Ercole, P.K. Lund, Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus., *Science (New York, N.Y.)*. 236 (1987) 193–7.
- [280] A.L. Fowden, The insulin-like growth factors and feto-placental growth., *Placenta*. 24 (n.d.) 803–12.
- [281] B.C. Park, M.H. Huh, J.H. Seo, Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma., *Journal of Hepatology*. 22 (1995) 286–94.

- [282] M. Fiorentino, W.F. Grigioni, P. Baccarini, A. D'Errico, M.S. De Mitri, E. Pisi, et al., Different in situ expression of insulin-like growth factor type II in hepatocellular carcinoma. An in situ hybridization and immunohistochemical study., *Diagnostic Molecular Pathology: the American Journal of Surgical Pathology, Part B.* 3 (1994) 59–65.
- [283] M.F. Crouch, D. a Davy, F.S. Willard, L. a Berven, Insulin induces epidermal growth factor (EGF) receptor clustering and potentiates EGF-stimulated DNA synthesis in swiss 3T3 cells: a mechanism for costimulation in mitogenic synergy., *Immunology and Cell Biology.* 78 (2000) 408–14.
- [284] P.O. Seglen, DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival., *Cell Biology and Toxicology.* 13 (1997) 301–15.
- [285] B.N. Kudryavtsev, M. V Kudryavtseva, G.A. Sakuta, G.I. Stein, Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle., *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology.* 64 (1993) 387–93.
- [286] S.P. Hiotis, N.N. Rahbari, G. a Villanueva, E. Klegar, W. Luan, Q. Wang, et al., Hepatitis B vs. hepatitis C infection on viral hepatitis-associated hepatocellular carcinoma., *BMC Gastroenterology.* 12 (2012) 64.
- [287] M. Roden, H. Stingl, V. Chandramouli, W.C. Schumann, A. Hofer, B.R. Landau, et al., Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans., *Diabetes.* 49 (2000) 701–7.
- [288] M.W. Bradbury, Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis., *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* 290 (2006) G194–8.
- [289] A.S. Greenberg, R.A. Coleman, F.B. Kraemer, J.L. McManaman, M.S. Obin, V. Puri, et al., The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans., *The Journal of Clinical Investigation.* 121 (2011) 2102–10.
- [290] K.-L. Milner, D. van der Poorten, M. Trenell, A.B. Jenkins, A. Xu, G. Smythe, et al., Chronic hepatitis C is associated with peripheral rather than hepatic insulin resistance., *Gastroenterology.* 138 (2010) 932–41.e1–3.
- [291] S.R. Preis, J.M. Massaro, S.J. Robins, U. Hoffmann, R.S. Vasan, T. Irlbeck, et al., Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study., *Obesity (Silver Spring, Md.).* 18 (2010) 2191–8.
- [292] A. Kotronen, L. Juurinen, M. Tiikkainen, S. Vehkavaara, H. Yki-Järvinen, Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes., *Gastroenterology.* 135 (2008) 122–30.
- [293] P. Liu, Y. Li, C. -m. Sun, Correlations of Serum Hepatitis C Virus RNA and Alanine Transaminase With Liver Histopathological Changes in Patients With Chronic Hepatitis C, *Laboratory Medicine.* 40 (2009) 167–169.
- [294] S.U. Wiemann, A. Satyanarayana, M. Tshauridu, H.L. Tillmann, L. Zender, J. Klempnauer, et al., Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis., *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 16 (2002) 935–42.
- [295] E. Tomás, Y.-S. Lin, Z. Dagher, A. Saha, Z. Luo, Y. Ido, et al., Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms., *Annals of the New York Academy of Sciences.* 967 (2002) 43–51.



- [296] H. Vuorinen-Markkola, V. a Koivisto, H. Yki-Jarvinen, Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type I diabetic patients., *Diabetes*. 41 (1992) 571–80.
- [297] S.J. Cleland, B.M. Fisher, H.M. Colhoun, N. Sattar, J.R. Petrie, Insulin resistance in type 1 diabetes: what is “double diabetes” and what are the risks?, *Diabetologia*. 56 (2013) 1462–70.
- [298] F. Renström, J. Burén, M. Svensson, J.W. Eriksson, Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes., *Metabolism: Clinical and Experimental*. 56 (2007) 190–8.
- [299] S.J. Charles, C.J. Powell, Rapidly developing cocaine-induced peripheral portal liver damage., *Toxicology Letters*. 64-65 Spec (1992) 729–37.
- [300] T. Okabayashi, K. Hnazaki, I. Nishimori, T. Sugimoto, H. Maeda, T. Yatabe, et al., Continuous post-operative blood glucose monitoring and control using a closed-loop system in patients undergoing hepatic resection., *Digestive Diseases and Sciences*. 53 (2008) 1405–10.
- [301] L.J. Wrighton, K.R. O’Bosky, J.P. Namm, M. Senthil, Postoperative management after hepatic resection., *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 3 (2012) 41–7.
- [302] M. Musashi, S. Ota, N. Shiroshita, The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis., *International Journal of Hematology*. 72 (2000) 12–9.
- [303] R. V Considine, M.R. Nyce, L.E. Allen, L.M. Morales, S. Triester, J. Serrano, et al., Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia., *The Journal of Clinical Investigation*. 95 (1995) 2938–44.
- [304] C. Postic, J. Girard, Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice., *The Journal of Clinical Investigation*. 118 (2008) 829–38.

