

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

I. Medizinische Klinik und Poliklinik  
Zentrum für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

## **Der Einfluss von NS3, NS5A und Core des Hepatitis C Virus auf die Transformation proliferierender Hepatozyten**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jan Meiners  
aus Winsen/Luhe

Hamburg 2015

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.02.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Henning Wege**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jörg Petersen**

---

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)	5
1.2 Hepatokarzinogenese	6
1.3 Telomerase, Telomere und ihre Rolle in der Hepatokarzinogenese	8
1.4 Das Hepatitis C Virus und seine Rolle in der Hepatokarzinogenese	10
1.4.1 Das Hepatitis C Virus (HCV)	10
1.4.2 HCV in der Hepatokarzinogenese	11
1.5 Modellsystem zur Untersuchung der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese	13
1.6 Zielsetzung	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Material	16
2.1.1 Zelllinien	16
2.1.2 Expressionsplasmide	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellbiologische Methoden	18
2.2.1.1 Zellkultur	18
2.2.1.2 Propagierung von Expressionsplasmiden	20
2.2.1.3 Transfektion von FH-hTERT mittels Elektroporation	20
2.2.1.4 Gewinnung von Einzelzellklonen	22
2.2.1.5 Softagarassay	23
2.2.1.6 Proliferationsanalyse	24
2.2.1.7 Proliferationsanalyse in serumfreiem Zellkulturmedium	25
2.2.1.8 Nachweis von oxidativem Stress	25
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1 Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen	28
2.2.2.2 DNA-Extraktion	28
2.2.2.3 RNA-Extraktion	29
2.2.2.4 cDNA-Synthese	29
2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben	30
2.2.2.6 Platinium-PCR	31
2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese	32

---

2.2.2.8 Relative Quantifizierung der Transgen-Expression	33
2.2.2.9 Relative Quantifizierung der Expression von CDKN1A (p21)	35
2.2.3 Statistische Auswertung	36
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1 Agarosegelelektrophorese	37
3.2 HCV-Transgen-Expression in FH-hTERT	38
3.3 Proliferationsanalyse	40
3.4 Proliferation in serumfreiem Zellkulturmedium	44
3.5 Oxidativer Stress	47
3.6 Relative Expression von CDKN1A (p21)	50
3.7 Verankerungsunabhängiges Wachstum	52
<b>4. Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1 FH-TERT-Zellkultur als Modellsystem der Hepatokarzinogenese	54
4.2 Erzeugung stabil transfizierter FH-hTERT-Zellklone	55
4.3 Expression von HCV-Transgenen in stabil transfizierten Hepatozyten	56
4.4 Induktion von oxidativem Stress durch HCV-Proteine	57
4.5 DNA-Schadensantwort (Expression von p21)	60
4.6 Maligne Transformation durch den Einfluss von HCV-Proteinen	62
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>66</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>82</b>
<b>11. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>83</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt die sechsthäufigste maligne Neoplasie weltweit dar und ist dabei wegen der meist schlechten Prognose der Erkrankung für die zweitmeisten krebsbezogenen Todesfälle verantwortlich [Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013]. Die Inzidenz für Nordeuropa beläuft sich dabei auf ca. 5/100.000 Einwohner pro Jahr und zeigt in den letzten Jahren eine steigende Tendenz, wobei Männer in etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Für Deutschland werden aktuell Inzidenzen von 9,4 (Männer) bzw. 3,1 (Frauen) pro 100.000 Personen angegeben [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2013]. Der Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen Männern und Frauen begründet sich in der unterschiedlichen Exposition gegenüber den Risikofaktoren der Hepatokarzinogenese. Der Erkrankungsgipfel in den westlichen Industrienationen liegt um das 75. Lebensjahr [Parkin, 2005].

Für das HCC gibt es zahlreiche etablierte klinische Risikofaktoren, die in aller Regel über eine chronische Entzündung zur Entstehung einer Leberzirrhose und schließlich zum HCC führen. Zu den hauptsächlichen Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC gehören die chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) und dem Hepatitis C Virus (HCV). Während in der westlichen Welt aufgrund der hohen Impfrate gegen HBV die chronische Hepatitis C den Hauptrisikofaktor darstellt, sind die meisten HCC-Fälle in Afrika und Asien auf eine chronische Hepatitis B zurückzuführen. In absteigender Häufigkeit folgen der chronische Alkoholmissbrauch und die dadurch verursachte Alkohol-induzierte Steatohepatitis (ASH) sowie die zumeist alimentär bedingte nicht Alkohol-induzierte Steatohepatitis (NASH). Darüber hinaus stellt vor allem in Afrika und Asien die Exposition gegenüber dem Aflatoxin einen relevanten Kofaktor zusammen mit der chronischen Hepatitis B dar. Andere seltenere Risikofaktoren sind hereditär bedingte Erkrankungen, wie etwa die

Hämochromatose und der alpha-1-Antitrypsinmangel. Daneben werden weitere Risikofaktoren diskutiert wie z.B. die Autoimmunhepatitis, Diabetes mellitus und Tabakkonsum [El Serag et Rudolph, 2007].

Therapeutisch stehen chirurgische sowie lokal ablativ und transarterielle Therapiemaßnahmen bei lokalisierter Tumorerkrankung zur Verfügung. Konventionelle Chemotherapeutika spielen aufgrund der ausgeprägten Chemoresistenz des HCC praktisch keine Rolle. Als kurative Therapiemaßnahmen sind einzig die vollständige Resektion oder Thermoablation des Tumors sowie die Lebertransplantation bei lokal begrenzten Fällen anzusehen. Als palliative Therapiemaßnahme existiert als transvaskuläres Verfahren die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der systemischen Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib. Die Anwendung der jeweiligen therapeutischen Maßnahme richtet sich nach dem Tumorstadium, der Resektabilität, der Möglichkeit zur Transplantation, dem Grad der Zirrhose und den begleitenden Komorbiditäten [Bruix et Sherman, 2011].

Die Prognose der Erkrankung ist abhängig vom Krankheitsstadium und ist mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 16,6 % bezogen auf alle Krankheitsstadien trotz aller therapeutischen Möglichkeiten weiterhin sehr schlecht [Howlader et al., 2014].

## **1.2 Hepatokarzinogenese**

Die Genese des HCC ist komplex und in seinen Einzelheiten nicht vollständig aufgeklärt. Nach heutiger Ansicht handelt es sich dabei um einen mehrstufigen Prozess, bei dem es begünstigt durch unterschiedliche Risikofaktoren zur Akkumulation von genetischen Veränderungen kommt, die über präneoplastische Vorstufen zur Entwicklung eines invasiven malignen Tumors führen. Dieser ist gekennzeichnet durch verschiedene Charakteristika: unbegrenzte Proliferation, ein von Wachstumsfaktoren und -inhibitoren unabhängiges

Wachstum, Resistenz gegen die Auslösung der Apoptose, Förderung der Angiogenese und die Fähigkeit invasiven und metastasierenden Wachstums [Hanahan et Weinberg, 2000].

Ein großer Teil der Fälle des HCC entsteht auf dem Boden einer Leberzirrhose [Serfaty et al., 1998 ; Fattovich et al. 1995 ; Hu et al. 1999]. So beträgt z.B. die jährliche Rate von HCC-Neuerkrankungen bei chronisch HCV-infizierten Patienten mit Leberzirrhose etwa 3-8% [Ioannou et al., 2007]. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Veränderungen auf zellulärer Ebene aufgedeckt werden, durch die der Übergang von normalen zu entarteten Zellen charakterisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen zirrhotischen Lebergewebes stark verkürzte Telomere vorliegen, was zu einer eingeschränkten Teilungsfähigkeit der Zellen führt [Wiemann et al., 2002]. Zum einen führt die Verkürzung der Telomere zu chromosomaler Instabilität und scheint damit zur Transformation beizutragen. So korreliert die Verkürzung der Telomere mit der Rate an numerischen Chromosomenaberrationen in HCC-Proben [Satyanarayana et al., 2004]. Zum anderen konnte in HCC-Proben in über 90 % der Fälle im Gegensatz zu Proben zirrhotischer Lebern eine erhöhte Aktivität der Telomerase festgestellt werden [Llovet et al., 2006]. Über die Stabilisierung der Telomere ermöglicht diese Veränderung eine endlose Teilungsfähigkeit und ist ein Kennzeichen maligne entarteter Zellen [Hahn et al., 1999]. Den Telomeren und der Telomerase kommt somit eine duale Rolle in der Hepatokarzinogenese zu.

Darüber hinaus wird angenommen, dass im Prozess der Entstehung der Leberzirrhose über die Aktivierung von hepatischen Sternzellen vermehrt extrazelluläre Matrixproteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die über Schädigung der DNA und über die Vermittlung von Wachstumssignalen zum Transformationsprozess beitragen [Bataller et Brenner, 2005]. Weiterhin konnten Veränderungen in der Zellzyklus- und Apoptoseregulation in unterschiedlichen Studien festgestellt werden. Es fanden sich hierbei vor allem Veränderungen in den durch p53 [Tannapfel et al. 2001; Jablowski et al., 2005], Rb/p16 [Azechi et al., 2001] und IGF2R

(insulin-like growth factor 2 receptor) [Yamada et al., 1997] vermittelten

Regulationsvorgängen. Diese Veränderungen scheinen im Vorgang der Hepatokarzinogenese zum Überleben und zur weiteren Proliferation genetisch veränderter Zellen beizutragen.

Darüber hinaus konnten typische Veränderungen zellulärer Signalkaskaden festgestellt werden, die dazu beitragen Wachstum, Proliferation, Angiogenese und Metastasierung in der Entwicklung des HCC voranzutreiben. Diese Veränderungen betreffen vor allem folgende zelluläre Signalwege: PI3K/AKT/mTOR-, RAF/MEK/ERK-, Wnt/ $\beta$ -Catenin- und den HGF (hepatocyte growth factor)/c-MET-Signalweg [Roberts et Gores, 2005].

Die phänotypischen Ausprägungen des HCC sind sehr heterogen und so zeigen sich die oben beschriebenen Veränderungen nur bei einem Teil der Proben von erkrankten Patienten. Da sich wie oben beschreiben jedoch bei einem Großteil der Patienten eine Stabilisierung der Telomere über die Reaktivierung der Telomerase zeigt [Llovet et al., 2006], scheint dies eine notwendige Voraussetzung für die maligne Transformation zu sein.

### **1.3 Telomerase, Telomere und ihre Rolle in der Hepatokarzinogenese**

Telomere sind evolutionär konservierte, sich hundert- bis tausendfach wiederholende nicht kodierende DNA-Sequenzen der Folge 5'-TTAGGG-3'. Sie sind lokalisiert an den Enden von eukaryotischen Chromosomen [Blackburn, 1991]. Zusammen mit einer Vielzahl von telomerbindenden Proteinen wie z.B. TRF (telomeric repeat binding factor) 1 und 2, sowie POT1 (protection of telomeres 1 homolog) bilden sie einen Nukleoproteinkomplex, der als Telosom bezeichnet wird. Zusammen mit den telomerbindenden Proteinen sind die Telomere in diesem zu einer Schleifenstruktur aufgerollt [Griffith et al., 1999]. Diese Schleifenstruktur bildet am Ende eines jeden Chromosoms eine Art Kappe, welche die kodierenden Regionen der Chromosomen vor enzymatischer Degeneration, homologer Rekombination und Fusion von Chromosomen während Meiose und Mitose schützt, und ist somit essenzieller Faktor für

die Aufrechterhaltung chromosomaler Stabilität eukaryotischer Zellen [Blackburn, 2000; Takai et al., 2003].

Aufgrund der unvollständigen semikonservativen DNA-Replikation während der Zellteilung, kommt es bei somatischen Zellen bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomere [Allsopp et al., 1995] und schließlich zum Verlust der schützenden Kappenstruktur des Telosoms. Als Folge treten die Zellen in die Seneszenz ein, ein irreversibler postmitotischer Ruhezustand mit erhaltener Stoffwechselaktivität [Hayflick et Moorhead, 1961].

Es ist jedoch möglich, die Telomerverkürzung und damit das Eintreten der Zelle in die Seneszenz zu verhindern. Hierfür verantwortlich ist die Telomerase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase [Greider et Blackburn, 1985]. Die Telomerase besteht aus der RNA-Komponente TERC (telomerase RNA component) [Feng et al., 1995] und der enzymatischen Untereinheit TERT (telomerase reverse transcriptase), welche die katalytische Einheit des Holoenzym darstellt [Nakamura et al., 1997].

Im Gegensatz zu somatischen Zellen ist in Keimbahn- und Tumorzellen in den meisten Fällen eine erhöhte Aktivität der Telomerase nachweisbar [Kim et al., 1994; Wright et al., 1996]. So konnte auch in einem Großteil der Fälle in HCC-Proben eine erhöhte Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. Durch die Aktivität der Telomerase wird eine Stabilisierung der Telomere erreicht und somit eine fortwährende Zellteilung ermöglicht. Eine erhöhte Telomeraseaktivität konnte auch schon in HCC-Vorstufen [Oh et al., 2003] festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung der Telomerase ein frühes Ereignis in der Hepatokarzinogenese darstellt. Dies konnte auch kürzlich in einer Studie zu Mutationsprofilen von Lebertumoren bestätigt werden [Schulze et al., 2015]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Aktivierung der Telomerase nicht ausreichend ist, um einen maligne transformierten Phänotyp in Zellen hervorzurufen [Harley, 2002]. Vielmehr bedarf es weiterer Veränderungen, von denen einige in Kapitel 1.2 angeführt sind.

Die Stabilisierung der Telomere ist somit als notwendige, jedoch nicht als hinreichende Bedingung für die maligne Transformation somatischer Zellen zu betrachten. Dabei ist die Regulation der Telomerlänge jedoch nicht immer von der Aktivität der Telomerase abhängig. Während etwa 90 % der humanen Malignome ihre Telomere über eine erhöhte Telomeraseaktivität stabilisieren, funktioniert dies bei den restlichen 10 %, insbesondere bei Sarkomen, auf eine andere Weise [Stewart, 2005]. Diese wurde 1995 zuerst beschrieben und als ALT (alternative lengthening of telomeres) bezeichnet [Rogan et al., 1995].

## **1.4 Das Hepatitis C Virus und seine Rolle in der Hepatokarzinogenese**

### **1.4.1 Das Hepatitis C Virus (HCV)**

HCV ist ein hepatotropes RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae. Sein Genom besteht aus einem etwa 9600 Nukleotide umfassenden, positiv ausgerichteten RNA-Einzelstrang. Es sind 6 unterschiedliche Genotypen des HCV bekannt, die sich in ihrer Nukleotidsequenz zu über 30 % unterscheiden [Simmonds et al., 2005]. Im Jahre 1989 wurde das HCV erstmals als Auslöser der bis dahin als Non-A-Non-B-Hepatitis bekannten Hepatitis C identifiziert [Choo et al., 1989].

Die Virus-RNA besitzt einen offenen Leserahmen und wird in der Wirtszelle in ein einziges Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren translatiert. Dieses wird von wirtseigenen Peptidasen und proteolytisch wirkenden Untereinheiten des Polyproteins (auto-)proteolytisch gespalten. So entstehen 3 strukturelle Proteine (Core und die Hüllproteine E1 und E2) sowie 7 nicht-strukturelle Proteine (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B). Die Proteine p7 und NS2 sind Kofaktoren bei der Bildung neuer Virionen, NS3 erfüllt mit dem Kofaktor NS4A einen Teil der Spaltung des Polyproteins. NS5A reguliert die Virusreplikation und ist ebenfalls an der Bildung neuer Virionen beteiligt. NS5B ist eine RNA abhängige RNA-Polymerase und synthetisiert neue RNA Stränge [Alvisi et al., 2011]. Die infektiösen Virionen bestehen aus einem Nucleocapsid, bestehend aus Core und dem RNA-Strang und

einer lipidreichen Hülle, welche die Glykoproteine E1 und E2 enthält [Bartenschlager et al., 2011]. Über die Interaktion der Glykoproteine E1 und E2 mit verschiedenen Rezeptoren und Oberflächenmolekülen auf den Zielzellen können die Virionen durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden und so neue Zellen infizieren. Die hierfür wichtigsten Strukturen der Zielzellen sind SR-B1 (scavenger receptor B1), CD81 und die Tight-junction Moleküle Claudin-1 und Occludin [Burlone et Budkowska, 2009].

### **1.4.2 HCV in der Hepatokarzinogenese**

Wie weiter oben beschrieben, entwickelt sich der größte Teil der HCCs auf dem Boden einer bestehenden Leberzirrhose. Der Mechanismus und die Charakteristika dieses Prozesses wurden ebenfalls weiter oben dargelegt. In diesem Kapitel wird der Einfluss von Bestandteilen des HCV im Rahmen der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese verdeutlicht und, unabhängig von den allgemeinen Mechanismen, besonderes Augenmerk auf den Einfluss der HCV-Proteine NS3, NS5A und Core auf die maligne Transformation und Progression von Hepatozyten gelegt.

Im Gegensatz zu HBV, dessen DNA-Genom in das Genom der Wirtszelle integriert und dadurch zur malignen Transformation beitragen kann [Guerrero et Roberts, 2005], findet die Integration des HCV-Genoms aufgrund der Tatsache, dass es sich um ein RNA Genom handelt, nicht statt. Statistische Daten zeigen jedoch, dass die jährliche Neuerkrankungsrate des HCC in einer durch die chronische Hepatitis C verursachten Leberzirrhose mit 3-8 % [Ioannou et al., 2007] höher ist als beispielsweise in einer durch die Autoimmunhepatitis verursachten Leberzirrhose (1,1 %/Jahr) [Yeoman et al., 2008]. Außerdem weisen einige Studien darauf hin, dass sich ein HCC bei chronisch HCV-infizierten Patienten auch ohne eine vorher bestehende Leberzirrhose entwickeln kann [Lok et al., 2009; Yeh et al., 2010]. Diese Beobachtungen weisen auf einen möglichen direkten karzinogenen Effekt des HCV

hin, der unabhängig von Leberzirrhose und den äußeren Einflüssen der chronischen Entzündung besteht.

Diese Annahme wird weiterhin unterstützt durch Studien an transgenen Mäusen, welche unterschiedliche HCV-Proteine in unterschiedlichem Ausmaß exprimierten. So zeigte sich in transgenen, das HCV-Core Protein exprimierenden C57BL/6 Mäusen das Auftreten von HCCs ohne eine chronische Entzündungsreaktion [Moriya et al., 1998]. Die Bildung von HCCs zeigte sich ebenso in C57BL/6 Mäusen, welche das gesamte HCV Polyprotein [Lerat et al., 2002], und auch in solchen, welche das NS5A Protein exprimierten [Wang et al., 2009]. Eine Rolle in der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese scheint auch die Bildung von oxidativem Stress zu spielen. So konnte in HCV-infizierten Zellkulturen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS – reactive nitrogen species) nachgewiesen werden. Diese sind in der Lage, DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren und damit zu Mutation und Transformation beizutragen [Machida et al., 2006; Machida et al., 2004]. Konkret konnte eine vermehrte Bildung von oxidativem Stress für die Proteine Core [Okuda et al., 2002; Korenaga et al., 2005], NS3 [Bureau et al., 2001] und NS5A [Gong et al., 2001] nachgewiesen werden. Neben direkten Schäden am Erbgut, die durch die Bildung von oxidativem Stress hervorgerufen werden können, kann vermehrter oxidativer Stress auch zur Beeinflussung von vielen zellulären Signalkaskaden führen, die an der Regulation von Zellzyklus und Apoptose, Zellwachstum, Zellteilung und Angiogenese beteiligt sind [Martindale et Holbrook, 2002; Tien Kuo et Savaraj, 2006]. Darüber hinaus sind direkte Wirkungen auf Apoptose- und Zellzyklusregulation sowie die Beeinflussung verschiedener wachstumsfördernder Signalkaskaden durch NS3 und NS5A und Core beschrieben [Tsai et Chung, 2010]. Hervorgehoben sei hier die Wirkung der Proteine auf die durch p53/p21 vermittelte Apoptose- und Zellzyklusregulation. Sowohl für Core [Kwun et al., 2003], als auch für NS3 [Kwun et al., 2001] und NS5A [Lan et al., 2002], konnte eine Suppression der p53-

abhängigen Expression von p21 gezeigt werden, was durch die dadurch gehemmte Zellzykluskontrolle einen transformationsfördernden Umstand darstellt.

Diese beschriebenen Wirkungen der HCV-Proteine stehen im Verdacht, im Rahmen der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese zur malignen Transformation von Leberzellen und damit zur Tumorentstehung beizutragen. Ein kompletter Mechanismus konnte bisher jedoch nicht abgeleitet werden. Viele Wirkungen der HCV-Proteine, die im Verdacht stehen die Tumorentstehung zu fördern, sind in nicht leberspezifischen und/oder Tumorzelllinien wie NIH3T3, Huh-7 oder HepG2 untersucht worden. Die Wirkung der Proteine in unveränderten humanen Hepatozyten bleibt indes zu großen Teilen unklar.

## **1.5 Modellsystem zur Untersuchung der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese**

Um die isolierte direkte Wirkung auf das Wachstum und eine mögliche maligne Transformation von Leberzellen durch einzelne HCV-Proteine zu untersuchen, ist die Verwendung eines vereinfachten Modellsystems erforderlich. Hierzu eignet sich ein Zellkulturmodell, in dem komplexe Interaktionen zwischen interzellulären und humoralen Einflussfaktoren, wie sie im Gewebeverband vorhanden sind, zunächst keine Berücksichtigung finden.

