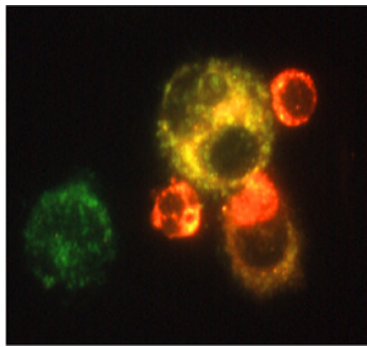


Zur Rolle von Apoptose und Caspase-Aktivierung in Lebererkrankungen



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Xandra Volkmann

geboren am 21. April 1978 in Halle/S.

Referent: Prof. Dr. M. Gaestel

Koreferent: Prof. Dr. R. Jacobs

Tag der Promotion: 18.12.2008

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Gaestel für die Bereitschaft die universitäre Betreuung zu übernehmen, sowie Prof. Dr. Jacobs und Prof. Dr. Schwinzer für die Erstellung der Gutachten danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei PD Dr. Heike Bantel, für die Überlassung des Themas, die Projektplanung und -betreuung, für die vielseitigen Gelegenheiten die wissenschaftlichen Ergebnisse auf internationalen Kongressen präsentieren zu können, für ihr Vertrauen und anregende Diskussionen und Hinweise, sowie für das kritische Lesen des Manuskriptes. Bei Prof. Michael Manns möchte ich mich für die Bereitstellung des Patientenmaterials und die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik anfertigen zu können, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen, die mir mit ihrer Kooperationsbereitschaft, Materialien und Ratschlägen in vieler Hinsicht geholfen haben. Dieser Dank geht an Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff, Dr. Ute Fischer, Dr. Frank Neumann, Dr. Nicole Seidel, Dr. Philipp Efken, Matthias Anstatt, Kosta Iordanidis, Dr. Matthias Hardtke-Wolenski und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Rudolph und Prof. Dr. Baum.

Diese Arbeit wäre ohne die Kooperationsbereitschaft und die Bereitstellung von Patientenmaterial durch verschiedene medizinische Abteilungen der MHH nicht zustande gekommen. Deshalb danke ich ganz besonders PD Dr. Matthias Bahr, Dr. Frank Lehner, Dr. Florian Länger und Frau Lehne (Pathologie) und den Mitarbeitern der Leberambulanz.

Vielen Dank auch an Hartmut Vaske aus der Abteilung Biometrie, der mich bei den zahlreichen statistischen Auswertungen unterstützt hat.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank den Menschen, die mir außerhalb der Arbeit die nötige seelisch-moralische Unterstützung gegeben haben. Dieser Dank geht in erster Linie an meine Familie: Christel und Manja Volkmann und Daniel Krause, sowie meine Freunde Annica Germey, Marc René Lörchner, Matthias Haiduczek, Anja Buchmann und Dr. Antje Klöpfer.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung	7
2. Ergebnisse und Diskussion.....	12
2.1. Die Bedeutung der Apoptose bei chronischer HCV-Infektion	12
2.2. Nachweis von Caspase-Aktivierung im Serum: Ein neuer nicht invasiver Biomarker für die apoptotische Leberschädigung bei chronischer HCV-Infektion	13
2.3. Die Rolle von Caspasen in der HCV-vermittelten Leberverfettung	15
2.4. Die Bedeutung der Caspase-Aktivierung für das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion	17
2.5. Die Wirkung von TRAIL in der gesunden Leber und bei Lebererkrankungen	19
3. Literatur	22
4. Einzelarbeiten.....	30
Publikation 1: “Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury.”.....	30
Publikation 2: “The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum.”	31
Publikation 3: “Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection.”.....	32
Publikation 4: “Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver.”	33
Publikation 5: “Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure.”.....	34
Publikationen.....	37
Lebenslauf	39
Erklärung.....	40