## 8. DANKSAGUNG

---

---

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Ulla Protzer für das äußerst spannende und herausfordernde Projekt danken, für das Vertrauen und die Freiheit die Entwicklung des Projekts soweit ich es wollte selbst zu bestimmen und die Bemühtheit immer so schnell wie möglich zur Diskussion bereit zu stehen, wenn ich nicht weiter wusste.

Frau PD Dr. Canan Arkan und Herrn Prof. Haller möchte für die Begleitung der Arbeit als „Thesis Committee“ und Herrn Haller zudem für das Übernehmen der Betreuung der Doktorarbeit von Seiten des WZW danken.

Herzlichen Dank an die Molekulare Virologie der Universität Heidelberg von Prof. Ralf Bartenschlager. Die zwei Wochen zum Lernen der Virusproduktion haben mir sehr viel Spaß gemacht und ich habe mich fast gefreut, wenn ich wieder ein Problem hatte, mit dem ich mal wieder einen von euch anrufen konnte. Danke vor allem an Andy März, Bianca Schmid, David Paul, Gualtiero, Alvisi, Marco Binder, Margara Zayas, Oli Bauhofer und Steffi Kallis für das Beibringen der Virusproduktion zu Beginn meines Projekts und für die schnelle und freundschaftliche Unterstützung durch Protokolle, Plasmide, Antikörper, Diskussionen und das Teilen von Erfahrungen in den vergangenen Jahren.

Ein riesen Dank geht an ALLE „Protzers“ und „Heikenwälders“. Die Bereitschaft sich gegenseitig zu helfen, Wissen und Material zu teilen und sich gegenseitig über fehlgeschlagene Experimente zu trösten könnte kaum irgendwo besser sein. Besonders danke ich Theresa Asen für die gute Laune, mit der sie das Labor am Laufen hält, Mathias Broxtermann für die freundschaftliche Banknachbarschaft das gemeinsame Feiern vieler Konzerte, Knud Esser für zahlreiche Diskussionen über die Arbeit und das Leben, Kathrin Singethan für die Mühe mit allgemeinen S3-Angelegenheiten, Gregor Ebert für den Ausspruch „klar fängst du hier an – oder ist die andere Gruppe so cool wie wir?“, Jochen Wettengel für unzählige Albernheiten, Xiaoming Cheng für intensive spontane Diskussionen im S3 Labor, Raindy Tedjokusumo für überschwängliche Begrüßungen und N<sub>2</sub>-Tischbrunnen, Kerstin Ackermann für die Hilfe im S3 und spontane Umarmungen im Flur, Nina Böttinger für gemeinsames Plätzchenbacken, Karin Krebs für kompetente Hilfe bei jeglicher Art von Formalitäten, Andrea Weicht für Ehrlichkeit wie man sie normal nur von Geschwistern kennt, Chris Zang for enthusiastic molecular-biological discussions,

Julie Lucifora for a friendship developed from a failed „language-tandem“, Katrin Kappes für viele PCR's in letzter Minute und Thomas Michler für Diskussionen beim Joggen. Wenn man sich in der Arbeit von Freunden umgeben fühlt geht man auch nach misslungenen Experimenten am nächsten Tag wieder gerne in die Arbeit.

Danke auch an Isabel Schulien, Alexander Herrmann und Sören Fritsche für die Unterstützung während ihrer Zeit im Labor und für inspirierende Fragen.

Danke an Lisa Marcinowski und Knud Esser für das begeisterte Lesen der Arbeit und das Aufspüren von Fehlern und Unschlüssigkeiten.

Wie würde man sich über „Hochs“ freuen und „Tiefs“ aushalten ohne Freunde. Danke euch allen, ein riesen Dank aber an Sarah, Lisa, Katja und Ulli!

Danke an meine Eltern Albert und Maria, deren bedingungslose Unterstützung das Leben an sich leicht macht, meinen Schwestern Sophia und Theresa sowie der ganzen Großfamilie, die dem Leben ein dickes Sicherheitsnetz gibt. Darunter ein besonderer Dank an Tante Hilde, Günter, Dadi, Wolfgang Cilli und Tom, die ohne groß zu fragen einfach da waren als es darauf ankam.

Mil gracias a Rossmary, su amistad tiene un valor indescriptable para mi. Me fascina la ciencia basica, me fascina intentar de entender como funcionan las cosas, pero me encanta que simper van a quedar cosas que no podemos entender, como encontrar una amistad tan intensa tan lejos y al principio casi sin poder comunicarse. A Rossmary y a sus hijos quiero dedicar este trabajo.