Primäre Hepatozyten lassen sich aus Spenderlebern isolieren. Jedoch ist die Kultivierung primärer Hepatozyten zeitlich begrenzt und so die Untersuchung längerfristiger Einflüsse durch schädigende Noxen schwierig. Bisherige Studien zur Untersuchung der direkten HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese bedienen sich vor allem transgener Mausmodelle und auf Zellkulturebene Hepatomazelllinien wie HepG2, Huh-7 oder Hep3B. In diesen ist die Beurteilung des direkten transformierenden Potenzials von HCV-Proteinen gegenüber humanen Hepatozyten nur begrenzt möglich, da es sich im Falle der Hepatomazelllinien um bereits transformierte Zellen handelt.

Eine Lösung für dieses Problem bietet ein von *Wege et al.* generiertes Zellkulturmodell. Hierbei wurden fetale Hepatozyten (FH) aus 22 bis 24 Wochen alten humanen Feten isoliert. Durch eine stabile ektope Expression der humanen katalytischen Untereinheit hTERT (human telomerase reverse transcriptase) des Telomerase-Holoenzym konnte eine Aktivierung der Telomerase in den Zellen erreicht werden. Hierdurch konnte eine Stabilisierung der Telomere erzielt und die Zellen dadurch immortalisiert werden [Wege et al., 2003]. Diese Zelllinie (FH-hTERT) konnte in Kultur bis auf über 300 Populationsverdopplungen (PD) propagiert werden, wohingegen Telomerase-negative fetale Hepatozyten nach 35 bis 40 PD einen Übergang in das Stadium der Seneszenz zeigen [Wege et al., 2003]. Die FH-hTERT Zelllinie zeigt hepatozytenspezifische Funktionen wie Harnstoffsynthese, Albuminproduktion, Glukose-6-Phosphat-Aktivität, Glykogensynthese und die Expression von Cytochrom P450 Enzymen [Wege et al., 2003]. Außerdem zeigte sich nach Transplantation eine Integration von FH-hTERT in das Lebergewebe immundefizienter Mäuse, wobei Differenzierungspotenzial und Phänotyp der transplantierten Zellen erhalten blieben [Wege et al., 2003].

Die induzierte Telomeraseaktivität in FH-hTERT bewirkt dabei auch in Langzeitkultur keine maligne Transformation der Zellen. Dabei zeigen die Zellen auch nach sehr vielen Zellteilungen keine für Tumorzellen typischen Merkmale wie verankerungs- oder wachstumsfaktorunabhängiges Wachstum. Darüber hinaus zeigte sich eine erhaltene Kontaktinhibition des Wachstums bei einer Konfluenz von 100 % sowie eine intakte DNA-Schadensantwort via p53 und p21 (cyclin-dependant kinase inhibitor 1A) nach DNA-Schädigung durch Strahlung oder Camptothecin [Wege et al., 2003; Haker et al., 2007].

Wie weiter oben beschrieben stellt die Aktivierung der Telomerase und die Stabilisierung der Telomere ein frühes und für das HCC sehr typisches Merkmal dar, ohne dabei per se einen maligne transformierten Phänotyp zu induzieren. In weiteren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivierung der Telomerase in FH-hTERT im Sinne eines „first hit“ im

mehrstufigen Prozess der Hepatokarzinogenese die Schwelle zur malignen Transformation der Zellen senkt. So führte z.B. eine konstitutive Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges schon nach wenigen Passagen zur malignen Transformation der Zellen mit Tumorwachstum im Nacktmausmodell [Wege et al., 2011]. Das FH-hTERT Zellkulturmodell stellt daher und aufgrund seines erhaltenen hepatozytenspezifischen Phänotyps bei niedriger Schwelle zur malignen Transformation ein geeignetes Modell zur Untersuchung von transformationsfördernden Einflussfaktoren im Rahmen des mehrstufigen Prozesses der Hepatokarzinogenese dar.

## **1.6 Zielsetzung**

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln dargelegt, stellt die chronische Hepatitis C einen der wesentlichen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Leberzirrhose und auch des HCC dar. Eine Reihe von Studien deutet darauf hin, dass neben den transformationsfördernden Effekten der chronischen Entzündung auch das Virus an sich bzw. dessen strukturelle und nicht-strukturelle Proteine direkt transformationsfördernde Effekte in den Zielzellen auslösen. Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, das Potenzial der Induktion einer malignen Transformation durch die HCV-Proteine NS3, NS5A und Core im FH-hTERT-Zellkulturmodell zu untersuchen. Hierzu wurde mittels stabiler Transfektion von FH-hTERT mit Transgen-tragenden Expressionsplasmiden die Expression der entsprechenden Proteine in den Zellen induziert. Unter Berücksichtigung der in anderen Studien beschriebenen Induktion von genotoxischem oxidativem Stress durch NS3, NS5A und Core bei gleichzeitiger Suppression der durch p53/p21 vermittelten DNA-Schadensantwort als möglichem Mechanismus für die Induktion einer malignen Transformation, wurden diese Parameter in den transfizierten FH-hTERT bestimmt. Anschließend wurden die Zellen anhand der Merkmale Proliferation und verankerungs- und wachstumsfaktorunabhängiges Wachstum hinsichtlich einer möglichen malignen Transformation charakterisiert. Hierbei erwarteten wir

für alle drei genannten Proteine proliferationsbeeinflussende und transformationsfördernde Effekte auf die Zellen, was zuvor auch in anderen Studien gezeigt werden konnte.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Zelllinien**

FH-hTERT:

Es handelt sich bei FH-hTERT um eine Zelllinie aus fetalen humanen Hepatozyten. Diese wurden aus 22 bis 24 Wochen alten humanen Feten gewonnen, welche aus elektiven Schwangerschaftsabbrüchen hervorgingen. Die isolierten Zellen zeigten keine Telomeraseaktivität und traten nach ca. 40 PD in das Stadium der Seneszenz ein [Wege et al., 2003]. Durch Transduktion konnte eine ektope Expression der katalytischen Untereinheit hTERT des Telomerase-Holoenzym erreicht werden. Dies führte zur Aktivierung der Telomerase und dadurch zu einer Immortalisierung der Zellen mit unbegrenzter Teilungsfähigkeit [Wege et al., 2003]. Die Zellen zeigen in Kultur ein rein einschichtiges Wachstum bei einer ungefähren Populationsverdopplungszeit von 24 h bei ungehemmtem Wachstum in serumangereichertem Zellkulturmedium. Die Telomerlänge beträgt durchschnittlich etwa 11,5 kb. Gegen die Verwendung der Zelllinie FH-hTERT in weiteren experimentellen Arbeiten zur humanen Hepatokarzinogenese bestehen von Seiten der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg keine Bedenken (Bescheid OB-034/06 vom 10.10.2006).

Huh-7:

Huh-7 ist eine Tumorzelllinie, die im Jahre 1982 von *Nakabayashi et al.* aus einem gut differenzierten HCC eines 57 Jahre alten Japaners etabliert wurde. Die Zelllinie zeigt

einschichtiges Wachstum in serumfreiem und mehrschichtiges Wachstum in serumangereichtem Medium sowie ein verankerungsunabhängiges Wachstum im Sinne einer Koloniebildung im Softagarassay. Die Populationsverdopplungszeit beträgt etwa 36 h. Huh-7 Zellen zeigen Telomeraseaktivität bei einer durchschnittlichen Telomerlänge von etwa 25 kb [Nakabayashi et al., 1982]. Die Huh-7 Zellen dienten in dieser Arbeit als Positivkontrolle im Softagarassay.

### **2.1.2 Expressionsplasmide**

Um die ektope Expression der HCV-Proteine NS3, NS5A und Core in FH-hTERT zu gewährleisten, wurden die folgenden Expressionsplasmide verwendet, die durch Transfektion in die Zellen eingebracht wurden. Die Expressionsplasmide wurden über die Plattform Addgene (Cambridge, MA, USA) erworben. Neben den Transgen-tragenden Plasmiden wurde einer der Leervektoren (pcDNA 3.1 (+), Invitrogen) für die Transfektion zur Generierung der Kontrollzelllinie verwendet.

pCMV-Tag1-NS3 (Addgene Plasmid # 17645):

Das Expressionsplasmid enthält die genetische Sequenz des HCV-NS3 Proteins des Genotyps 1b unter der Kontrolle des Promotors des Zytomegalievirus (CMV). Die Sequenz umfasst 1900 Basenpaare (bp) und wurde in den Plasmidvektor pCMV-Tag1 (Agilent Technologies) kloniert [Budhu et al, 2007]. Der Plasmidvektor enthält Resistenzgene für Kanamycin zur Selektion Plasmid tragender Bakterien und Neomycin für die Selektion in eukaryotischen Zellen. Die Plasmide wurden in dem Bakterienstamm E. coli DH5alpha (Invitrogen) bereitgestellt.

pCMV-Tag1-NS5A (Addgene Plasmid # 17646):

Das Expressionsplasmid enthält die genetische Sequenz des HCV-NS5A Proteins des Genotyps 1b unter der Kontrolle des Promotors des Zytomegalievirus (CMV). Die Sequenz umfasst 1400 bp und wurde in den Plasmidvektor pCMV-Tag1(Agilent Technologies)

kloniert [Budhu et al, 2007]. Der Plasmidvektor enthält Resistenzgene für Kanamycin zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien und Neomycin für die Selektion in eukaryotischen Zellen. Die Plasmide wurden in dem Bakterienstamm E. coli DH5alpha bereitgestellt.

CMV-FLAG-Core-R (Addgene Plasmid # 24480):

Das Expressionsplasmid enthält die genetische Sequenz des HCV-Core Proteins des Genotyps 1b unter der Kontrolle des Promotors des Zytomegalievirus (CMV). Die Sequenz umfasst 600 bp und wurde in den Plasmidvektor pcDNA 3.1 (+) kloniert [Schwer et al., 2004]. Der Plasmidvektor enthält Resistenzgene für Ampicillin zur Selektion Plasmid tragender Bakterien und Neomycin für die Selektion in eukaryotischen Zellen. Die Plasmide wurden in dem Bakterienstamm E. coli DH5alpha bereitgestellt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Zellkultur**

In der Zellkultur wurde die Zelllinie FH-hTERT verwendet, welche etwa 30 bis 75 PD durchlaufen hatten. Als Positivkontrolle im Softagarassay diente die Zelllinie Huh-7.

Die Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit einer Konzentration von 4,5 g/l Glukose (Invitrogen), welches zusätzlich mit hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum (FBS) (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 10 % v/v, dem Antibiotikum Gentamycin (10 µg/ml; Invitrogen), dem Antimykotikum Amphotericin B (0,25 µg/ml; Invitrogen) sowie im Falle von FH-hTERT Insulin (5 µg/ml; Sigma-Aldrich) und Hydrocortison (2,4 µg/ml; Sigma-Aldrich) angereichert wurde. Im Falle der mit den Expressionsplasmiden transfizierten Zellen wurde dem Kulturmedium zusätzlich Geneticin (Invitrogen) in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und bei einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem Zellinkubator (Heraeus BB16; Thermo Scientific). Als Kulturgefäße wurden T25 und T75

Zellkulturflaschen (Sarstedt) mit einer Auflagefläche von 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> verwendet. Wenn die Zellen in den Zellkulturflaschen eine Konfluenz von etwa 80 - 100 % erreichten, wurden sie passagiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen dabei einmal mit PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Invitrogen) gewaschen. Daraufhin erfolgte durch Verdau mit 0,25 %igem Trypsin-EDTA (Invitrogen) für 4 - 5 min im Zellinkubator die Ablösung der Zellen von der Unterlage. Die Ablösungsreaktion wurde im Folgenden durch die Resuspension der Zellen in serumhaltigem Medium gestoppt. Nach der Resuspension wurden die Zellen in gewünschter Dichte neu ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wenn nötig mittels Neubauer Zählkammer (Brand) unter dem Mikroskop (DM IL; Leica). Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte bei 500 g und 4° C für 3 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG). Um die Zellen dauerhaft lagern und bei Bedarf wieder in Kultur nehmen zu können, erfolgte eine Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden Aliquots zwischen 0,5 und 2 x 10<sup>6</sup> Zellen verwendet. Die Ablösung, Resuspension und Zählung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach Zentrifugieren und Absaugen des Mediumüberstandes erfolgte die Resuspension in jeweils 1 ml Gefriermedium, bestehend aus 80 % v/v DMEM, 10 % v/v FBS und 10 % v/v DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich) und Überführung in 1,8 ml Cryo-Tubes (Sigma-Aldrich), gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Cryo-Tubes in einen Gefriercontainer (Nalgene) überführt und für 24 h bei -80° C gelagert. Danach folgte die Überführung in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung bei -180° C. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in den Cryo-Tubes in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut und sofort in vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in Zellkulturflaschen ausgesät. Alle zellkulturellen Arbeiten erfolgten an einer sterilen Werkbank (Heraeus HS; Thermo Scientific).

### **2.2.1.2 Propagierung von Expressionsplasmiden**

Um für die Transfektion von FH-hTERT ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, musste die Plasmid-DNA zunächst in Bakterienkultur vermehrt werden. Alle von der Plattform Addgene erworbenen Plasmide wurden dabei in dem Bakterienstamm E. coli DH5alpha in Mischkultur auf Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) bereitgestellt. Zunächst wurde von jeder Mischkultur ein Drei-Ösen-Ausstrich auf LB-Agar (Invitrogen) durchgeführt. Dem Agar wurden dabei für die Selektion Plasmid-tragender Bakterien Antibiotika zugesetzt. Im Falle von pCMV-Tag1-NS3 und pCMV-Tag1-NS5A wurde dem LB-Agar Kanamycin-Sulfat (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Im Falle von CMV-FLAG-Core-R wurde Ampicillin (Gibco) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Agarplatten für 24 h, gefolgt vom Aufnehmen einer einzelnen resistenten Bakterienkolonie mittels steriler Pipettenspitze und deren Überführung in 5 ml LB-Medium (Roth), versetzt mit den gleichen Antibiotika gleicher Konzentration wie im Falle des LB-Agar. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurde jeweils 1 ml dieser Bakteriensuspension in 250 ml des beschriebenen LB-Selektivmediums überführt und eine weitere Inkubation für 16 h durchgeführt. Schließlich wurden die Bakterien bei 3700 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet bei -20° C gelagert.

### **2.2.1.3 Transfektion von FH-hTERT mittels Elektroporation**

Um eine stabile Expression von HCV-Proteinen in FH-hTERT zu erreichen, wurden FH-hTERT mit den beschriebenen Expressionsplasmiden mittels Elektroporation transfiziert. Bei der Elektroporation werden die zu transfizierenden Zellen einem elektrischen Impuls ausgesetzt, welcher die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig erhöht und dadurch per

Diffusion ein Eindringen von gleichzeitig mit den Zellen in Lösung gebrachten Nukleinsäuren erlaubt [Potter et al., 1984].

Für die Transfektion wurde das Transfektionssystem Nucleofector 2b (Lonza) und das Nucleofektor V Kit (Lonza) verwendet. Als Transfektionsprogramm wurde das in dem System gespeicherte Programm T 018 verwendet. Die Verwendung des Nucleofektor V Kit in Kombination mit dem Programm T 018 konnte in zuvor durchgeführten Reihenuntersuchungen als optimales Transfektionsprogramm für FH-hTERT identifiziert werden. In der Durchführung wurden FH-hTERT in T75-Zellkulturflaschen wie weiter oben beschrieben bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Nach Ablösen der Zellen von der Wachstumsoberfläche und einmaligem Waschen mit PBS wurden jeweils  $1 \times 10^6$  FH-hTERT in 100  $\mu$ l der in dem Nucleofektor V Kit enthaltenen Reaktionslösung resuspendiert und in die in dem Kit ebenfalls bereitgestellten Reaktionsküvetten überführt. Zu je einem solchen Ansatz wurden 5  $\mu$ l einer Lösung von pcDNA 3.1 (+), pCMV-Tag1-NS3, pCMV-Tag1-NS5A oder CMV-FLAG-Core-R mit einer Konzentration von 1  $\mu$ g DNA/ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Daraufhin wurde die jeweilige Reaktionsküvette in das Transfektionssystem überführt und das Programm T 018 gestartet. Im Anschluss wurde den Reaktionsansätzen 500  $\mu$ l Zellkulturmedium zugefügt. Diese Suspension wurde aus den Küvetten in 6-Well-Zellkulturplatten (Sarstedt) mit vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt. Nach 24 h erfolgte ein erster Wechsel des Zellkulturmediums. Am dritten Tag nach der Transfektion wurde dem Zellkulturmedium zur Selektion transfizierter Zellen Geneticin in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben. Vor dem Beginn weiterer Experimente wurden die transfizierten Zellen für 4 Wochen in dem Selektionsmedium kultiviert, um eine ausreichende Selektion stabil transfizierter Zellen zu gewährleisten. Die transfizierten FH-hTERT werden im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet: FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3, FH-hTERT-NS5A und FH-hTERT-Core.

### 2.2.1.4 Gewinnung von Einzelzellklonen

Zur Durchführung weiterer Experimente an den transfizierten FH-hTERT wurden aus den transfizierten FH-hTERT-Mischkulturen Einzelzellklone abgeleitet. Hierzu wurden jeweils 100 Zellen der FH-hTERT-Mischkulturen FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3, FH-hTERT-NS5A und FH-hTERT-Core auf eine 60 mm-Zellkulturschale (Sarstedt) ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert. Nach 24 h wurde der Standort allein stehender einzelner Zellen unter mikroskopischer Kontrolle auf der Zellkulturschale markiert. Es folgte eine Kultivierung der so ausgesäten Zellen für 2 Wochen. Im Folgenden wurden diejenigen Zellkolonien, die sich aus den markierten Zellen gebildet hatten, umrandend markiert. Daraufhin wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, gefolgt von einmaligem Waschen mit PBS. Anschließend wurden Polystyren-Klonierungszyylinder (Scienceware Cloning Cylinders, Sigma-Aldrich), bei denen zuvor die Unterkante mit steriler Vaseline (Sigma-Aldrich) beschichtet wurde, auf die markierten Zellkolonien aufgesetzt, um einen dichten Abschluss der Zylinder gegenüber der restlichen Zellkulturschale zu gewährleisten. Abbildung 1 verdeutlicht diesen Vorgang.

**Abbildung 1:** Gewinnung von Einzelzellklonen

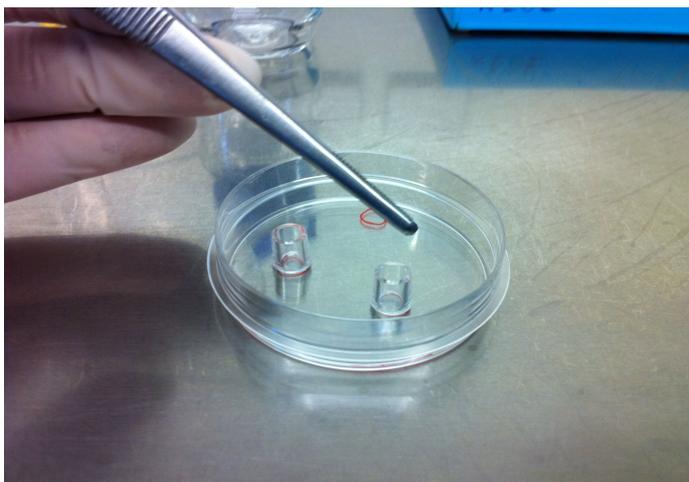


Abb. 1 (eigene Aufnahme): Das Aufsetzen des Klonierungszyinders ermöglicht die Ablösung einer Einzelzellkolonie innerhalb der von ihm begrenzten Fläche.

Die Ablösung der Einzelzellkolonien erfolgte innerhalb der von den Zylindern begrenzten Fläche durch 0,25 %iges Trypsin-EDTA. Die abgelösten Zellen wurden innerhalb des Zylinders in Zellkulturmedium suspendiert und in 96-Well-Zellkulturplatten (Sarstedt) überführt. In der Folge wurden die Zellen wie weiter oben beschrieben kultiviert, passagiert und ggf. bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Mit dieser Methode wurde aus den Mischkulturen ein Zellklon von FH-hTERT-pcDNA und jeweils mehrere Zellklone von FH-hTERT-NS3, FH-hTERT-NS5A und FH-hTERT-Core abgeleitet. Aus diesen wurden im weiteren Verlauf jeweils drei Klone für die weiteren Experimente ausgewählt. Jeweils ein Klon der verschiedenen Zelllinien diente dabei als Referenz für die relative Quantifizierung der Transgen-Expression. Die anderen beiden wurden so ausgewählt, dass ein jeweils schwach bzw. stark exprimierender Klon vorhanden war. Die beschriebenen Klone werden im Folgenden als FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2 bezeichnet.

### **2.2.1.5 Softagarassay**

Um eine mögliche maligne Transformation durch den Einfluss der HCV-Proteine NS3, NS5A und Core in FH-hTERT zu dokumentieren, wurde unter anderem ein Softagarassay durchgeführt. Verankerungsunabhängiges Wachstum ist ein etablierter Marker für Tumorzellwachstum in vitro und kann durch Koloniebildung im Softagarassay überprüft werden [Clark et al., 1995].