Zusammenfassung

Eine erhöhte Apoptoserate wird für die Pathogenese zahlreicher chronisch entzündlicher und autoimmunvermittelter Lebererkrankungen diskutiert. Es bleibt jedoch weitgehend unklar, welche molekularen Mechanismen bei diesen Erkrankungen zugrunde liegen und welche Rolle dabei Proteasen der Caspasen-Familie spielen. Wir haben neue, nicht invasive Biomarker für die apoptotische Leberzellschädigung identifiziert, die für die Beurteilung der Krankheitsaktivität, des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens herangezogen werden können. Mittels eines ELISAs konnten wir zeigen, dass die Caspase-Aktivität im Serum von HCV-Patienten deutlich erhöht ist. Dabei zeigten über 50% der HCV-Patienten mit im Normbereich liegenden Transaminasen eine bereits erhöhte Caspase-Aktivierung im Serum. Des Weiteren ist eine erhöhte Caspase-Aktivität sowohl in Leberbiopsien, als auch im Serum von HCV-Patienten mit Steatose, nachweisbar und korreliert eng mit dem Ausmaß der Leberzellverfettung. Weiterhin konnte der Caspase-Aktivierung eine wichtige Rolle in der HCV-Elimination zugeschrieben werden. HCV-Patienten, welche auf eine Interferon-Therapie ansprachen, wiesen, im Gegensatz zu therapierefraktären Patienten, eine signifikant erhöhte Caspase-Aktivität im Serum auf, die eng mit der Viruselimination korreliert. Darüber hinaus könnte sich der Nachweis der Caspase-Aktivität als prädiktiver Serum-Marker für das Therapie-Ansprechen bei chronischer HCV-Infektion erweisen. In der Elimination von Virus-infizierten und transformierten Zellen wird dem TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System eine bedeutende Rolle beigemessen. TRAIL ist ein viel versprechender Kandidat für den Einsatz in der Krebstherapie, da es in einem breiten Spektrum humaner Krebs-Zelllinien, aber nicht in vielen normalen Zellen, Apoptose induziert. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass TRAIL in primären Hepatozyten (PHH) Apoptose induziert. Dabei ist weitestgehend unbekannt, ob die Hepatotoxizität auch *in vivo* nachweisbar ist und welchen Einfluss Chemotherapeutika oder Lebererkrankungen haben. Wir konnten zeigen, dass im intakten gesunden Lebergewebe durch verschiedene rekombinante TRAIL-Versionen, im Gegensatz zu PHHs, keine Zytotoxizität induziert wurde. In gesunder Leber wurde nur durch die Kombination von TRAIL mit Depsipeptid Caspase-Aktivierung und Apoptose induziert. Lebergewebe von Patienten mit chronischer HCV-Infektion oder Leberverfettung zeichnet sich durch eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber TRAIL aus. Die Applikation von TRAIL bei Patienten mit chronisch entzündlichen Lebererkrankungen oder metabolischem Syndrom sowie der Einsatz von TRAIL zusammen mit Chemotherapeutika sollten deshalb unter engmaschigem Monitoring hinsichtlich einer potentiellen Hepatotoxizität erfolgen.

Schlagworte: Caspase, Biomarker, TRAIL-Hepatotoxizität

Summary

There is increasing evidence that apoptosis plays an important role in the pathogenesis of various chronic inflammatory and autoimmun-mediated liver diseases. The molecular mechanisms that cause liver cell damage and the role of caspases in this process have not been clearly defined. We identified new non invasive biomarkers for liver cell damage that are useful to determine activity and progression of liver disease and may be suitable for monitoring the efficacy of therapeutic approaches. Using an ELISA we demonstrated that caspase activity is markedly increased in sera of HCV patients. Interestingly, 50% of HCV patients exhibited already elevated serum caspase activity despite normal aminotransferase level. Moreover, increased caspase activation can be found not only in liver biopsies, but also in sera from HCV patients with liver steatosis and the extent of steatosis closely correlated with serum caspase activity. On the other hand we could demonstrate an important role of caspase activity in HCV clearance that could also predict the efficacy of antiviral therapy. We found that compared with nonresponding individuals, responding patients showed significantly increased caspase activity, which was closely correlated with virus elimination.

The TRAIL/TRAIL receptor system might play an important role in the elimination of virally infected and transformed cells. TRAIL is a promising target for development as a cancer-specific agent because it induces apoptotic cell death in a wide variety of transformed cell lines and tumor cells but not in most normal cells. Recent experiments suggested that isolated primary human hepatocytes (PHH) are susceptible to certain TRAIL agonists. Whether TRAIL indeed exerts hepatotoxicity *in vivo* and how this is influenced by chemotherapeutic drugs or liver disease are completely unknown. We could demonstrate that different forms of recombinant TRAIL induced no cytotoxicity when incubated with tissue explants of fresh healthy liver. TRAIL induced apoptosis only in PHHs and when combined with HDAC inhibitor depsipeptide. Strikingly, however, TRAIL alone triggered massive apoptosis accompanied by caspase activation in tissue explants from patients with liver steatosis or hepatitis C viral infection. Moreover, TRAIL sensitivity was associated with an increased expression of TRAIL receptors and up-regulation of proapoptotic Bcl-2 proteins. These results suggest that clinical trials should be performed with great caution when TRAIL is combined with chemotherapy or administered to patients with inflammatory liver diseases and metabolic syndromes.

Key words: caspase, biomarker, TRAIL-hepatotoxicity

1. Einleitung

In jeder Sekunde sterben Millionen Zellen unseres Körpers durch einen als Apoptose bezeichneten programmierten Zelltod, welcher die Funktionalität des gesamten Organismus sicherstellt. Apoptose spielt eine essentielle Rolle bei regenerativen und immunologischen Vorgängen, der embryonalen Entwicklung des Organismus, sowie der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Zelltod und Zellproliferation in adulten Geweben.¹ Eine Störung des apoptotischen Gleichgewichts spielt in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, eine Rolle. Eine verminderte Apoptoserate wird beispielsweise bei der Tumorgenese postuliert, während eine erhöhte Apoptoserate bei neurodegenerativen und autoimmunbedingten Erkrankungen sowie bei viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten beobachtet werden kann.^{2,3} Eine weitere Form des Zelltodes – Nekrose - hingegen wird typischerweise durch Traumen oder Noxen ausgelöst, die durch Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebungen zu einer Zellschwellung führt und schließlich das Platzen der Zelle bedingt. Die Freisetzung des Zellinhaltes ruft eine Entzündungsreaktion hervor, die auch benachbartes gesundes Gewebe schädigen kann.