Für die Durchführung wurde in 60-mm-Zellkulturschalen zunächst eine Schicht aus 7 ml Basisagar (base-agar) ausgebracht. Der Basisagar hatte dabei folgende Zusammensetzung:

- 10 % v/v 2 x DMEM (20 g/l H<sub>2</sub>O DMEM high glucose powder; Gibco und 7,4 g/l in H<sub>2</sub>O gelöstes NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; Sigma-Aldrich), pH 7,4
- 10 % v/v FBS (Sigma-Aldrich)

- 10 % v/v 10 x Agar (50 g/l H<sub>2</sub>O Agar, Cell culture tested; Sigma-Aldrich)
- 70 % v/v DMEM (Sigma-Aldrich)
- Geneticin (Endkonzentration 200 µg/ml; Invitrogen), Gentamycin (Endkonzentration 10 µg/ml; Invitrogen), Amphotericin B (Endkonzentration 0,25 µg/ml; Invitrogen)

Im Anschluss wurden jeweils 5000 Zellen von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2 sowie FH-hTERT-pcDNA als Negativkontrolle und Huh-7 als Positivkontrolle, welche in Zellkulturmedium suspendiert waren, im Verhältnis 1:2 mit dem Basisagar gemischt und diese auch als Topagar bezeichnete Mixtur auf die Schicht des in den Zellkulturschalen befindlichen Basisagars gegeben.

Es folgte eine Inkubation in gewohnter Weise für insgesamt 6 Wochen, wobei jeweils wöchentlich 0,5 ml Zellkulturmedium auf die Agarschicht tröpfchenweise aufgetragen wurde. Eine Auswertung des Koloniewachstums erfolgte nach 3 und 6 Wochen.

### **2.2.1.6 Proliferationsanalyse**

Um einen möglichen Einfluss der HCV-Proteine auf die Proliferationseigenschaften von FH-hTERT zu bestimmen, wurde die Proliferation von den FH-hTERT Zellklonen FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2 und FH-hTERT-pcDNA als Negativkontrolle mittels Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous One Cell Proliferation Assay (Promega) gemessen. Bei diesem Verfahren wird zu den Zellen im Sinne eines colorimetrischen Verfahrens eine farblose Tetrazoliumverbindung gegeben, welche durch die Zellen enzymatisch vor allem mittels NADPH und NADH zu einer farbigen Formazan-Verbindung reduziert wird. Diese zeigt Absorption von Licht der Wellenlänge von 490 nm. Die Absorption ist dabei proportional zum Anteil lebender Zellen [Barltrop et al., 1991; Cory et al., 1991]. Hierdurch können Rückschlüsse auf die Zellzahlen und damit im zeitlichen Verlauf auf die Proliferationsgeschwindigkeit gezogen werden. In der Durchführung wurden

die Wells von 96-Well-Zellkulturplatten (0,3 cm<sup>2</sup> pro Well; Sarstedt) mit je 2500 Zellen der unterschiedlichen FH-hTERT Zellklone in 100 µl des üblichen Zellkulturmedium beschickt und wie üblich kultiviert. Zu jedem Messzeitpunkt wurden in jeweils 8 Wells einer jeden Platte je 20 µl der Cell Titer 96-Lösung gegeben. Darauf folgte eine weitere Inkubationszeit von 60 min im Inkubator. Anschließend wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mithilfe eines Spektralphotometers (Ultra Microplate Reader EL 808; Bio-Tek) und zugehöriger Software (KC4; Bio-Tek) gemessen. Die Messungen erfolgten täglich an 8 aufeinanderfolgenden Tagen.

### **2.2.1.7 Proliferationsanalyse in serumfreiem Zellkulturmedium**

Ein Merkmal maligne transformierter Zellen ist das wachstumsfaktorunabhängige Wachstum [Hanahan et Weinberg, 2000]. In vitro kann dieses durch die Kultivierung von Zellen in serumfreiem Medium bestimmt werden, da in dem Serum des Zellkulturmediums Wachstumsfaktoren enthalten sind. Nicht transformierte FH-hTERT benötigen zur Proliferation serumhaltiges Medium. Um zu überprüfen, ob der Einfluss von NS3, NS5A und Core zu wachstumsfaktorunabhängigem Wachstum führt, wurde die soeben beschriebene Proliferationsanalyse durchgeführt, wobei die unterschiedlichen FH-hTERT-Zellklone in serumfreiem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Die Versuchsdurchführung entspricht im Allgemeinen der vorher beschriebenen. In diesem Experiment wurde jedoch 24 h nach Aussaat der Zellen das Zellkulturmedium abgesaugt und durch serumfreies, in allen anderen Belangen identisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Messungen erfolgten täglich an 8 aufeinanderfolgenden Tagen.

### **2.2.1.8 Nachweis von oxidativem Stress**

Wie in der Einleitung dargestellt, kann der Einfluss der HCV-Proteine NS3, NS5A und Core zur vermehrten Bildung von oxidativem Stress führen, welcher über die dort dargelegten

Mechanismen zur malignen Transformation von Zellen beitragen kann. In diesem Sinne wurde in den transfizierten FH-hTERT-Einzelzellklonen FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2 sowie in FH-hTERT-pcDNA als Negativkontrolle das Ausmaß an oxidativem Stress gemessen.

Für die Bestimmung des oxidativen Stresses wurde Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat; Invitrogen) verwendet. Dieses nicht fluoreszierende Molekül wird intrazellulär durch zelluläre Esterasen zu Carboxy-H<sub>2</sub>DCF deacetyliert. Anschließend wird dieses in Anwesenheit von ROS, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Hydroxylradikalen ( $\bullet$ OH), und RNS, wie z.B. Peroxynitritonen (ONOO<sup>-</sup>), zum grün fluoreszierenden Carboxy-DCF (5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein) umgewandelt [Myhre et al., 2003; Hirabayashi et al., 1985], welches bei Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 492 - 495 nm Licht der Wellenlänge von 517 - 527 nm aussendet. Das beschriebene ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

**Abbildung 2:** Prinzip der Messung von oxidativem Stress mittels Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA

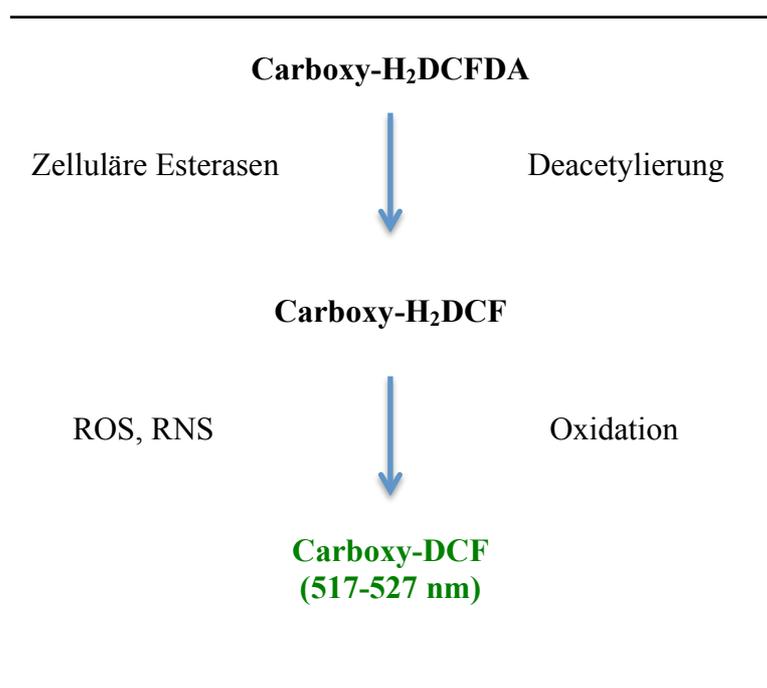


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips der Umwandlung von Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA in Carboxy-DCF durch ROS und RNS. Carboxy-DCF fluoresziert nach Anregung bei einer Wellenlänge von 517-527 nm.

In der Durchführung wurden  $0,25 \times 10^6$  Zellen eines jeden Einzelzellklons in T25-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60-80 % kultiviert. Zunächst wurde dann das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution; Gibco) einmal gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Zellen für 30 min bei 37° C im Inkubator in einer Lösung aus HBSS und Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (Endkonzentration 25 µmol/l), welche zuvor aus einer 10 mM Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA-Lösung in DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich) durch Verdünnung mit HBSS hergestellt wurde. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen zweifach mit HBSS gewaschen. Nun erfolgte die Ablösung der Zellen durch Trypsin-EDTA wie zuvor beschrieben, gefolgt von einer Passage der Zellen durch einen 70 µm Cell Strainer (BD Biosciences). Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, erneut mit PBS gewaschen und schließlich in 200 µl PBS resuspendiert. Mittels Durchflusszytometrie mit dem Gerät FACSCanto (BD Biosciences) wurde die Fluoreszenz der Proben nach Anregung mittels Licht einer Wellenlänge von 492 nm bei 520 nm gemessen und durch Auswertung mit der Software FACSDiva 5 (BD Biosciences) die mittlere Intensität der Fluoreszenz der jeweiligen Probe bestimmt.

Als Negativkontrolle wurde in diesem Versuchsaufbau FH-hTERT-pcDNA verwendet.

Als Positivkontrolle dienten zuvor behandelte FH-hTERT-pcDNA. Die Behandlung erfolgte dabei durch Inkubation für 1 h bei 37° C in Zellkulturmedium, welches mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Endkonzentration 500 µmol/l, Sigma-Aldrich) und BSO (DL-Buthionin-[S,R]-sulfoximin, Endkonzentration 5 µmol/l; Sigma-Aldrich) versetzt wurde. BSO ist dabei ein Hemmstoff der Gluthation-Synthese, wodurch der Abbau von ROS und RNS gehemmt wird. Die gewählten Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO hatten sich in zuvor durchgeführten Reihenuntersuchungen als höchste von FH-hTERT tolerierte Dosis der beiden Reagenzien erwiesen.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen**

Für die Transfektion von FH-hTERT mit den in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Expressionsplasmiden musste die Plasmid-DNA aus den in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Bakterienpellets zunächst extrahiert und aufgereinigt werden. Hierzu wurde das EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei erfolgt zunächst eine alkalische Lyse der Bakterienzellen. Das Lysat wird danach filtriert und durch ein Anionen-Austauscherharz geleitet, wobei die Plasmid-DNA an das Harz gebunden wird. Daraufhin erfolgen mehrmaliges Waschen des Austauscherharzes und schließlich die Elution der aufgereinigten Plasmid-DNA. Diese wird durch Präzipitation mit Isopropanol ausgefällt, anschließend abzentrifugiert, gewaschen und schließlich in H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

Die Versuchsdurchführung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit den Bakterienpellets der mit pCMV-Tag1-NS3, pCMV-Tag1-NS5A und CMV-FLAG-Core-R transformierten E. coli DH5alpha durchgeführt.

### **2.2.2.2 DNA-Extraktion**

Als Ausgangsmaterial für die weiter unten beschriebene Platinum-PCR wurde aus den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen die DNA extrahiert. Hierzu wurde das NucleoSpin Tissue Kit (Machery-Nagel) verwendet. Hierbei wird die DNA nach Lyse der Zellen in Anwesenheit chaotroper Salze und Ethanol an eine Säule aus Silica-Material gebunden. Nach zweimaligem Waschen der Säule kann die DNA mit einem leicht alkalischen Elutionspuffer niedriger Ionenkonzentration eluiert und direkt verwendet werden.

Für die DNA Extraktion wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und 2, FH-hTERT-Core-1 und -2, FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert.

### **2.2.2.3 RNA-Extraktion**

Um Experimente zur Genexpression in FH-hTERT-Zellklonen durchführen zu können, musste zunächst eine RNA-Extraktion aus den Zellen erfolgen. Hierzu wurde das NucleoSpin RNA II Kit (Machery-Nagel) verwendet. Hierbei werden die Zellen zunächst lysiert. Nach einem Filtrationsschritt wird das Lysat durch eine Säule aus Silica-Material geleitet. Hierbei binden RNA und DNA an das Säulenmaterial. Durch Aufbringen einer rekombinanten DNase wird die gebundene DNA verdaut. Es folgen zwei Waschschriffe der Säule gefolgt von der Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser.

Für die Extraktion wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen der Klone FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2, FH-hTERT-pcDNA (unbehandelt und behandelt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und BSO wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben) und der Referenzklone von FH-hTERT-NS3, -NS5A und -Core eingesetzt und die Extraktion nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die RNA-Proben wurden bei  $-80^\circ \text{C}$  gelagert.

### **2.2.2.4 cDNA-Synthese**

Für die Quantifizierung von Genexpression ist es nötig, die aus den FH-hTERT Zellklonen extrahierte RNA in sogenannte cDNA (complementary DNA) zu transkribieren, da für die sich anschließende quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) DNA als Ausgangsmaterial verwendet werden muss. Hierzu wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) verwendet.

Hierbei wird die RNA mittels einer sogenannten Reversen-Transkriptase, wobei es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase handelt, in eine komplementäre einzelsträngige DNA, die cDNA, transkribiert. Neben der Reversen-Transkriptase sind in dem Kit ein spezifischer Reaktionspuffer, dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) als Bausteine für die cDNA-Synthese sowie Oligo-dT-Primer (Oligo-desoxythymidin-Primer) für die Transkription von mRNA (messenger RNA) durch Bindung an den Poly-A-Schwanz der mRNA und DNA-Hexamer-Primer zufälliger Sequenz als Primer für die Transkription anderer RNA-Spezies enthalten. In der Durchführung wurde pro Reaktionsansatz 1 µg totale RNA der FH-hTERT Zellklone FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2, FH-hTERT-pcDNA (unbehandelt und behandelt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben) und der Referenzklone von FH-hTERT-NS3, -NS5A und -Core eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls gemäß der Sektion „Standard RT-PCR Procedure B“. Als Thermocycler wurde dabei das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) verwendet. Die cDNA-Endkonzentration betrug anschließend 50 ng/µl pro Ansatz. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

### **2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben erfolgte mittels Lichtabsorptionsmessungen der unterschiedlichen Proben bei 260 und 280 nm mit dem Spektralphotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Dazu wurde jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe unverdünnt mit dem Gerät gemessen. Das Gerät ermittelte dabei automatisch die Konzentration der DNA oder RNA in der jeweiligen Probe. Zusätzlich wurde der Absorptionskoeffizient 260/280 nm bestimmt. Dieser gibt Aufschluss über die Reinheit von Nukleinsäureproben. Reine DNA weist dabei einen Quotienten von 1,8, reine RNA einen Quotienten von 2,0 auf [Sambrook et al., 1989].

### 2.2.2.6 Platinum-PCR

Um in den transfizierten FH-hTERT-Einzelzellklonen das Vorhandensein des Expressionsplasmids nachzuweisen, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Hierdurch ist es möglich, einen umschriebenen spezifischen DNA-Abschnitt, der in einer Probe vorhanden ist, zu vervielfältigen und ihn damit weiteren Anwendungen oder einem Nachweis in der Gelelektrophorese zugänglich zu machen [Mullis et al., 1986].

Für den Nachweis der Expressionsplasmide in FH-hTERT wurde durch den Einsatz spezifischer Primer eine Sequenz aus dem Neomycin-Gen der Expressionsplasmide amplifiziert. Da dieses Gen in unbehandelten FH-hTERT nicht vorhanden ist, ist durch den Nachweis dieses spezifischen Amplifikats ein Nachweis des Expressionsplasmids in der durch DNA-Extraktion gewonnenen Gesamt-DNA der FH-hTERT-Zellklone möglich. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich eine Sequenz aus dem  $\beta$ -Actin-Gen amplifiziert. Die Sequenzen der eingesetzten Primer und die zu erwartenden Längen der Amplifikate zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Primer der Platinum-PCR:** In Tabelle 1 sind die in der Platinum-PCR verwendeten Primer dargestellt und die zu erwartenden Fragmentlängen der Amplifikate dargestellt. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert.

Name	Basensequenz (5'- 3')	Fragmentlänge (bp)
Neomycin - Forward	ATG ACT GGG CAC AAC AGA CA	191
Neomycin - Reverse	AGT GAC AAC GTC GAG CAC AG	
$\beta$ -Actin - Forward	GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA	500-600
$\beta$ -Actin - Reverse	GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT	

Für die Durchführung der PCR wurde der Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) verwendet. Dieser enthält eine Taq DNA-Polymerase,  $Mg^{2+}$ , dNTPs und Reaktionspuffer. Es wurden für die Reaktion Ansätze zu jeweils 25,5  $\mu$ l eingesetzt. Diese enthielten 22,5  $\mu$ l Platinum PCR

SuperMix, je 1  $\mu\text{l}$  Primer-Lösung von Neomycin-Forward und Neomycin-Reverse (bzw.  $\beta$ -Actin-Forward und  $\beta$ -Actin-Reverse) in einer Konzentration von jeweils 200 nmol/l und 1  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung der unterschiedlichen FH-hTERT-Proben. Hierbei wurden DNA-Extrakte von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2, FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einen Thermocycler (T3 Thermocycler; Biometra) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 94° C für 2 min, gefolgt von 35 Zyklen aus Denaturierung bei 94° C für 30 s, Annealing der Primer bei 58° C für 30 s und Polymerisation bei 72° C für 1 min. Die Auswertung der Proben erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel.

### **2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um die Reaktionsprodukte der Platinum-PCR analytisch aufzutrennen und dadurch einen Nachweis der Expressionsplasmide in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen zu erlangen.

Die Elektrophorese wurde dabei in einem 2 %igen Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 2 g Agarose (Sigma-Aldrich) in 100 ml 1 x TAE-Puffer (40 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pH 8, 1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l Eisessig) durch Aufkochen in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf etwa 60° C wurden 5  $\mu\text{l}$  10000 x GelRed (Biotium) hinzugefügt. Daraufhin wurde das Gel in eine Gießvorrichtung (16 x 17 cm; Thermo Scientific) gegossen. Nach Verfestigung des Gels wurde das Gel in ein Elektrophorese-System eingebracht (Owl D4 Horizontal Electrophoresis System; Thermo Scientific), welches zuvor mit 1 x TAE-Puffer befüllt wurde. Im Folgenden wurden die Taschen des Gels mit je 15  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus 20  $\mu\text{l}$  der Reaktionsprodukte der Platinum-PCR und 4  $\mu\text{l}$  6 x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) beschickt. Als DNA-Längenstandard wurden je 5  $\mu\text{l}$  GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Ready-to-Use 100 to 1000 bp (Thermo Scientific) verwendet. Die

Elektrophorese erfolgte bei konstant 8 V/cm für 3 h. Die Auswertung des Gels wurde auf einem UV-Schirm (ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ Imaging System; Bio-Rad) vorgenommen.

### 2.2.2.8 Relative Quantifizierung der Transgen-Expression

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Transkripte der HCV-Transgene in den unterschiedlichen FH-hTERT-Zellklonen wurde eine qRT-PCR mit den cDNA-Proben der FH-hTERT-Zellklone durchgeführt. Hierzu wurden QuantiTect Primer Assays (Qiagen), die bereits hinsichtlich der PCR-Effizienz (E) validierte Primersets für spezifische Gene enthalten, in Kombination mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) verwendet. Da für die Gensequenzen von NS3, NS5A und Core keine bereits validierten Primersets kommerziell erhältlich waren, wurden mittels den beim Erwerb der Expressionsplasmide ebenfalls erhaltenen Transgen-Sequenzen und dem Software-Tool Primer3 Version 0.4.0 [Untergrasser et al., 2012; Korressaar et Remm, 2007] Primersets für die Sequenzen von NS3, NS5A und Core erstellt und durch die Firma MWG Operon synthetisiert. Die Sequenzen dieser Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Primer der qRT-PCR:** Dargestellt sind die Primer für die qRT-PCR für die Quantifizierung der NS3-, NS5A- und Core-Transkripte.

Name	Basensequenz (5'- 3')
HCV-NS3-Forward	CAG CTC GGA CCT TTA CTT GG
HCV-NS3-Reverse	GTA GAC TTC CCC TGC TGT CG
HCV-NS5A-Forward	CGC CAC TAA GAC CTT CGG TA
HCV-N5A-Reverse	AAC GTC GGA TCC TTT GTC AC
HCV-Core-Forward	CGT CGG TGG AGT TTA CCT GT
HCV-Core-Reverse	GAG CCT TGG GGA TAG GTT GT

In der Versuchsdurchführung betrug das Ansatzvolumen jeweils 10 µl, was sich wie folgt zusammensetzte: 5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl QuantiTect Primer Assay oder jeweils 1 µl eines Primermixes der in Tabelle 2 dargestellten NS3-, NS5A- und Core-Primer (Endkonzentration der Primer in jedem Ansatz 200 nmol/l), je 1 µl (50 ng/µl) cDNA von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2, FH-hTERT-pcDNA und der Referenzklone, 3 µl H<sub>2</sub>O.

Als Reaktionsgefäße wurden 384-Well-Platten (Sarstedt) verwendet. Die Reaktion erfolgte in dem Thermocycler ABI Prism 7900H (Applied Biosystems) nach folgendem

Reaktionsschema:

Initiale Denaturierung:	95° C	15 min	
Denaturierung:	94° C	15 s	← 40 Zyklen
Primer-Annealing:	55° C	30 s	
Elongation	72° C	30 s	

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz (E) für die in Tabelle 2 dargestellten Primer wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen der cDNA der zugehörigen FH-hTERT-Zellklone in dem soeben beschriebenen Versuchsaufbau eingesetzt. Aus den ermittelten Ct-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen wurde eine Standardkurve erstellt und deren Steigung ermittelt. Die PCR-Effizienz (E) wurde daraufhin nach folgender Formel errechnet:  $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$  [Rasmussen et al. 2001]. Die PCR-Effizienz E drückt den Vervielfachungsfaktor der ursprünglich eingesetzten cDNA-Menge pro Reaktionszyklus aus. Vor der Berechnung der relativen Expression mit der weiter unten stehenden Formel wurden die gemessenen Ct-Werte der einzelnen Proben im Sinne einer Effizienzkorrektur mit dem für die jeweiligen Primersets ermittelten Faktor E multipliziert. Für die in Tabelle 2 dargestellten Primer konnten folgende Effizienzen ermittelt werden:

HCV-NS3-Forward und –Reverse:	E = 1,91
HCV-NS5A-Forward und –Reverse:	E = 1,92

HCV-Core-Forward und –Reverse:  $E = 1,96$

Anschließend wurde die relative Expression der Transgene mit dem effizienzkorrigierten Modell der relativen Quantifizierung nach folgender Formel ermittelt:

$$(E^{\Delta Ct(\text{zu untersuchendes Gen})}) / E^{\Delta Ct(\text{Basket-Housekeeper})} \quad [\text{Pfaffl, 2004}].$$

Hierbei diente jeweils der dritte abgeleitete Zellklon von FH-hTERT-NS3, -NS5A und -Core als Referenz. Als interne Kontrolle wurden die Messwerte verschiedener konstitutiv exprimierter Referenzgene zu einem sogenannten „Basket-Housekeeper“ zusammengefasst. Hierbei handelte es sich um die folgenden Gene: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ribosomales Protein L13a (RPL13A),  $\beta$ -2-Mikroglobulin (B2M) und TATA-Bindungsprotein (TBP).

### **2.2.2.9 Relative Quantifizierung der Expression von CDKN1A (p21)**

Zur Überprüfung der DNA-Schadensantwort wurde in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen die relative Expression des für p21 codierenden Gens CDKN1A (Cyclin-dependant kinase inhibitor 1A) mittels qRT-PCR ermittelt. Als Primer wurden QuantiTect Primer Assays (Qiagen) für CDKN1A und die Basket-Housekeeper-Gene verwendet. Es wurde die cDNA von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2, FH-hTERT-Core-1 und -2 und FH-hTERT-pcDNA eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Probe von FH-hTERT-pcDNA eingesetzt, wobei die Zellen zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben behandelt wurden. Die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese erfolgten bei dieser Probe 8 h nach der Behandlung. Die unbehandelte Probe von FH-hTERT-pcDNA diente in der Berechnung der relativen Expression allen anderen Proben als Referenz. Die behandelte Probe von FH-hTERT-pcDNA diente als Positivkontrolle im Sinne eines erhöhten Spiegels an oxidativem Stress. Versuchsaufbau, Durchführung und Berechnung der Ergebnisse erfolgten analog zu der in Kapitel 2.2.2.8 beschriebenen Vorgehensweise.

### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden mit drei separaten Ansätzen in zweifacher Ausführung durchgeführt. Die gezeigten Werte sind Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft) und Anwendung des Student-t-Test für unpaarige Stichproben.

Ergebnisse wurden als signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit, repräsentiert durch den p-Wert, unter 0,05 lag.

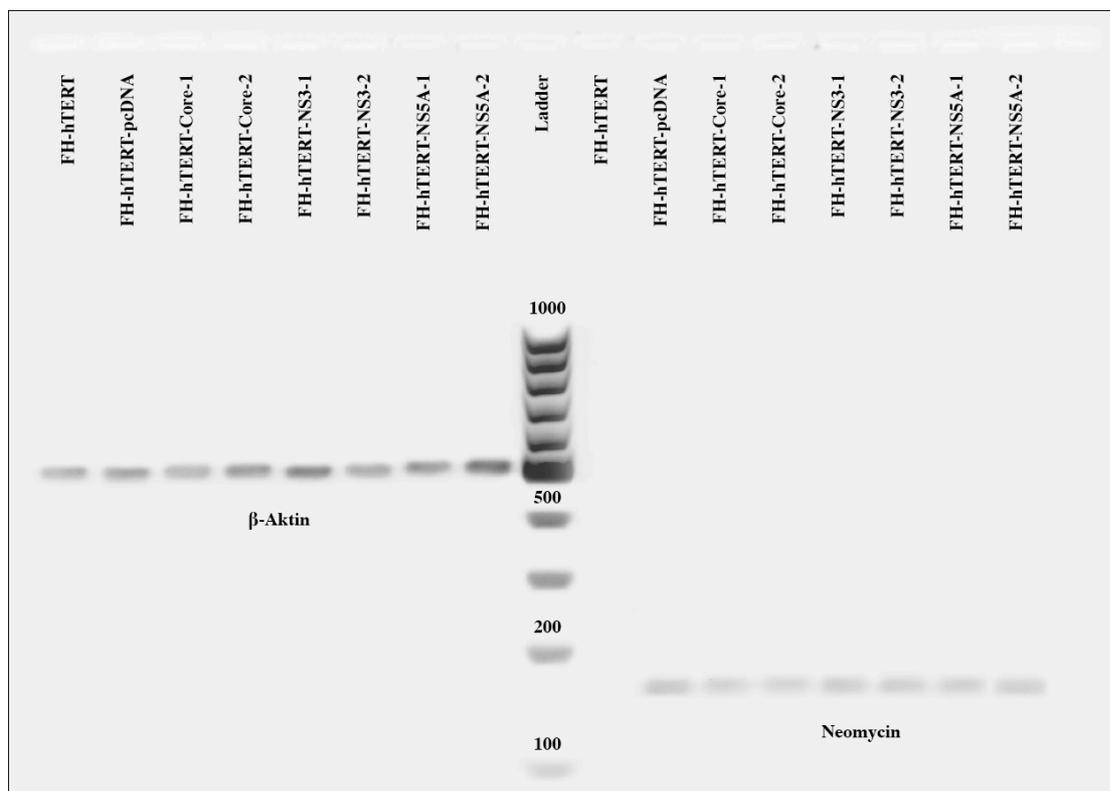
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Agarosegelelektrophorese

Wie in den Methoden beschrieben, wurde eine Platinum-PCR und anschließend eine Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der Expressionsplasmide in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen durchgeführt. Hierbei wurde mittels spezifischer Primer eine Sequenz aus dem Neomycin-Gen, welches auf allen verwendeten Expressionsplasmiden vorhanden ist, amplifiziert und die Reaktionsprodukte per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente die DNA einer nicht transfizierten FH-hTERT-Mischkultur.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich eine Sequenz aus dem  $\beta$ -Aktin-Gen amplifiziert.

**Abbildung 3:** Agarosegelelektrophorese der Platinum-PCR



Die Abbildung zeigt das Ergebnis der 2 %igen Agarosegelelektrophorese nach Platinum-PCR. Dargestellt sind die Banden der Amplifikate von  $\beta$ -Aktin (500-600 bp) und Neomycin (191 bp) der einzelnen Proben sowie die des DNA-Längenstandards GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Ladder).

Wie auch aus der Abbildung ersichtlich, konnten in den Proben der FH-hTERT-Einzelzellklone FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2 die dem Amplifikat des Neomycin-Gens entsprechende Bande in dem Agarosegel detektiert werden. Bei der Probe der Negativkontrolle, der FH-hTERT-Mischkultur, zeigte sich erwartungsgemäß keine entsprechende Bande. Die dem  $\beta$ -Aktin-Amplifikat entsprechende Bande war im Sinne einer internen Kontrolle für alle Proben nachweisbar.

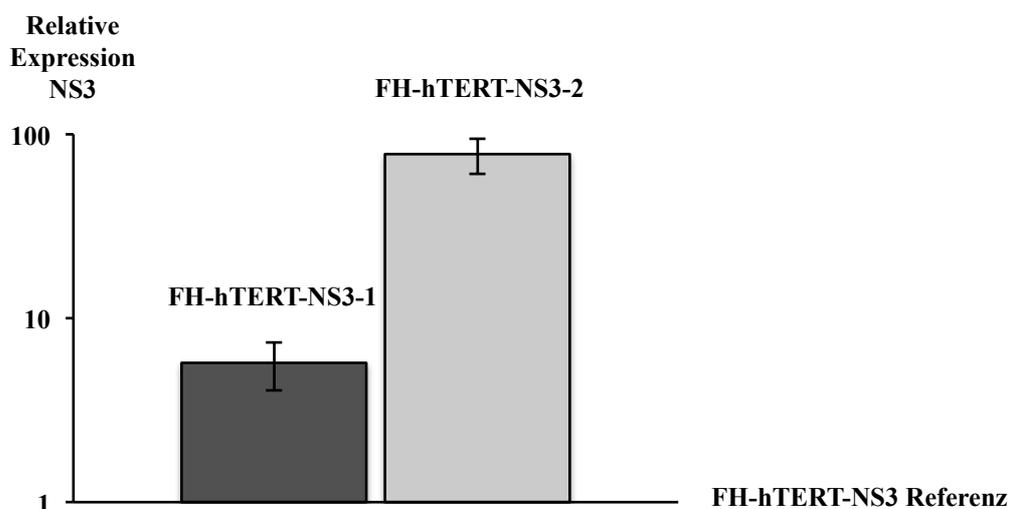
### 3.2 HCV-Transgen-Expression in FH-hTERT

Wie weiter oben beschrieben, wurde in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen die Expression der HCV-Transgene mittels qRT-PCR gemessen und mit dem Modell der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung die relative Expression der abgeleiteten Einzelzellklone ermittelt.

Im Folgenden ist die relative Expression von NS3, NS5A und Core in den jeweiligen Einzelzellklonen in Text und Abbildungen dargestellt.

#### NS3:

**Abbildung 4:** Relative Expression von NS3 in FH-hTERT-Zellklonen

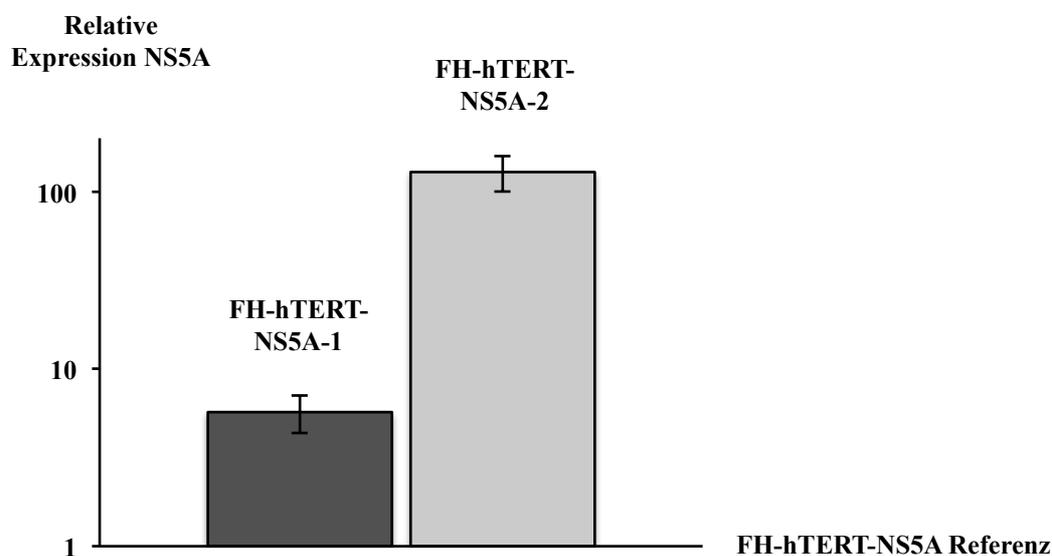


Die Abbildung zeigt die Werte der relativen Expression von NS3 in FH-hTERT-NS3-1 und -2  $\pm$  Standardabweichung bezogen auf den FH-hTERT-NS3-Referenzklon.

In den Zellklonen FH-hTERT-NS3-1 und -2 konnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte relative Expression des NS3-Transgens nachgewiesen werden. Für FH-hTERT-NS3-1 ergab sich ein Wert von  $5,70 \pm 1,66$ , für FH-hTERT-NS3-2 ein Wert von  $77,72 \pm 16,81$  bezogen auf den FH-hTERT-NS3-Referenzklon. Der Unterschied in der Expression der beiden Einzelzellklone war dabei signifikant ( $p < 0,05$ ).

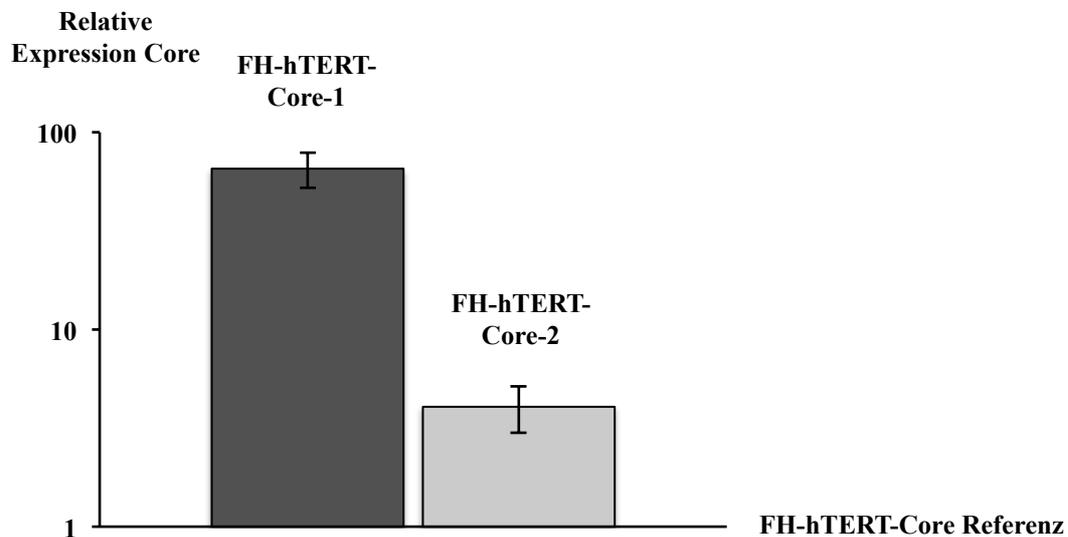
#### NS5A:

**Abbildung 5:** Relative Expression von NS5A in FH-hTERT-Zellklonen



Die Abbildung zeigt die Werte der relativen Expression von NS5A in FH-hTERT-NS5A-1 und -2  $\pm$  Stabdardabweichung bezogen auf den FH-hTERT-NS5A-Referenzklon.

In den Zellklonen FH-hTERT-NS5A-1 und -2 konnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte relative Expression des NS5A-Transgens nachgewiesen werden. Für FH-hTERT-NS5A-1 ergab sich ein Wert von  $10,43 \pm 1,35$ , für FH-hTERT-NS5A-2 ein Wert von  $129,16 \pm 29,06$  bezogen auf den FH-hTERT-NS5A-Referenzklon. Der Unterschied in der Expression der beiden Einzelzellklone war dabei signifikant ( $p < 0,05$ ).

**Core:****Abbildung 6:** Relative Expression von Core in FH-hTERT- Zellklonen

Die Abbildung zeigt die Werte der relativen Expression von Core in FH-hTERT-Core-1 und -2  $\pm$  Standardabweichung bezogen auf den FH-hTERT-Core-Referenzklon.

In den Zellklonen FH-hTERT-Core-1 und -2 konnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte relative Expression des Core-Transgens nachgewiesen werden. Für FH-hTERT-Core-1 ergab sich ein Wert von  $65,37 \pm 13,15$ , für FH-hTERT-core-2 ein Wert von  $4,06 \pm 1,07$  bezogen auf den FH-hTERT-Core Referenzklon. Der Unterschied in der Expression der beiden Einzelzellklone war dabei signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Proliferationsanalyse

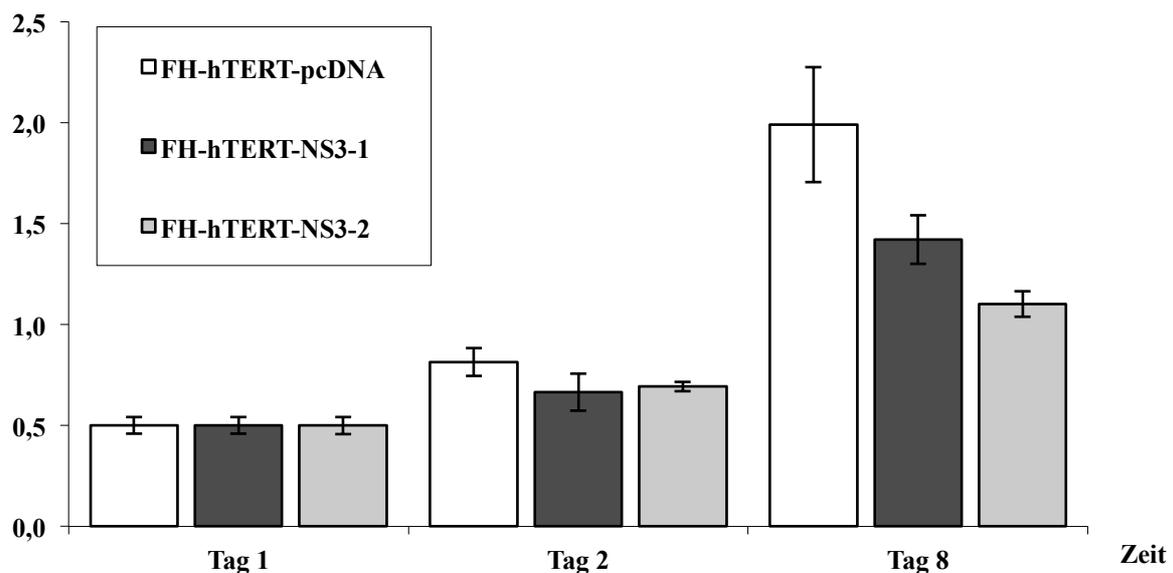
Zur Charakterisierung der transfizierten FH-hTERT-Klone wurde deren Proliferation gemessen. Hierzu wurde, wie in den Methoden beschrieben, mittels eines colorimetrischen Verfahrens die Umsetzung einer farblosen Verbindung in eine farbige Verbindung, deren Lichtabsorption bei 490 nm gemessen werden kann, im zeitlichen Verlauf bestimmt. Die Lichtabsorption ist dabei proportional zu der die Verbindung umsetzenden Zellzahl und kann somit als Maß für die Proliferation genutzt werden. Die folgenden Abbildungen und der

folgende Text zeigen die Ergebnisse der Proliferationsanalysen von FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2.

### NS3-Einzelzellklone:

**Abbildung 7:** Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS3-Zellklone

Relative Absorption  
bei 490 nm

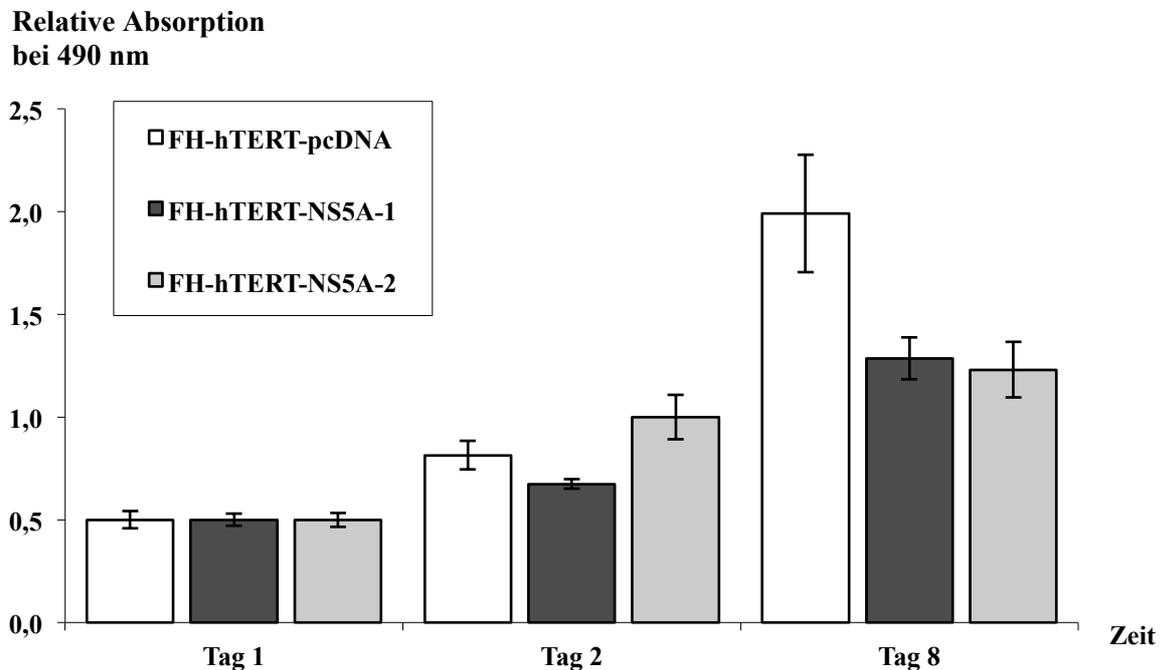


Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS3-1 und -2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

Bis zu Tag 8 zeigte sich bei allen dargestellten Zellklonen ein signifikanter Anstieg der relativen Lichtabsorption und damit Proliferation. An Tag 8 zeigten sich für FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS3-1 und -2 Werte von  $1,99 \pm 0,28$  bzw.  $1,42 \pm 0,12$  und  $1,10 \pm 0,06$  und damit ein signifikanter Unterschied zu Tag 1 mit Werten von  $0,5 \pm 0,04$  bzw.  $0,5 \pm 0,04$  und  $0,5 \pm 0,04$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). An Tag 8 erwies sich auch der Unterschied zwischen FH-hTERT-NS3-1 bzw. -2 und FH-hTERT-pcDNA als signifikant ( $p < 0,05$ ), ebenso auch der Unterschied zwischen den beiden NS3-Klonen ( $p < 0,05$ ).

## NS5A-Einzelzellklone:

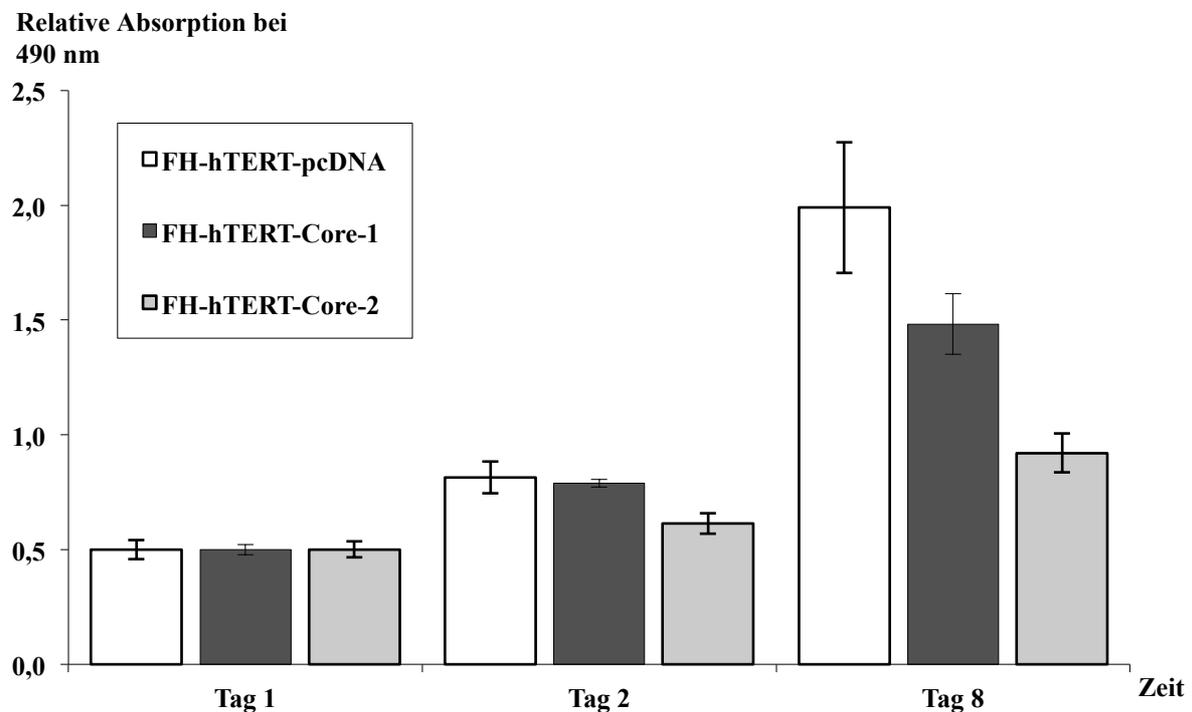
**Abbildung 8:** Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS5A-Zellklone



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS5A-1 und -2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

Bis zu Tag 8 zeigte sich bei allen dargestellten Zellklonen ein signifikanter Anstieg der relativen Lichtabsorption und damit Proliferation. An Tag 8 zeigten sich für FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS5A-1 und -2 Werte von  $1,99 \pm 0,28$  bzw.  $1,29 \pm 0,10$  und  $1,23 \pm 0,13$  und damit ein signifikanter Unterschied zu Tag 1 mit Werten von  $0,5 \pm 0,04$  bzw.  $0,5 \pm 0,03$  und  $0,5 \pm 0,03$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). An Tag 8 erwies sich auch der Unterscheid zwischen FH-hTERT-NS5A-1 bzw. -2 und FH-hTERT-pcDNA als signifikant ( $p < 0,05$ ).

Zwischen den Werten von FH-hTERT-NS5A-1 und -2 an Tag 8 bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,59$ ).

**Core-Einzelzellklone:****Abbildung 9:** Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-Core-Zellklone

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-Core-1 und -2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

Bis zu Tag 8 zeigte sich bei allen dargestellten Zellklonen ein signifikanter Anstieg der relativen Lichtabsorption und damit Proliferation. An Tag 8 zeigten sich für FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-Core-1 und -2 Werte von  $1,99 \pm 0,28$  bzw.  $1,48 \pm 0,13$  und  $0,92 \pm 0,08$  und damit ein signifikanter Unterschied zu Tag 1 mit Werten von  $0,5 \pm 0,04$  bzw.  $0,5 \pm 0,02$  und  $0,5 \pm 0,03$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). An Tag 8 erwies sich auch der Unterschied zwischen FH-hTERT-Core-1 bzw. -2 und FH-hTERT-pcDNA als signifikant ( $p < 0,05$ ), wie auch der Unterschied zwischen den beiden Core-Klonen. ( $p < 0,05$ ).

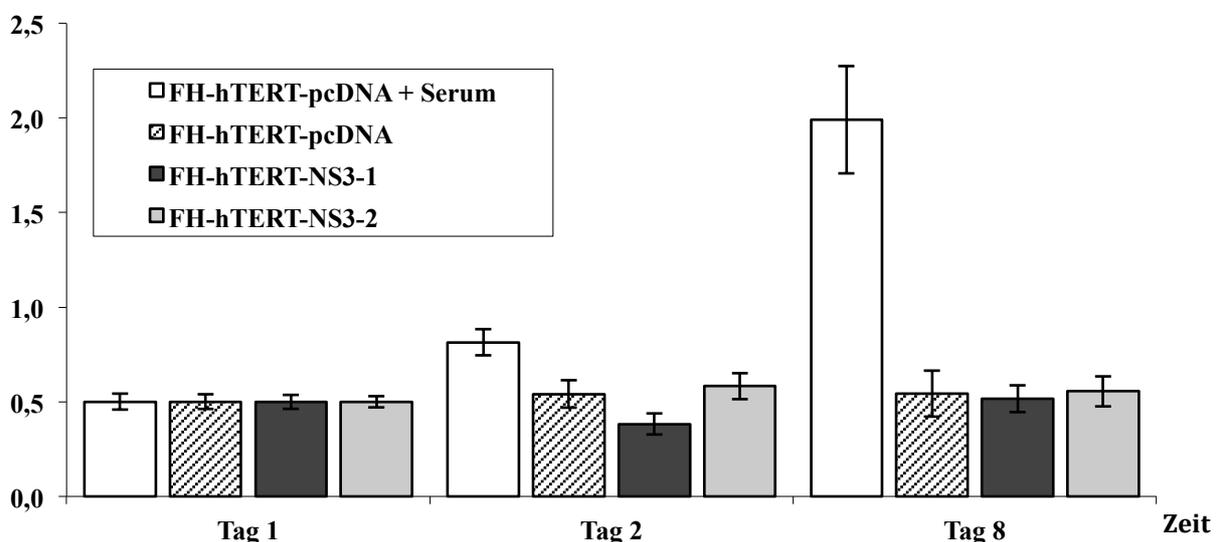
### 3.4 Proliferation in serumfreiem Zellkulturmedium

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt wachstumsfaktorunabhängige Proliferation ein Merkmal maligne entarteter Zellen dar. Um eine mögliche maligne Transformation der transfizierten FH-hTERT-Einzelzellklone nachzuweisen, wurde die wachstumsfaktorunabhängige Proliferation in den Einzelzellklonen in serum- und damit auch wachstumsfaktorfreiem Zellkulturmedium mittels Proliferationsanalyse (Cell Titer 96) bestimmt. Die folgenden Abbildungen und der folgende Text zeigen die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA, FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2 in serumfreiem Medium sowie die von FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Medium als Positivkontrolle.

#### NS3-Einzelzellklone:

**Abbildung 10:** Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS3-Zellklone

**Relative Absorption  
bei 490 nm**



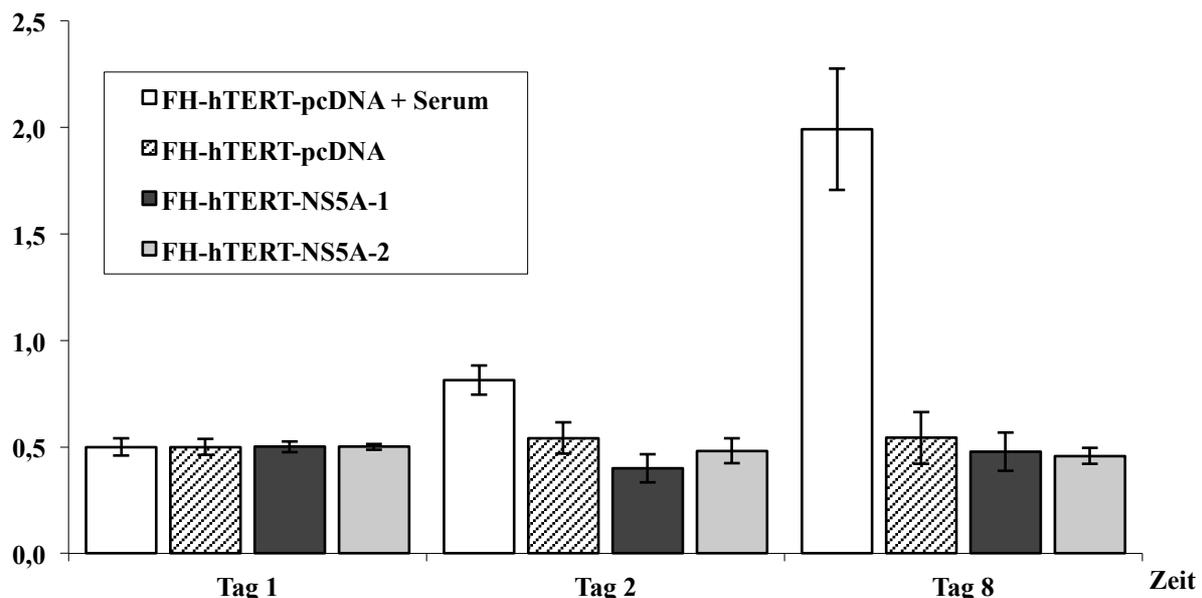
Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS3-1 und -2 in serumfreiem, sowie von FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

Bis zu Tag 8 konnte weder für FH-hTERT-pcDNA, noch für FH-hTERT-NS3-1 und -2 bei Werten von  $0,54 \pm 0,12$  bzw.  $0,52 \pm 0,07$  und  $0,56 \pm 0,08$  ein signifikanter Anstieg ( $p$  jeweils  $> 0,05$ ) der relativen Lichtabsorption im Vergleich zu Tag 1 (Werte in der Reihenfolge:  $0,5 \pm 0,04$ ;  $0,5 \pm 0,04$ ;  $0,5 \pm 0,02$ ) und damit keine Proliferation gemessen werden. Bei FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium hingegen zeigte sich zwischen Tag 1 und 8 ein signifikanter Anstieg der Messwerte (Tag 1:  $0,5 \pm 0,04$ ; Tag 8:  $1,99 \pm 0,28$ ;  $p < 0,05$ ) und damit Proliferation.

### NS5A-Einzelzellklone:

**Abbildung 11:** Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS5A-Zellklone

**Relative Absorption  
bei 490 nm**



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-NS5A-1 und -2 in serumfreiem, sowie von FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

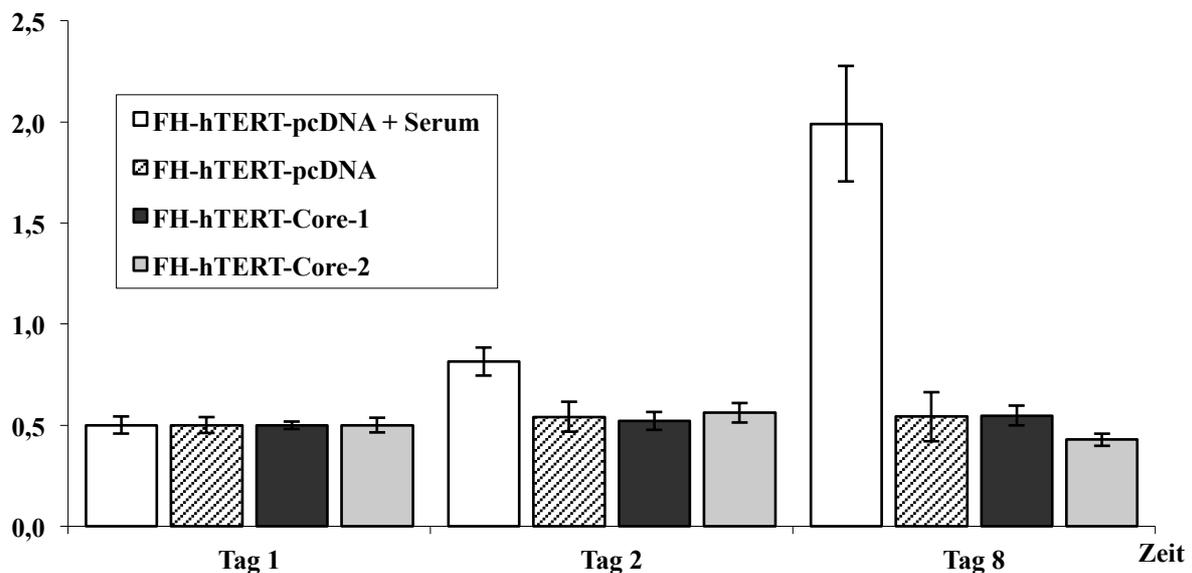
Bis zu Tag 8 konnte weder für FH-hTERT-pcDNA, noch für FH-hTERT-NS5A-1 und -2 bei Werten von  $0,54 \pm 0,12$  bzw.  $0,48 \pm 0,09$  und  $0,46 \pm 0,04$  ein signifikanter Anstieg ( $p$  jeweils  $> 0,05$ ) der relativen Lichtabsorption im Vergleich zu Tag 1 (Werte in der Reihenfolge:  $0,5 \pm 0,04$ ;  $0,5 \pm 0,02$ ;  $0,5 \pm 0,02$ ) und damit keine Proliferation gemessen werden. Bei FH-hTERT-

pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium hingegen zeigte sich zwischen Tag 1 und 8 ein signifikanter Anstieg der Messwerte (Tag 1:  $0,5 \pm 0,04$ ; Tag 8:  $1,99 \pm 0,28$ ;  $p < 0,01$ ) und damit Proliferation.

### Core-Einzelzellklone:

**Abbildung 12:** Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-Core-Zellklone

Relative Absorption  
bei 490 nm



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und FH-hTERT-Core-1 und -2 in serumfreiem, sowie von FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 490 nm als Maß für die Zellzahl an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat bei einer initialen Zellzahl von 2500 Zellen.

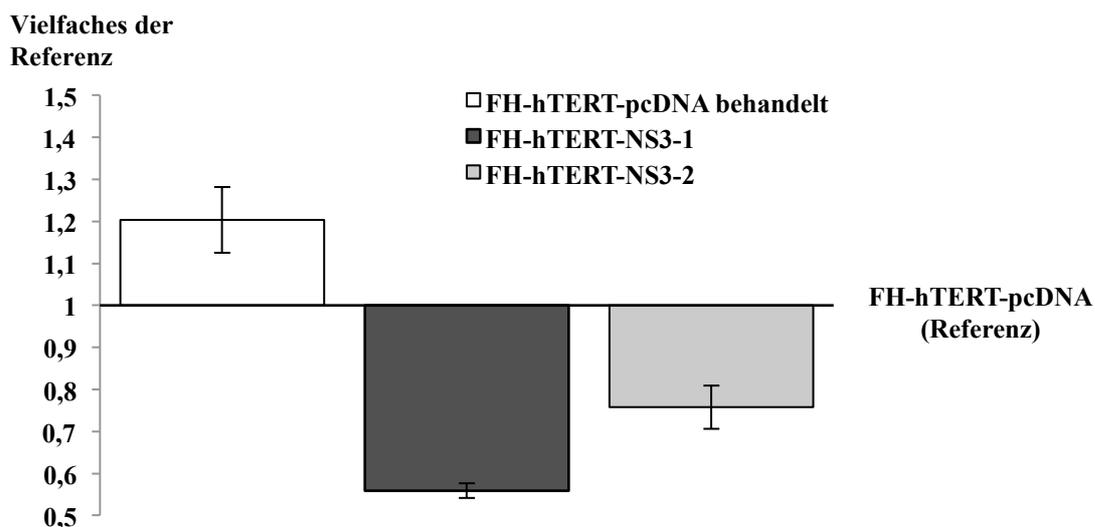
Bis zu Tag 8 konnte weder für FH-hTERT-pcDNA, noch für FH-hTERT-Core-1 und -2 bei Werten von  $0,54 \pm 0,12$  bzw.  $0,55 \pm 0,05$  und  $0,43 \pm 0,03$  ein signifikanter Anstieg ( $p$  jeweils  $> 0,05$ ) der relativen Lichtabsorption im Vergleich zu Tag 1 (Werte in der Reihenfolge:  $0,5 \pm 0,04$ ;  $0,5 \pm 0,02$ ;  $0,5 \pm 0,04$ ) und damit keine Proliferation gemessen werden. Bei FH-hTERT-pcDNA in serumhaltigem Kulturmedium hingegen zeigte sich zwischen Tag 1 und 8 ein signifikanter Anstieg der Messwerte (Tag 1:  $0,5 \pm 0,04$ ; Tag 8:  $1,99 \pm 0,28$ ;  $p < 0,01$ ) und damit Proliferation.

### 3.5 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress, repräsentiert vor allem durch die vermehrte Bildung von ROS und RNS, wird als ein möglicher fördernder Einflussfaktor für die maligne Transformation von Hepatozyten in der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurde in den transfizierten FH-hTERT-Einzelzellklonen das Ausmaß an oxidativem Stress mittels Behandlung der Zellen mit Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA und anschließender durchflusszytometrischer Messung der Fluoreszenz des durch den Einfluss von ROS und RNS zum grün fluoreszierenden Metaboliten Carboxy-DCF umgewandelten Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA bestimmt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen von FH-hTERT-NS3-1 und -2, FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2 in Text und Bild dargestellt. Die unbehandelte Probe von FH-hTERT-pcDNA diente in der relativen Darstellung der Ergebnisse dabei als Referenz. Eine zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelte Probe diente als Positivkontrolle für vermehrten oxidativen Stress.

#### NS3-Einzelzellklone

**Abbildung 13:** Oxidativer Stress der FH-hTERT-NS3-Zellklone



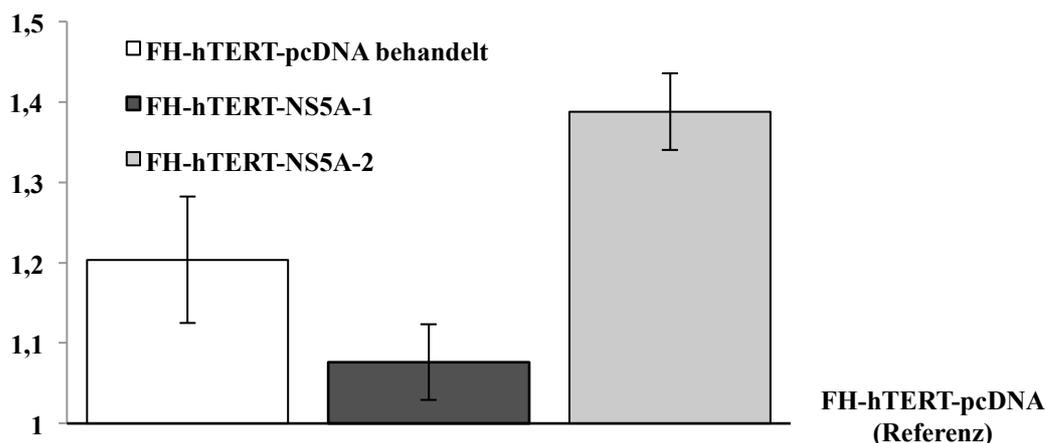
Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung nach Behandlung der Zellklone mit Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von FH-hTERT-NS3-1 und -2 sowie der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelten FH-hTERT-pcDNA (Positivkontrolle) in Relation zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA).

Für FH-hTERT-NS3-1 und -2 zeigten sich mit  $0,56 \pm 0,02$  bzw.  $0,76 \pm 0,05$  signifikant geringere relative Fluoreszenzwerte sowohl im Vergleich zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA) mit  $1 \pm 0,02$ , als auch zur Positivkontrolle (FH-hTERT-pcDNA behandelt) mit  $1,20 \pm 0,08$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). Auch der Unterschied zwischen FH-hTERT-NS3-1 und -2 und zwischen Referenz und Positivkontrolle war signifikant ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

### NS5A-Einzelzellklone:

**Abbildung 14:** Oxidativer Stress der FH-hTERT-NS5A-Zellklone

Vielfaches der Referenz



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung nach Behandlung der Zellklone mit Carboxy- $H_2DCFDA$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von FH-hTERT-NS5A-1 und -2 sowie der mit  $H_2O_2$  und BSO behandelten FH-hTERT-pcDNA (Positivkontrolle) in Relation zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA).

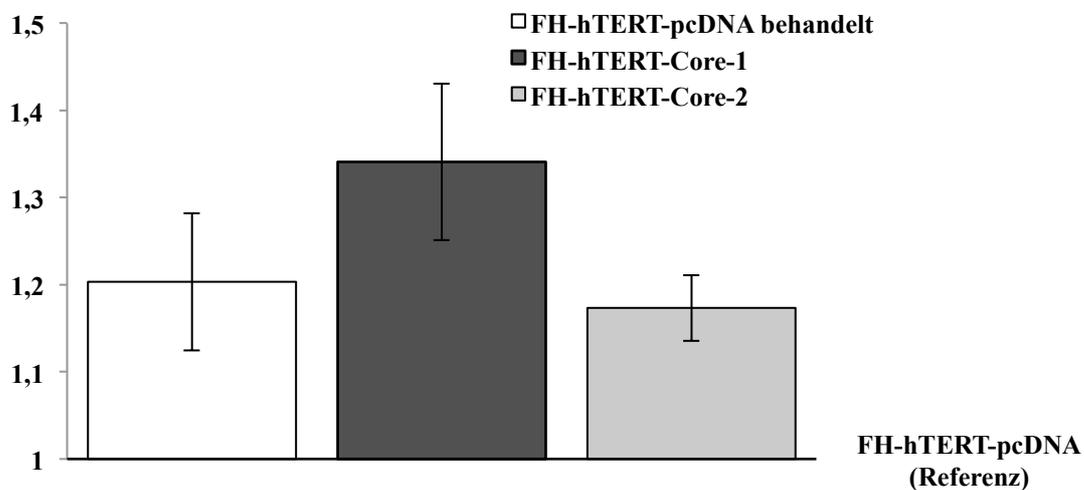
Für FH-hTERT-NS5A-1 zeigte sich mit  $1,07 \pm 0,05$  kein signifikanter Unterschied der relativen Fluoreszenzwerte im Vergleich zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA) mit  $1 \pm 0,02$ , jedoch ein signifikant geringerer Wert bezogen auf die Positivkontrolle (FH-hTERT-pcDNA behandelt) mit  $1,20 \pm 0,08$  ( $p < 0,01$ ). Für FH-hTERT-NS5A-2 zeigte sich mit  $1,38 \pm 0,05$  ein signifikant höherer relativer Fluoreszenzwert sowohl im Vergleich zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA) mit  $1 \pm 0,02$ , als auch im Vergleich zur Positivkontrolle (FH-hTERT-pcDNA

behandelt) mit  $1,20 \pm 0,08$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). Auch die Unterschiede zwischen FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und zwischen Referenz und Positivkontrolle waren signifikant ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

### Core-Einzelzellklone:

**Abbildung 15:** Oxidativer Stress der FH-hTERT-Core-Zellklone

Vielfaches der Referenz



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung nach Behandlung der Zellklone mit Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von FH-hTERT-Core-1 und -2 sowie der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelten FH-hTERT-pcDNA (Positivkontrolle) in Relation zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA).

Für FH-hTERT-Core-1 und -2 zeigten sich mit  $1,34 \pm 0,08$  bzw.  $1,17 \pm 0,04$  signifikant höhere relative Fluoreszenzwerte im Vergleich zur Referenz (FH-hTERT-pcDNA) mit  $1 \pm 0,02$ . Der Unterschied zur Positivkontrolle (FH-hTERT-pcDNA behandelt) war in beiden Fällen nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen Für FH-hTERT-Core-1 und -2 ( $p < 0,05$ ) und zwischen Referenz und Positivkontrolle ( $p < 0,05$ ) erwiesen sich als signifikant.

### 3.6 Relative Expression von CDKN1A (p21)

Zur Überprüfung der DNA-Schadensantwort wurde in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen mittels qRT-PCR die relative Expression von CDKN1A, welches das für p21 codierende Gen darstellt, bestimmt. Bei der relativen Quantifizierung der Expression diente FH-hTERT-pcDNA als Referenz. Zusätzlich wurde die Expression in zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelten FH-hTERT-pcDNA bestimmt. Diese Probe diente als Positivkontrolle eines vermehrten Einflusses von oxidativem Stress auf die Zellen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Expression von CDKN1A in Bild und Text dargestellt.

#### NS3-Einzelzellklone:

**Abbildung 16:** Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-NS3 Zellklonen



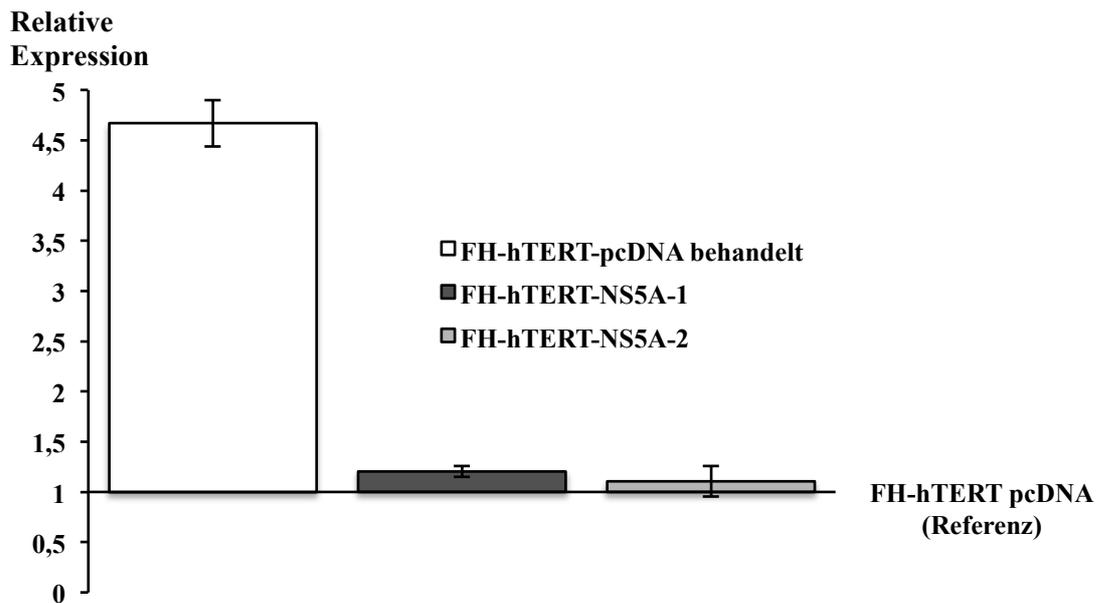
Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Expression von CDKN1A in FH-hTERT-NS3-1 und -2 mit FH-hTERT-pcDNA als Referenz und FH-hTERT-pcDNA 8 h nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Für FH-hTERT-NS3-1 und -2 zeigten sich signifikant ( $p < 0,05$ ) geringere Werte von  $0,21 \pm 0,02$  bzw.  $0,57 \pm 0,08$  der relativen Expression in Bezug auf die Referenz FH-hTERT-pcDNA mit einem Wert von 1 und auch signifikant geringere Werte verglichen mit den

Werten der behandelten Probe von FH-hTERT-pcDNA ( $4,67 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ). Auch der Unterschied zwischen FH-hTERT-NS3-1 und -2 erwies sich als signifikant ( $p < 0,05$ ).

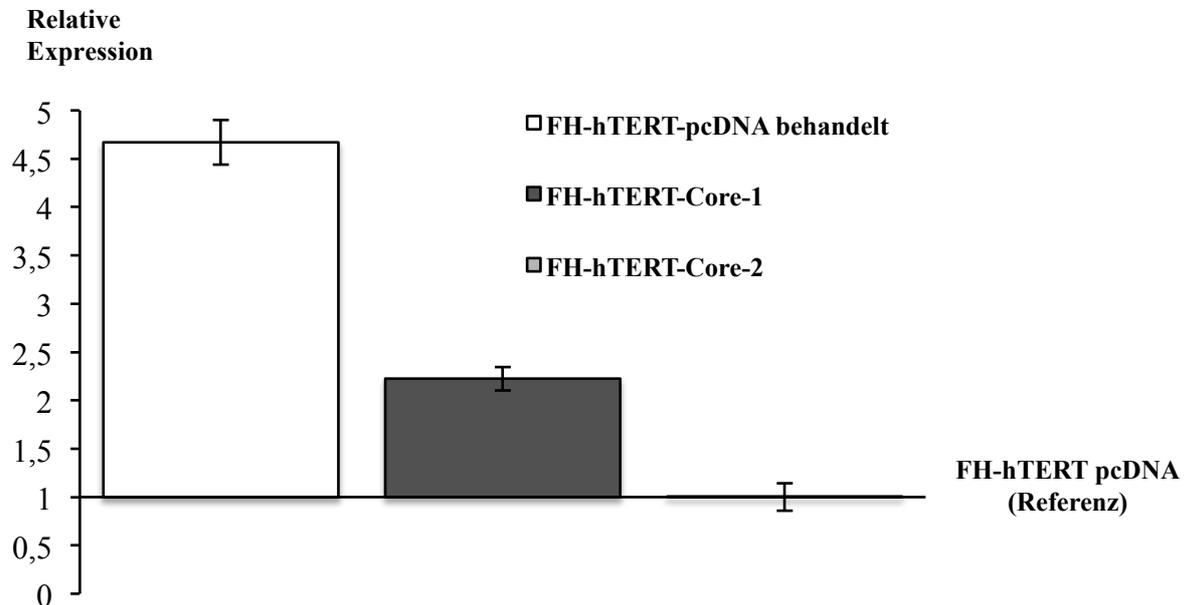
### NS5A- Einzelzellklone:

**Abbildung 17:** Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-NS5A-Zellklonen



Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Expression von CDKN1A in FH-hTERT-NS5A-1 und -2 mit FH-hTERT-pcDNA als Referenz und FH-hTERT-pcDNA 8 h nach Behandlung mit  $H_2O_2$  und BSO als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Für FH-hTERT-NS5A-1 zeigte sich ein geringer signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) mit einem Wert von  $1,20 \pm 0,06$  gegenüber der Referenz FH-hTERT-pcDNA mit einem Wert von 1. Zwischen den Werten von FH-hTERT-NS5A-2 ( $1,11 \pm 0,15$ ) und der Referenz bestand kein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen den Werten der behandelten FH-hTERT-pcDNA ( $4,67 \pm 0,23$ ) und FH-hTERT-NS5A-1 und -2 war in beiden Fällen signifikant ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied der zwischen FH-hTERT-NS5A-1 und -2 erwies sich als nicht signifikant.

**Core-Einzelzellklone:****Abbildung 18:** Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-Core-Zellklonen

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Expression von CDKN1A in FH-hTERT-Core-1 und -2 mit FH-hTERT-pcDNA als Referenz und FH-hTERT-pcDNA 8 h nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO als Positivkontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Für FH-hTERT-Core-1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) mit einem Wert von  $2,22 \pm 0,12$  gegenüber der Referenz FH-hTERT-pcDNA mit einem Wert von 1.

Zwischen den Werten von FH-hTERT-Core-2 ( $1,00 \pm 0,14$ ) und der Referenz bestand kein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen den Werten der behandelten FH-hTERT-pcDNA ( $4,67 \pm 0,23$ ) und FH-hTERT-Core-1 und -2 war in beiden Fällen signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch der Unterschied zwischen den Werten von FH-hTERT-Core-1 und -2 erwies sich als signifikant ( $p < 0,05$ ).

**3.7 Verankerungsunabhängiges Wachstum**

Wie in der Einleitung dargelegt, wird verankerungsunabhängiges Wachstum als ein Merkmal maligne transformierter Zellen angesehen. Um eine mögliche maligne Transformation durch

Einfluss der HCV-Proteine in den transfizierten FH-hTERT-Zellklonen nachzuweisen, wurden die Klone auf verankerungsunabhängiges Wachstum mittels Softagarassay überprüft. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Huh-7 verwendet, welche die Fähigkeit zu verankerungsunabhängigem Wachstum besitzt und somit im Softagarassay Kolonien bildet. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Softagarassays in Tabelle und Text dargestellt.

**Tabelle 3:** Ergebnisse des Softagarassays

<b>Zelllinie</b>	<b>n Kolonien nach 3 Wochen</b>	<b>n Kolonien nach 6 Wochen</b>
<b>FH-hTERT-pcDNA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-NS3-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-NS3-2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-NS5A-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-NS5A-2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-Core-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>FH-hTERT-Core-2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Huh-7</b>	<b>314 ± 28</b>	<b>572 ± 48</b>

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse des Softagarassays der unterschiedlichen Zelllinien bei einer initialen Zellzahl von 5000 Zellen je 60 mm-Zellkulturschale nach 3 und 6 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Wie auch aus der Tabelle ersichtlich, zeigte sich bei keinem der transfizierten FH-hTERT-Zellklone eine Koloniebildung im Softagarassay. Die Positivkontrolle Huh-7 zeigte nach 3 Wochen  $314 \pm 28$  Kolonien und nach 6 Wochen  $572 \pm 48$  Kolonien. Die transfizierten Zellklone von FH-hTERT zeigen somit im Gegensatz zu Huh-7 kein verankerungsunabhängiges Wachstum.

## 4. Diskussion

### 4.1 FH-TERT-Zellkultur als Modellsystem der Hepatokarzinogenese

Funktionelle Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen des mehrstufigen Prozesses der Hepatokarzinogenese waren lange Zeit durch das Fehlen geeigneter Modellsysteme limitiert. So weisen primäre Hepatozyten in Zellkultur eine begrenzte Anzahl an möglichen Populationsverdopplungen auf, was insbesondere Langzeituntersuchungen zu den Wirkungen potenzieller transformierender Einflussfaktoren beschränkt. In den häufig verwendeten Hepatomazelllinien wie HepG2 oder Huh-7 konnten unterschiedliche genetische Veränderungen und Alterationen in Genexpressionsmustern und Signalkaskaden festgestellt werden. Diese Zellen sind jedoch bereits maligne transformiert. Anhand von Untersuchungen an derartigen Zellen ist es nicht möglich eine sichere Aussage darüber zu treffen, welche Einflussfaktoren und Veränderungen den Übergang von einem normalen zu einem maligne transformierten Phänotyp verursachen bzw. beeinflussen.

Die FH-hTERT-Zelllinie stellt in diesem Rahmen eine Lösung für die genannten Limitationen anderer Zellkultursysteme dar. Durch die ektope Expression der katalytischen Untereinheit hTERT des Telomerase-Holoenzym wird die Telomerase in diesen Zellen aktiviert. Durch die konsekutive Stabilisierung der Telomere werden die Zellen immortalisiert und sind bis zu einer hohen Zahl an Populationsverdopplungen passagierbar [Wege et al., 2003].

Telomeraseaktivität ist ebenso in einem Großteil der Fälle des HCC (bis zu 90 %) [Llovet et al., 2006; Schulze et al., 2015] und auch in vielen anderen menschlichen Tumorentitäten zu beobachten [Shay et Bacchetti, 1997]. Es konnte jedoch für viele unterschiedliche somatische Zellen gezeigt werden, dass die Aktivierung der Telomerase allein nicht zu einer malignen Transformation führt [Jiang et al., 1999]. Auch in FH-hTERT ist bis auf die Immortalisierung keine wesentliche Änderung des Phänotyps zu beobachten [Wege et al., 2003]. Telomerase-immortalisierte Zellen zeigen jedoch eine erniedrigte Schwelle zur Ausbildung eines maligne transformierten Phänotyps. Hierbei wird die Telomeraseaktivität als notwendige, jedoch nicht

hinreichende Bedingung angesehen. So führt z.B. eine konstitutive Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in FH-hTERT bereits nach wenigen Passagen zu einer malignen Transformation der Zellen, die durch Tumorbildung im Nacktmausmodell bestätigt werden konnte [Wege et al., 2011]. Auch bei der Untersuchung anderer humaner Tumorentitäten findet das Modell Telomerase-immortalisierter Zellen Anwendung. So konnte beispielsweise in Telomerase-immortalisierten ovariellen Epithelzellen durch den Einfluss eines aktivierten C-erbB2, Ha-ras oder des Wachstumsfaktors Acrogranin eine maligne Transformation in den Zellen ausgelöst werden [Kusakari et al., 2003; Miyanishi et al., 2007].

Das Modell Telomerase-immortalisierter humaner Zellen im Allgemeinen und das FH-hTERT-Zellkulturmodell im Speziellen eignen sich somit sehr gut als Modellsystem zur Aufdeckung und Untersuchung transformationsfördernder Einflussfaktoren wie z.B. viraler Insertionsmutagenese, oxidativen Stresses oder der Beeinflussung von Signalkaskaden wie dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

## **4.2 Erzeugung stabil transfizierter FH-hTERT-Zellklone**

Um NS3, NS5A und Core hinsichtlich des transformationsfördernden Einflusses auf FH-TERT zu untersuchen, musste eine kontinuierliche Expression der Transgene in den Zellen erreicht werden. Hierzu mussten die Transgene zunächst in die Zellen eingebracht werden.

Um ein Transgen in eine Zelle einzubringen, sind prinzipiell verschiedene Verfahren geeignet. Es existieren verschiedene virale Vektoren wie Adeno-, Retro- oder Vacciniaviren, mit deren Hilfe Zellen transduziert werden können und reine Nukleinsäurevektoren wie z.B. Plasmidvektoren [Colosimo et al., 2000], welche eine Transfektion von Zellen erlauben.

Aufgrund der einfachen Durchführung, der Verfügbarkeit und sicherheitstechnischer Aspekte wurde sich in dieser Arbeit für die Transfektion mittels Plasmidvektoren entschieden.

Plasmidvektoren können durch verschiedene Anwendungen in Zellen eingeschleust werden, z.B. durch Endozytose von Präzipitaten aus Vektor-DNA und Calcium-Phosphat oder von mit

Vektor-DNA beladener Liposomen. Eine andere Möglichkeit ist die passive Einschleusung der DNA per Diffusion nach Elektroporation im Sinne einer Beibringung elektrischer Impulse [Colosimo et al., 2000]. Aufgrund der Verfügbarkeit wurde sich für das Verfahren der Elektroporation entschieden. Durch eine vierwöchige Selektion nach der Transfektion mittels dem Zellkulturmedium beigefügten Geneticins konnten stabil transfizierte Zelllinien durch das auf dem Plasmidvektor enthaltene Neomycin-Resistenzgen erzeugt werden. Nach Isolation von Einzelzellklonen mittels Cloning-Zylindern konnte der Status der stabilen Transfektion der FH-hTERT-Zellklone durch Platinum-PCR und anschließende Agarosegelelektrophorese bestätigt werden.

### **4.3 Expression von HCV-Transgenen in stabil transfizierten Hepatozyten**

Um den Spiegel der Expression von NS3, NS5A und Core in den FH-hTERT-Zellklonen zu bestimmen, wurde eine effizienzkorrigierte relative Quantifizierung der mRNA-Transskripte von NS3, NS5A und Core mittels qRT-PCR durchgeführt. Das Verfahren beinhaltet zum einen eine Normalisierung der Messergebnisse des Zielgens durch Bezug auf die Messergebnisse sogenannter konstitutiv exprimierter Housekeeping-Gene. Zum anderen wird bei dieser Methode eine Effizienzkorrektur jeder einzelnen qRT-PCR-Reaktion vorgenommen. Diese beiden Maßnahmen ermöglichen eine deutliche Reduzierung der Varianz der Messergebnisse durch Verringerung des Effektes von Störfaktoren wie einer unterschiedlichen Effizienz der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese oder individueller Probeneffekte der qRT-PCR-Reaktion [Pfaffl, 2004]. Durch Anwendung dieser Methode konnten in der Durchführung gut reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden. Aufgrund des methodischen Ansatzes in dieser Arbeit ist die Aussagekraft dieses Verfahrens jedoch limitiert. Es erlaubt zwar, wie auch in diesem Fall, eine gute Darstellung relativer Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen, ein Bezug zu einer real existierenden Situation in infiziertem Gewebe in vivo ist jedoch nicht möglich. Hierzu wäre ein Vergleich mit den

Ergebnissen von Proben infizierten Gewebes notwendig. Es bleibt somit unklar, inwiefern das Ausmaß der Expression von NS3, NS5A und Core in FH-hTERT mit der in den Zellen eines infizierten Patienten vergleichbar ist.

Bei der relativen Quantifizierung der Transgen-Transskripte zeigte sich ein jeweils über 10-facher Unterschied in der Transgen-Expression der jeweiligen beiden Klone in Bezug auf den jeweiligen Referenzklon. Dieser Unterschied sollte im Folgenden eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung in der Ausprägung weiterer gemessener Parameter erkennen lassen.

#### **4.4 Induktion von oxidativem Stress durch HCV-Proteine**

Oxidativer Stress wird als ein wichtiger Faktor der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese angesehen. Dabei werden sowohl unterschiedliche Mechanismen der Entstehung, als auch der transformationsfördernden Wirkung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies diskutiert.

Grundsätzlich können derartige Verbindungen in den infizierten Hepatozyten selbst oder aber in monozytären Zellen wie lebergewebsspezifischen Kupffer-Sternzellen und Blutmonozyten entstehen. So induzieren NS3, NS5A und Core in Kupffer-Sternzellen und NS3 zusätzlich auch in Blutmonozyten durch Stimulation der NADPH-Oxidase 2 (Nox2) die Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) [Hosomura et al., 2011; Bureau et al., 2001]. In den Hepatozyten selbst entsteht durch den Einfluss von NS5A und Core in den Reaktionen der Atmungskette in den Mitochondrien ebenfalls vermehrt  $O_2^-$  [Gong et al., 2001; Korenaga et al., 2005].

Außerdem lässt sich unter Einfluss von NS5A und Core eine erhöhte Aktivität sowohl der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS), als auch der NADPH Oxidasen 1 und 4 in Hepatozyten nachweisen, was zu einer vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und auch  $O_2^-$  führt [Machida et al., 2004; de Mochel et al., 2010]. Superoxidanionen reagieren zusammen mit Wasser zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), aus welchem unter dem Einfluss von dreiwertigen Eisenionen Hydroxylradikale ( $\bullet OH$ ) freigesetzt werden können.

Stickstoffmonoxid kann zu Peroxynitritonen ( $ONOO^-$ ) umgesetzt werden. Diese beiden

Verbindungen können an der DNA direkte Schäden wie z.B. DNA-Doppelstrangbrüche hervorrufen und haben dadurch eine transformationsfördernde Wirkung [Valko et al., 2004; Burney et al., 1999].

Die Annahme, dass oxidativer Stress im mehrstufigen Prozess der Hepatokarzinogenese eine Rolle spielt, wird durch eine vermehrte Inzidenz von durch oxidativem Stress verursachten DNA-Schäden in Proben von HCC-Patienten unterstützt [Schwarz et al., 2001]. Darüber hinaus wird ein Einfluss reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies auf unterschiedliche Signalkaskaden diskutiert, die z.B. zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen und/oder die Proliferation und Apoptose- und Zellzyklusregulation beeinflussen und damit zum Transformationsprozess beitragen [Choi et al., 2014]. Einen Überblick über diese Vorgänge gibt Abbildung 19.

**Abbildung 19:** Oxidativer Stress in der HCV-assozierten Hepatokarzinogenese.

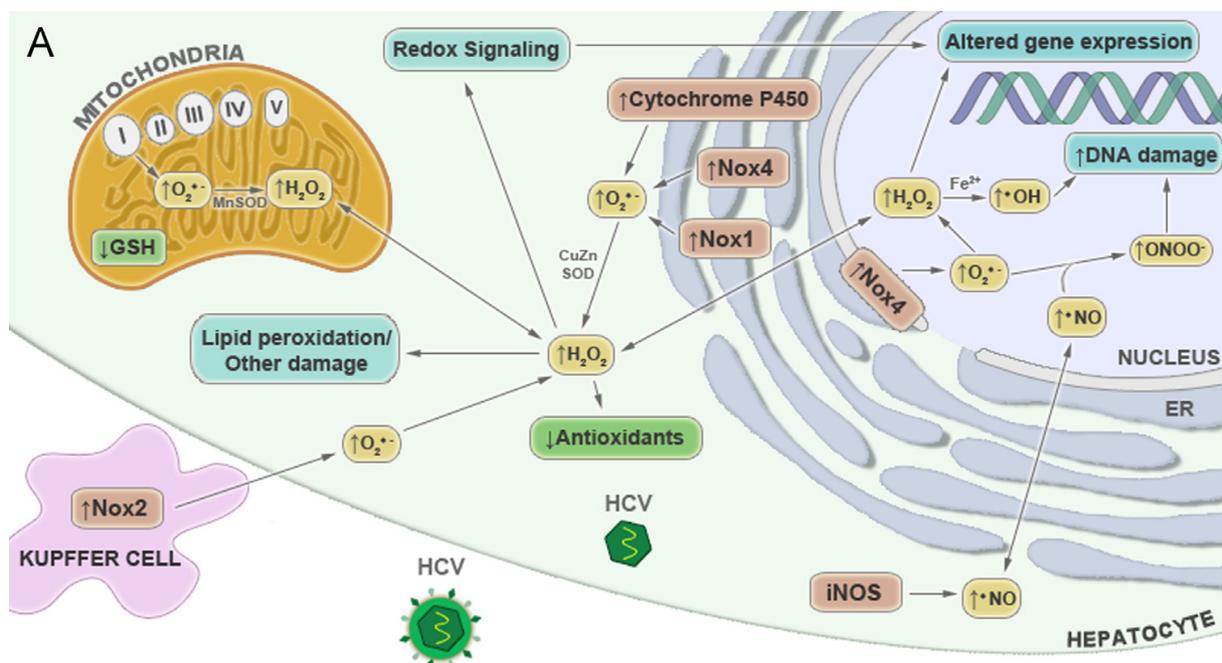


Abbildung 19 zeigt schematisch die unterschiedlichen Quellen der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, sowie deren Wirkung auf DNA und Genexpression. Alle relevanten Abkürzungen sind im Lauftext enthalten. Abbildung aus: Choi J, Corder NL, Koduru B, Wang Y (2014). Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med* 2014 72 : 271.

In dieser Arbeit wurde das Ausmaß an oxidativem Stress in den NS3, NS5A und Core exprimierenden FH-hTERT-Zellklonen als ein möglicher, die maligne Transformation

fördernder Faktor bestimmt. Hierzu wurde eine Behandlung der Zellen mit Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA durchgeführt.

In der Durchführung wurde eine mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelte Probe von FH-hTERT-pcDNA als Positivkontrolle für vermehrten oxidativen Stress in die Versuchsreihe mit einbezogen. Aus unveröffentlichten Daten innerhalb der Arbeitsgruppe ging hervor, dass die eingesetzten Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von 500 µmol/l und BSO von 5 µmol/l die höchste von den Zellen tolerierte Dosis der beiden Reagenzien darstellten, sodass das Ausmaß an oxidativem Stress in dieser Positivkontrolle als sehr hoch eingeschätzt werden kann.

In den Ergebnissen zeigten sich für den NS5A stärker exprimierenden FH-hTERT-Zellklon (FH-hTERT-NS5A-2) und für FH-hTERT-Core-1 und -2 signifikant erhöhte relative Fluoreszenzwerte im Vergleich zur Referenz. Im Falle von FH-hTERT-NS5A-2 war der Wert sogar signifikant höher als der Wert der Positivkontrolle. Für alle drei erwähnten Klone kann somit von einem hohen Maß an oxidativem Stress ausgegangen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bildung von oxidativem Stress zumindest bezüglich Core vom Ausmaß der Expression in den Zellen abhängt, da im Falle von Core ein signifikant höherer Spiegel an oxidativem Stress im stärker exprimierenden Klon gezeigt werden konnte.

In diesem Zusammenhang konnte z.B. von *Korenaga et al.* gezeigt werden, dass Core bei gleicher Nachweismethode wie in dieser Arbeit, erst ab einer Konzentration von 10 ng/mg Protein eine vermehrte ROS-Bildung bewirkt [Korenaga et al. 2005]. Auch eine Dosis/Wirkungs-Beziehung zwischen ROS-Bildung und Konzentration an Core konnte hier gezeigt werden. FH-hTERT-NS5A-1 zeigte keinen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zur Negativkontrolle. Ein möglicher Erklärungsansatz für die fehlende Induktion von oxidativem Stress in diesem Klon könnte die im Vergleich zum anderen NS5A-Klon über 10-fach geringere Expression des Transgens sein. Zwar können andere Studien die Bildung von oxidativem Stress durch NS5A ebenfalls zeigen. So kommt es etwa bei *Ivanov et al.* bei ebenfalls mit Plasmidvektoren transfizierten Huh-7 Zellen und gleicher ROS

Nachweismethode und auch bei *Gong et al.* (Huh-7, Plasmidvektoren, ROS-Nachweis mit Dihydroethidium) zu vermehrtem oxidativen Stress durch NS5A [Gong et al., 2001; Ivanov et al., 2009]. Daten zu einem Schwellenwert oder Dosis/Wirkungs-Beziehung wie bei *Korenaga et al.* bezüglich Core existieren für NS5A jedoch nicht. Reihenuntersuchungen zu Proteinkonzentrationen in unterschiedlich stark exprimierenden Klonen und folgende ROS Messungen könnten hier Aufschluss über einen solchen Effekt geben.

Im Fall von FH-hTERT-NS3-1 und -2 zeigte sich ein signifikant niedrigeres Ausmaß an oxidativem Stress verglichen mit der Referenz. Dies steht zumindest dahingehend in Einklang mit vorherigen Studien, als dass für NS3, wie weiter oben ausgeführt, kein Effekt für vermehrte Bildung von ROS und RNS direkt in den Hepatozyten beschrieben ist, sondern nur in Kupffer-Sternzellen und Blutmonozyten. So konnte von *Bureau et al.* eine Aktivierung der NADPH Oxidase menschlicher monozytärer Zellen und von *Hosomura et al.* eine Aktivierung von isolierten menschlichen Kupffer-Zellen mit konsekutiv erhöhter ROS-Produktion gezeigt werden [Bureau et al., 2001; Hosomura et al., 2011]. Eine vermehrte Bildung von ROS durch die isolierte Wirkung von NS3 ist in von Hepatozyten abgeleiteten Zellen in der Literatur bisher nicht beschrieben. Jedoch ist für alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine ein hemmender Effekt auf die zellulären Mechanismen zum Abbau von ROS und RNS beschrieben [Choi, 2012]. Eine Erniedrigung des Spiegels an oxidativem Stress durch NS3 wäre somit nicht zu erwarten. Untersuchungen zur Expression von ROS RNS abbauenden Genprodukten unter Einfluss von NS3 könnten hier weiteren Aufschluss über einen möglichen induzierenden Effekt auf derartige Gene von NS3 bieten, was eine Erniedrigung des Levels an oxidativem Stress erklären könnte.

#### **4.5 DNA-Schadensantwort (Expression von p21)**

P21 ist ein Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen und vermittelt über Inhibierung des Cyclin/cdk2-Komplexes das Voranschreiten des Zellzyklus. Die Expression von p21 steht

unter transkriptioneller Kontrolle von p53, wobei die Schädigung der nukleären DNA, z.B. durch Strahlung, einen Hauptinduktor der p53-vermittelten p21-Expression darstellt [el-Deiry et al., 1993; Brugarolas et al., 1999]. Außerdem konnte in zellkulturellen Experimenten gezeigt werden, dass ebenso die Einwirkung von oxidativem Stress, im Speziellen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zur p53-abhängigen Induktion von p21 und konsekutiv dosisabhängig zu Wachstumsarrest bzw. Apoptose der Zellen führt [Chen et al., 2000].

Vor diesem Hintergrund erweist sich in den Ergebnissen der relativen Expression von CDKN1A, dem für p21 codierenden Gen, die Erhöhung der Expression um den Faktor  $4,67 \pm 0,23$  der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO behandelten FH-hTERT-pcDNA im Vergleich zum Referenzwert (FH-hTERT-pcDNA) als plausibel.

Im Falle der HCV-Transgen-exprimierenden FH-hTERT zeigte sich hingegen bei allen Klonen eine signifikant geringere Expression von CDKN1A im Gegensatz zu dieser Positivkontrolle, die im Falle von FH-hTERT-NS3-1 und -2 sogar signifikant geringer ausfällt als die der unbehandelten Referenzprobe. Für FH-hTERT-NS5A -1 und -2 zeigten sich in etwa mit der unbehandelten Referenzprobe vergleichbare Werte. Im Falle von FH-hTERT-Core-1 ist die Expression auf das Doppelte erhöht, bei FH-hTERT-Core-2 nicht erhöht. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen anderer Studien in Einklang zu bringen. Sowohl für NS3 [Kwun et al, 2001], als auch für NS5A [Majumder et al, 2001; Lan et al, 2002] und Core [Kwun et Jang, 2003; Yamanaka et al, 2002] ist ein hemmender Effekt auf die Expression von p21 beschrieben. So konnten *Kwun et al.* in stabil transfizierten NIH3T3-Zellen zeigen, dass eine verminderte Expression von p21 durch die Einwirkung von NS3 aufgrund ausbleibender aktivierender Effekte von p53 auf die Promotorregion von p21 bedingt ist. Weiterhin konnten *Majumder et al.* in HepG2 und NIH3T3 und *Lan et al.* in Hep3G-Zellen zeigen, dass die direkte Interaktion von NS5A und p53 eine deutlich supprimierte Induktion der Expression von p21 zur Folge hat [Majumder et al, 2001; Lan et al, 2002]. Dies könnte durch das Verbleiben und die Degradation des NS5A-p53-Komplexes in der perinukleären Membran

und die damit ausbleibende induzierende Wirkung von p53 bedingt sein [Majumder et al, 2001]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine durch stabile Expression von p53 induzierte vermehrte Apoptose der betreffenden Zellen durch die gleichzeitige stabile Expression von NS5A deutlich supprimiert wird. Im Falle von Core konnten *Kwun et al.* zeigen, dass sowohl die Expression von p53, als auch von p21 in Core exprimierenden primären murinen Hepatozyten und NIH3T3-Zellen erniedrigt ist. Dieser Effekt scheint dabei Zelltyp-spezifisch zu sein, da in HepG2- und Hep3B-Zellen ein gegenteiliger Effekt von Core gezeigt werden konnte. Die relativ geringere Expression von p21 der Core exprimierenden FH-hTERT im Gegensatz zu der behandelten Positivkontrolle erscheint vor dem Hintergrund, dass FH-hTERT aufgrund des nicht maligne transformierten Phänotyps am ehesten mit den primären Hepatozyten als Zelllinie vergleichbar ist, plausibel. Die auch in dieser Arbeit gezeigte supprimierte Induktion von p21 durch NS3, NS5A und Core stellt bei gleichzeitig erhöhtem Spiegel an oxidativem Stress (NS5A- und Core-Klone) eine Situation dar, in der die Zellen möglicherweise mutagene Schädigungen der DNA akkumulieren, ohne dass es folglich zu Wachstumsarrest oder Apoptoseinduktion kommt. So könnte es kumulativ zu einem Ausmaß an Schädigungen kommen, welches zur malignen Transformation der Zellen hinreichend ist.

#### **4.6 Maligne Transformation durch den Einfluss von HCV-Proteinen**

Um eine mögliche maligne Transformation durch den Einfluss der HCV-Proteine in FH-hTERT nachzuweisen, wurden die transfizierten FH-hTERT-Zellklone auf zwei Merkmale maligne transformierter Zellen untersucht. Zum einen wurden die Proliferationseigenschaften und die Abhängigkeit der Proliferation von äußeren Wachstumsfaktoren untersucht.

Veränderte Proliferation und wachstumsfaktorunabhängiges spontanes Wachstum stellen Merkmale maligne transformierter Zellen dar [Hanahan et Weinberg, 2000]. Zum anderen wurde die Fähigkeit zu verankerungsunabhängigem Wachstum im Softagarassay untersucht.

Dieses Verfahren stellt ein etabliertes Nachweisverfahren für Tumorzellwachstum in vitro dar [Clark et al., 1995].

### Proliferationsanalysen:

Die Proliferationsanalysen wurden mit dem colorimetrischen Verfahren Cell Titer 96 durchgeführt. Dieses lieferte gut reproduzierbare Messergebnisse. Aus den im entsprechenden Kapitel dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass sowohl FH-hTERT-NS3-1 und -2, als auch FH-hTERT-NS5A-1 und -2 und FH-hTERT-Core-1 und -2 zunächst einmal eine signifikante Proliferation im zeitlichen Verlauf zeigten. Diese Proliferation war jedoch im Falle aller transfizierter Klone signifikant geringer als die der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle FH-hTERT-pcDNA. Weiterhin zeigte sich ein geringfügiger Unterschied in der Proliferation der beiden NS3- und Core-Zellklone. Bei den Proliferationsanalysen in serumfreiem Medium konnte für keinen der Zellklone eine signifikante Proliferation detektiert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Expression der HCV-Proteine ein proliferationshemmender Einfluss auf die Zellen ausgeübt wurde und vermutlich keine maligne Transformation stattgefunden hat, da die Zellen keine wachstumsfaktorunabhängige Proliferation zeigten. Zu den Proliferationseigenschaften unter Einfluss der untersuchten HCV-Proteine existieren einige Studien mit teils gegensätzlichen Ergebnissen. So konnte durch NS3 eine Aktivierung der durch C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) vermittelten Signalkaskaden und eine damit in Zusammenhang stehende verstärkte Proliferation in HepG2 und HeLa Zellen gezeigt werden [Hassan et al., 2005]. Auch *Kwun et al.* konnten in NIH3T3 Zellen eine gesteigerte Proliferation durch NS3 zeigen und postulieren eine mögliche Wachstumsinduktion durch die Repression der p21-Expression [Kwun et al., 2001]. *Siavoshian et al.* konnten jedoch in Huh-7 und Hep3B Zellen eine deutliche Verminderung der Proliferation durch die Expression von NS3 zeigen und erklären dies durch vermehrten Zellzyklusarrest [Siavoshian et al., 2004]. Auch für NS5A konnte ein

proliferationsfördernder Einfluss sowohl in murinen Fibroblasten, als auch in humanen Hepatomazellen gezeigt werden [Ghosh et al., 1999]. Außerdem ist eine aktivierende Wirkung von NS5A auf die durch Wnt/ $\beta$ -catenin und PI3K/Akt vermittelten Signalkaskaden beschrieben, die in Zusammenhang mit Proliferation, Wachstum, Zellüberleben und Apoptoseregulation gebracht werden [He et al., 2002]. Jedoch existieren auch hier andere Studien, die eine verminderte Proliferation der Zellen unter dem Einfluss von NS5A zeigen wie etwa die von *Siavoshian et al.* in Huh-7 und Hep3B und von *Arima et al.* in NIH3T3 und HeLa Zellen [Siavoshian et al., 2004; Arima et al., 2001]. Für Core konnten in unterschiedlichen Studien an transgenen Mäusen und in Zellkulturexperimenten proliferationsfördernde und auch zum Teil maligne transformierende Wirkungen gezeigt werden. Wiederum andere Studien konnten diesen Effekt nicht zeigen. Als Gründe hierfür werden unterschiedlich lange Proteinsequenzen und die subzelluläre Lokalisation von Core in den verschiedenen Studien diskutiert [Branda et Wands, 2006]. Konkret konnte unter anderem eine erhöhte Aktivität des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweges mit konsekutiv erhöhten Proliferationsraten von Huh-7 Zellen unter Einfluss von Core gezeigt werden [Fukutomi et al., 2005]. Wiederum andere Studien zeigen auch für Core andere Ergebnisse. So konnten *Siavoshian et al.* auch für Core eine verminderte Proliferationsrate in Huh-7 und Hep3B und auch *Lu et al.* in Hep3B Zellen zeigen [Siavoshian et al., 2004; Lu et al., 1999]. Die unterschiedliche Wirkung der Proteine scheint somit von Faktoren im jeweiligen Aufbau des Experiments der einzelnen Studien abhängig zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung der jeweiligen Zelllinie sein, da sich die unterschiedlichen Effekte jeweils in unterschiedlichen Zelllinien darstellten. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass die untersuchten Proteine auf die Zelllinie FH-hTERT eine proliferationshemmende Wirkung zu haben scheinen.

### Softagarassay:

Im Softagarassay wurden die FH-hTERT-Zellklone auf das für maligne transformierte Zellen typische Merkmal des verankerungsunabhängigen Wachstums hin untersucht. Als

Positivkontrolle im Versuchsaufbau wurden Huh-7 Zellen verwendet. Diese Zellen zeigen verankerungsunabhängiges Wachstum mit Koloniebildung im Softagarassay.

Die vorher dargestellten Ergebnisse zeigen nach maximal 6 Wochen bei keinem der FH-hTERT-Zellklone Bildung von Kolonien und damit kein verankerungsunabhängiges Wachstum. Huh-7 als Positivkontrolle zeigte hingegen ausgeprägte Koloniebildung.

Die Ergebnisse des Softagarassays stehen in Kontrast zu den Ergebnissen anderer Studien. So konnte sowohl für NS3 [He et al., 2007], als auch für NS5A [Giménez-Barcons et al., 2005] und Core [Ray et al., 2000] in von primären Hepatozyten abgeleiteten Zelllinien eine maligne Transformation der Zellen durch den Einfluss der Proteine mit Koloniebildung im Softagarassay gezeigt werden. Möglicherweise könnten hier Langzeituntersuchungen, bei denen die transfizierten FH-hTERT Zellklone zuvor längere Zeit in Kultur gehalten wurden, weiteren Aufschluss darüber geben, ob ein maligne transformierendes Potenzial durch NS3, NS5A und Core in FH-hTERT existiert. So zeigte sich die maligne Transformation der Zellen in der Studie von Ray et al. in einem Versuchsansatz, bei dem die Zellen annähernd 2 Jahre in Kultur gehalten wurden.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist eine maligne Transformation der untersuchten FH-hTERT-Zellklone unter dem isolierten Einfluss der einzelnen HCV-Proteine auszuschließen. Weitere Bestätigung dieser Annahme könnten beispielsweise Untersuchungen zur Kontaktinhibition und die Untersuchung von Tumorbildung im Nacktmausmodell erbringen. Diese beiden Eigenschaften stellen weitere in vitro bzw. in vivo Merkmale maligne transformierter Zellen dar. Des Weiteren könnte zur Überprüfung des maligne transformierenden Potenzials eine Langzeitkultur der FH-hTERT-Zellklone angelegt werden,

um eine eventuelle maligne Transformation durch kumulative DNA-Schädigung bei gleichzeitig supprimierter DNA-Schadensantwort zu überprüfen. Weiterhin könnten Untersuchungen an FH-hTERT durchgeführt werden, welche mit der Sequenz für das gesamte Polyprotein und/oder verschiedenen Kombinationen von HCV-Proteinen transfiziert wurden, um eine mögliche Transformation der Zellen hervorzurufen. Hiermit könnte das FH-hTERT Zellkulturmodell als geeignetes Modell in der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese bestätigt werden.

Auch wenn die Wirkung der HCV-Proteine durch die veränderte Proliferation, die Induktion von oxidativem Stress und die veränderte Expression von CDKN1A in den Zellklonen bewiesen scheint, wären proteinbiochemische Untersuchungen zum Nachweis und z.B. zur subzellulären Lokalisation der Proteine sinnvoll. Auch weitere Untersuchungen zur Expression von in anderen Studien beschriebenen Zielgenen der HCV-Proteine wären für die Aufdeckung der Wirkung von NS3, NS5A und Core in FH-hTERT angezeigt.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

Das hepatozelluläre Karzinom stellt weltweit die fünfthäufigste maligne Neoplasie mit den zweitmeisten krebsbedingten Todesfällen dar. Während es klinisch gut etablierte Risikofaktoren für die HCC-Entstehung gibt, konnten deren molekulare Mechanismen bisher nur in Teilen aufgeklärt werden. Statistische und auch experimentelle Untersuchungen weisen in diesem Rahmen unter anderem auf einen direkten karzinogenen Effekt von HCV-Proteinen hin. In dieser Arbeit wurde der maligne transformierende Effekt der HCV-Proteine NS3, NS5A und Core auf Telomerase-immortalisierte humane Hepatozyten (FH-hTERT) untersucht. Die Aktivierung der Telomerase führt dabei nicht zu einer malignen Transformation der Zellen bei erhaltenem hepatozytenspezifischen Phänotyp. Eine Aktivierung der Telomerase zeigt sich darüber hinaus auch bei über 90 % menschlicher HCC-

Proben, sodass das Modell Telomerase-immortalisierter Hepatozyten ein gutes in vitro Modell zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese darstellt.

In der Durchführung wurden die Telomerase-immortalisierten Hepatozyten mittels Plasmidvektoren mit den Gensequenzen von NS3, NS5A und Core stabil transfiziert und zwei das Transgen jeweils unterschiedlich stark exprimierende Zellklone weiter untersucht. Dabei zeigten vor allem die NS5A und Core exprimierenden Zellklone einen auch schon in anderen Studien beschriebenen erhöhten Spiegel an oxidativem Stress bei gleichzeitig supprimierter Induktion der DNA-Schadensantwort im Sinne eines fehlenden Expressionsanstiegs von p21 als möglichem Mechanismus für die maligne Transformation der Zellen. Für die NS3 exprimierenden Zellklone konnte kein erhöhtes Level an oxidativem Stress ermittelt werden. Wie in anderen Studien beschrieben, kann NS3 in HCV-infiziertem Gewebe zwar auch zu vermehrtem oxidativem Stress führen, es vermittelt diese Wirkung aber vor allem über die Wirkung in Kupffer-Sternzellen.

Um eine mögliche maligne Transformation der Zellklone zu überprüfen, wurde die Proliferation der Zellen bestimmt und die Zellen auf wachstumsfaktorunabhängiges und verankerungsunabhängiges Wachstum als tumorzellspezifische Merkmale untersucht. Alle transfizierten Zellklone zeigten dabei eine verminderte Proliferationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt wurde zuvor auch schon in anderen Studien in unterschiedlichen Zelllinien gezeigt und scheint auch für die Zelllinie FH-hTERT zu gelten. Eine maligne Transformation im Sinne von wachstumsfaktorunabhängigem und verankerungsunabhängigem Wachstum konnte in keinem der Zellklone festgestellt werden. Hier zeigen andere Studien andere Ergebnisse.

Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse dieser Arbeit könnte sein, dass die untersuchten Proteine in FH-hTERT erst durch kumulative Schädigung in Langzeitkultur zur malignen Transformation führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Proteine in FH-hTERT ihre Wirkung z.B. durch Fehlfaltung oder irreguläre subzelluläre Lokalisation nicht

komplett entfalten können, wodurch die in anderen Studien beschriebenen Wirkungen ausbleiben. Diese Aspekte liefern Anlass für mögliche weitere Untersuchungen. Vorstellbar wären proteinbiochemische Untersuchungen und weitere Untersuchungen zu Genexpressionsprofilen, um die Wirkung von NS3, NS5A und Core in FH-hTERT zu verifizieren und präzisieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die Wirkungen der untersuchten HCV-Proteine in einer Zelllinie untersucht wurden, die dem physiologischen menschlichen Hepatozyten aufgrund seiner Eigenschaften näher ist als andere nicht hepatozytenspezifische oder gar bereits transformierte Zelllinien.

Zuvor in anderen Zelllinien beschriebene Effekte der HCV Proteine auf Proliferation, Entstehung von oxidativem Stress und Genexpression von CDKN1A konnten in diesem nicht transformierten hepatozytenspezifischen Zellkulturmodell weitestgehend bestätigt werden.

Ein transformierender Effekt konnte in FH-hTERT bisher nicht gezeigt werden, ist aber aufgrund fehlender Langzeituntersuchungen noch nicht auszuschließen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

•OH <sup>-</sup>	Hydroxyl-Radikal
β-Catenin	cadherin-associated protein β
A	Adenin
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene
ALT	alternative lengthening of telomeres
B2M	β-2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSO	DL-Buthionin-[S,R]-sulfoximin
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
CD81	CD-Molekül 81
C-erbB2	human epidermal growth factor receptor 2
c-MET	MET- <i>proto-oncogene</i> / hepatocyte growth factor receptor
Carboxy-DCF	5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein
Carboxy- H <sub>2</sub> DCF	5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein
Carboxy- H <sub>2</sub> DCFDA	5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetat
CDKN1A	cyclin-dependant kinase inhibitor 1A
cDNA	complementary DNA
CMV	Zytomegalievirus
Ct-Wert	crossing threshold-Wert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E	PCR-Effizienzfaktor E
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetales Rinderserum
FH	fetale Hepatozyten
FH-hTERT	Telomerase-immortalisierte fetale humane Hepatozyten
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

---

Ha-ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HBBS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
Core	hepatitis C virus core protein
NS3	hepatitis C Virus non-structural protein 3
NS5A	hepatitis C Virus non-structural protein 5A
HGF	hepatocyte growth factor
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
Huh-7	human hepatocellular carcinoma cell line 7
IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
kb	Kilobasen = 1000 bp ; Längeneinheit für Nukleinsäuren
LB-Agar	Luria-Bertani-Agar
MEK	mitogen-activated protein kinase
Mg <sup>2+</sup>	zweiwertiges Magnesiumion
mRNA	messenger-RNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Natriumbikarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
Oligo-dT- Primer	Oligo-Desoxythymidin-Primer
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit-Ion
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	cyclin-dependant kinase inhibitor 1A
p53	tumor protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain-reaction
PD	Populationsverdopplung
POT1	protection of telomeres 1 homolog
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
Rb	retinoblastoma 1

RNA	ribonucleic acid
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RPL13A	ribosomales Protein L13A
SR-B1	scavenger receptor B
T	Thymin
TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBP	TATA binding protein
TERC	telomerase RNA component
TERT	telomerase reverse transcriptase
TRF-1, -2	telomeric repeat binding factor 1 , -2
Taq	Thermus aquaticus
Wnt	wingless-Int-I protein

**7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

	Seite
<b>Abbildungen:</b>	
1: Gewinnung von Einzelzellklonen	22
2: Prinzip der Messung von oxidativem Stress mittels Carboxy-H <sub>2</sub> DCFDA	26
3: Agarosegelelektrophorese der Platinium-PCR	37
4: Relative Expression von NS3 in FH-hTERT-Zellklonen	38
5: Relative Expression von NS5A in FH-hTERT-Zellklonen	39
6: Relative Expression von Core in FH-hTERT-Zellklonen	40
7: Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS3-Zellklone	41
8: Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS5A-Zellklone	42
9: Proliferationsanalyse von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-Core-Zellklone	43
10: Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS3-Zellklone	44
11: Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-NS5A-Zellklone	45
12: Serumabhängigkeit von FH-hTERT-pcDNA und der FH-hTERT-Core-Zellklone	46
13: Oxidativer Stress der FH-hTERT-NS3-Zellklone	47
14: Oxidativer Stress der FH-hTERT-NS5A-Zellklone	48
15: Oxidativer Stress der FH-hTERT-Core-Zellklone	49
16: Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-NS3-Zellklonen	50
17: Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-NS5A-Zellklonen	51
18: Relative Expression von CDKN1A (p21) in FH-hTERT-Core-Zellklonen	52
19: Oxidativer Stress in der HCV-assoziierten Hepatokarzinogenese	58
<b>Tabellen:</b>	
1: Primer der Platinium-PCR	31
2: Primer der qRT-PCR	33
3: Ergebnisse des Softagarassay	53

## 8. Literaturverzeichnis

- Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220 : 194-200.
- Allsopp RC, Yu J (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269 : 1236-1241.
- Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R (2011). Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol* 8 : 258-269.
- Arima N, Kao CY, Lichti T, Padmanabhan R, Sasaguri Y (2001). Modulation of Cell Growth by the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS5A. *J Biol Chem.* 20 : 12675-12684
- Azechi H, Nishida N, Fukuda Y (2001). Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 60 : 346-354.
- Barltrop, J.A. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1: 611-614.
- Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol* 19 : 95-103.
- Bataller R, Brenner DA (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115 : 209-218.
- Blackburn EH (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350 : 569-573.
- Blackburn EH (2000). Telomere states and cell fates. *Nature* 408 : 53-56.
- Branda M, Wands JR (2006). Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43 : 891-902.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132 :1133-1145.
- Brugarolas J, Moberg K, Boyd SD, Taya Y, Jacks T, Lees JA (1999). Inhibition of cyclin dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after g-irradiation. *Proc Natl Acad Sci* 96 : 1002-1007.
- Bruix, J, Sherman M (2011), Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53 : 1020-1022.
- Budhu A, Chen Y, Kim JW, Forgues M, Valerie K, Harris CC, Wang XW (2007). Induction of a unique gene expression profile in primary human hepatocytes by hepatitis C virus core, NS3 and NS5A proteins. *Carcinogenesis* 28 : 1552-1560.

- Bureau C, Bernad J, Chaouche N, Orfila C, Beraud M, Gonindard C (2001). Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem* 276 : 23077-23083.
- Burlone M, Budkowska A (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90 : 1055-1070.
- Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res* 424 : 37-49.
- Chen QM, Liu J, Merrett JB (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochem J* 34 : 543-551.
- Choi J (2012). Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. *Free Radic Biol Med* 52 : 1135-1150.
- Choi J, Corder NL, Koduru B, Wang Y (2014). Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med* 72 : 267-284.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244 : 359-362.
- Clark GJ, Cox AD, Graham SM, Der CJ (1995). Biological assays for Ras transformation. *Methods Enzymol* 255 : 395-412.
- Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29 : 314-318.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3 : 207-212.
- de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, Lambeth JD (2010). Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52 : 47-59.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 : 817-825.
- El-Serag HB (2011). Hepatocellular carcinoma. *NEJM* 365 : 1118-1127.
- El-Serag HB, Rudolph KL (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132 : 2557-2576.

- Fattovich G, Giustina G, Schalm SW (1995). Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The EUROHEP Study Group on Hepatitis B Virus and Cirrhosis. *Hepatology* 21 : 77-82.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269 : 1236-1241.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Erhältlich unter : <http://globocan.iarc.fr>
- Fukutomi T, Zhou Y, Kawai S, Eguchi H, Wands JR, Li J (2005). Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression. *Hepatology* 41 : 1096-1105.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (2014). Atlas der Krebsinzidenz und –mortalität in Deutschland (GEKID-Atlas). Datenlieferung: Dezember 2013, Lübeck, Deutschland. Verfügbar über: <http://www.gekid.de>
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB (1999). Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 80 : 1179-1183.
- Giménez-Barcons M, Wang C, Chen M, Sánchez-Tapias JM, Sáiz JC, Gale M (2005). The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J Interferon Cytokine Res.* 25 :152-64.
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 9599–9604.
- Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43 : 405-413.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de LT (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97 : 503-514.
- Guerrero RB, Roberts LR (2005). The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 42 : 760-777.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400 : 464-468.
- Haker B, Fuchs S, Dierlamm J, Brummendorf TH, Wege H (2007). Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes. *Cancer Lett* 256 : 120-127.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100 : 57-70.

- Harley CB (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* 21 : 494-502.
- Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O (2005). Activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) signalling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology* 333 : 324-336.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621.
- He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S (2002). Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 76 : 9207-9217.
- He Q, Cheng R, Chen Z, Xiao X, Xiao Z, Li C, Li B, Zhang P, Zheng H, Feng D (2007). Cell transformation and proteome alteration in QSG7701 cells transfected with hepatitis C virus non-structural protein 3. *Acta Biochim Biophys Sin* 39 : 751-762.
- Hirabayashi, Y, Taniuchi S Kobayashi Y (1985). A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 82 : 253-259.
- Hosomura N, Kono H, Tsuchiya M, Ishii K, Ogiku M, Matsuda M, Fujii H (2011). HCV-related proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues. *Dig Dis Sci* 56 : 1057-1064.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (2013). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/), based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014. National Cancer Institute. Bethesda, MD, USA.
- Hu KQ, Tong MJ (1999). The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 29 : 1311-1316.
- Ioannou G, Splan M, Weiss N, McDonald G, Beretta L, and Lee S (2007). Incidence and predictors of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 5 : 938-945
- Ivanov A., Smirnova O, Ivanova O, Masalova O, Kochetkov S, Isaguliant M (2011). Hepatitis C virus proteins activate nrf2/are pathway by distinct ros-dependent and independent mechanisms in huh7 cells. *PLoS* 2011, 6, e24957
- Jablkowski M, Bocian A, Bialkowska J, Bartkowiak J (2005). A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 24 : 117-125.

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21 : 111-114.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 : 2011-2015.

Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J (2005). Hepatitis virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases ROS production. *J Biol Chem* 280 : 37481-37488.

Koressaar T, Remm M (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23 : 1289-1291.

Kusakari T, Kariya M, Mandai M, Tsuruta Y, Hamid AA, Fukuhara K, Nanbu K, Takakura K, Fujii S (2003). C-erbB-2 or mutant Ha-ras induced malignant transformation of immortalized human ovarian surface epithelial cells in vitro. *Br J Cancer* 89 : 2293-2298.

Kwun HJ, Jang KL (2003). Dual effects of hepatitis-C virus core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *J Viral Hepat* 10 : 249-255.

Kwun HJ, Jung EY, Ahn JY, Lee MN, Jang KL (2001). p53-dependent transcriptional repression of p21 (waf1) by hepatitis C virus NS3. *J Gen Virol* 82 : 2235-2241.

Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC (2002). HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 21: 4801-4811.

Lerat H, Honda M, Beard MR, Loesch K, Sun J, Yang Y (2002). Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122 : 352-365.

Llovet JM, Chen Y, Wurbach E, (2006). A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 131 : 1758–1767.

Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM (2009). Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 136 : 138-148.

Lu W, Lo SY, Chen M, Wu KJ, Fung Y, Ou J (1999). Activation of p53 Tumor Suppressor by Hepatitis C Virus Core Protein. *Virology* 264 : 134-141.

Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, Lai MM (2006). Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 80 : 7199–7207.

- Machida K., Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM (2004). Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* 78 : 8835-8843.
- Majumder M, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB (2001). Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol* 75 : 1401-1407.
- Martindale JL, Holbrook NJ. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192 : 1–15.
- Miyanishi M, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S (2007) Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression. *Oncol Rep* 17: 329-333.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4 : 1065-1067.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 65 : 1575-1582.
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42 : 3858-3863.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277 : 955-959.
- Oh BK, Jo CK, Park C, Kim K, Jung LW, Han KH, Nyun PY (2003). Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 39 : 786-792.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122 : 366–375.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55 : 74-108.
- Pfaffl M W (2004). Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1 : 92-95.

- Potter H, Weir L, Leder P (1984). Enhancer-dependent expression of human Kc immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad.* 81 : 7161-7165.
- Rasmussen, R. (2001). "Quantification on the LightCycler". in: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K. *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg : 21-34.
- Ray RB, Meyer K, Ray R (2000). Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 25: 197-204.
- Roberts LR, Gores GJ (2005). Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin Liver Dis* 25 : 212-225.
- Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, Maclean K, Chang AC, Moy EL, Englezou A, Warneford SG, la-Pozza L, Reddel RR (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15 : 4745-4753
- Sambrook S, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York : 1989.
- Satyanarayana A, Manns MP, Rudolph KL (2004). Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 40 : 276-283.
- Schulze K, Imbeaud S, Letouze E et al. (2015). Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature genetics* 47 : 505-511
- Schwarz KB, Kew M, Klein A, Abrams RA, Sitzmann J, Jones L, Sharma S (2001). Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 46:2173-2178.
- Schwer B, Ren S, Pietschmann T, Kartenbeck J, Kaehlcke K, Bartenschlager R, Yen TS, Ott M (2004). Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol.* 78 : 7958-7968.
- Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O (1998). Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 27 : 1435-1440.
- Shay JW, Bacchetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33 : 787-791.
- Siavoshian S, Abraham JD, Kieny MP, Schuster C (2004). HCV core, NS3, NS5A and NS5B proteins modulate cell proliferation independently from p53 expression in hepatocarcinoma cell lines. *Arch Virol* 149: 323–336.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42 : 962-973.

- Stewart SA (2005). Telomere maintenance and tumorigenesis: an "ALT"ernative road. *Curr Mol Med* 5 : 253-257.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13 : 1549-1556.
- Tannapfel A, Busse C, Weinans L (2001). INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 20 : 7104-7109.
- Tien Kuo M, Savaraj N. (2006). Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers. *Mol Carcinog* 459 : 701–709.
- Tsai W, Chung RT (2010). Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 29 : 2309–2324.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 : 115.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266 : 37-56.
- Wang AG, Lee DS, Moon HB, Kim JM, Cho KH, Choi SH (2009). Non-structural 5A protein of hepatitis C virus induces a range of liver pathology in transgenic mice. *J Pathol* 219 : 253–262.
- Wege H, Chui MS, Le HT, Strom SC, Zern MA (2003). In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging. *Cell Transplant* 12 : 897-906.
- Wege H, Heim D, Lütgehetmann M, Dierlamm J, Lohse AW, Brümendorf TH (2011). Forced activation of Beta-catenin signaling supports the transformation of hTERT immortalized human fetal hepatocytes. *Mol Cancer Res* 9 :1222-1231.
- Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA (2003). Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 124 : 432-444.
- Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 16 : 935-942.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18 : 173-179.
- Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, Jirtle RL (1997). Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 94 :10351–10355.

Yamanaka T, Kodama T, Doi T (2002). Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 528-534.

Yeh MM, Daniel HD, Torbenson M (2010). Hepatitis C-associated hepatocellular carcinomas in non-cirrhotic livers. *Mod Pathol* 23 : 276-283.

Yeoman AD, Al-Chalabi T, Karani JB, Quaglia A, Devlin J, Mieli-Vergani G (2008). Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: implications for follow-up and screening. *Hepatology* 48 : 863-870.

## 9. Danksagung

Zunächst einmal möchte ich Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit danken, dass ich die Arbeiten für die vorgelegte Dissertation an der von ihm geleiteten Klinik durchführen konnte.

Darüber hinaus danke ich dem Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ unter der Leitung von Prof. Dr. Gisa Tiegs. Die begleitenden Seminare und Fortbildungsmöglichkeiten, der wissenschaftliche Austausch mit anderen Arbeitsgruppen und nicht zuletzt die finanzielle Unterstützung durch das Graduiertenkolleg haben die Arbeiten an diesem Projekt erheblich erleichtert.

Besonderer Dank gebührt PD Dr. Henning Wege für die tolle Betreuung dieses Projekts.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der „AG Leberregeneration und Telomerase“ für die Anleitung und Hilfe im Labor. Dr. Denise Heim und Petra Trautmann gebührt hier besonderer Dank.

---

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jan Meiners
Geburtsdatum	05.09.1987
Geburtsort	Winsen (Luhe)
Familienstand	ledig

---

### Ausbildung

#### Fachärztliche Weiterbildung

Seit 08/2014	Chirurgische Weiterbildung in der Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
--------------	--

#### Studium

06/2014	Approbation als Arzt
2007-2014	Medizinstudium an der Universität Hamburg

#### Schule

1999-2006	Gymnasium Winsen, Abitur 07/2006
1997-1999	Orientierungsstufe (OS I) in Winsen
1993-1997	Grundschule (Alte Stadtschule) in Winsen (Luhe)

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned over a dotted line.