Der apoptotische Zelltod ist ein sehr schneller, aktiver Prozess, der sich durch morphologisch und biochemisch stereotype Besonderheiten auszeichnet (Abb.1). Im Gegensatz zur Nekrose schrumpft die Zelle und löst sich von ihren Nachbarzellen. Auf der Oberfläche bilden sich Bläschen und es kommt zu einer Verdichtung des normalerweise locker im Kern verteilten Chromatins. Schließlich zerfällt die apoptotische Zelle in viele membranumhüllte Körperchen, die Zellorganellen und Zellkernfragmente enthalten. Diese werden – im Gegensatz zur Nekrose - ohne Entzündungsreaktion von dendritischen Zellen und Makrophagen mittels spezifischer Rezeptoren erkannt, aufgenommen und abgebaut.⁴⁻⁷

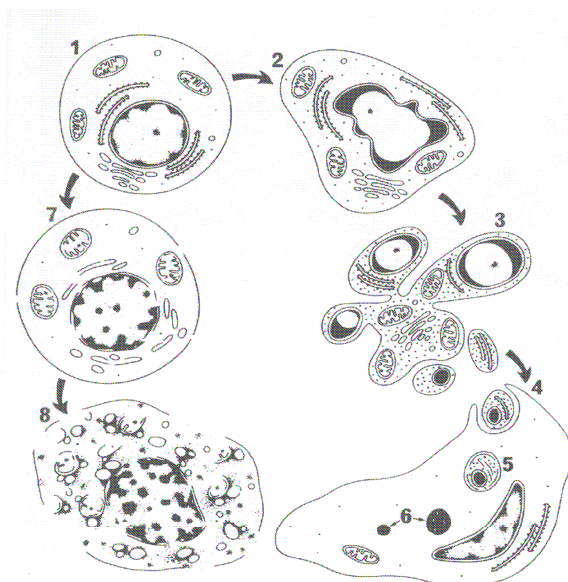


Abb. 1: Strukturelle Veränderungen während der Apoptose (2-6) und Nekrose (7 und 8)

(1) Normale Zelle

(2) Die frühe Apoptose ist durch Kondensation des nukleären Chromatins sowie des Zytoplasmas und durch Membran-Ausstülpungen gekennzeichnet.

(3) Nukleäre Fragmente und Ausstülpungen bilden sog. apoptotische Körper, die (4) von umliegenden Zellen phagozytiert und (5, 6) durch die Lysosomen abgebaut werden.

(7) Die Entwicklung von Nekrose wird mit Elektrolytverschiebungen in Zusammenhang gebracht die zur Zellschwellung führen.

(8) Schließlich platzt die nekrotische Zelle und der Zellinhalt wird freigesetzt.

Bei der Entscheidung über die Art des Zelltodes spielt der zelluläre Energiestatus eine entscheidende Rolle. Für den Ablauf des apoptotischen Zelltodes werden hohe ATP-Konzentrationen benötigt, während ATP-Mangel einen nekrotischen Zelltod begünstigt.⁸ Führen Stressoren (z.B. Toxine, chemische Substanzen) zum Abbau von ATP, kann ein direkter Übergang in den passiven Nekroseprozess erfolgen.⁹

Die Schlüsselenzyme der Apoptose bilden intrazelluläre Cysteinproteasen, die sogenannten Caspasen. Caspasen besitzen einen funktionellen Cysteinrest im aktiven Zentrum und spalten spezifische Substrate nach einem Aspartatrest in P1-Position.¹⁰⁻¹² Caspasen werden konstitutiv als inaktive Vorstufen synthetisiert und durch Proteolyse aktiviert. Aktivierte Caspasen bilden eine proteolytische Kaskade, die der Weiterleitung und Amplifizierung des proteolytischen Signals dient. In dieser Kaskade werden zunächst sogenannte Initiatorcaspasen, wie Caspase-8 und -9, aktiviert, die nachfolgend eine Reihe von Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 aktivieren. Effektorcaspasen spalten spezifische Substrate und bedingen dadurch den apoptotischen Zelltod.^{13,14} Zu den Caspase-Substraten zählen für die Zellintegrität und -funktion wichtige Enzyme und Proteine, wie beispielsweise das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), Regulatorproteine des Zellzyklus (MDM-2, Retinoblastoma-Protein etc.) sowie Strukturproteine des Zellkernes und des Zytoskeletts (Lamin, Gelsolin, Cytokeratin-18 etc.).^{15,16}

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt über zwei verschiedene Signalwege: den extrinsischen und den intrinsischen (mitochondrialen) Signaltransduktionsweg. Der extrinsische Signalweg wird über die Aktivierung von Rezeptoren, welche zu einer Familie strukturell verwandter Moleküle, der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-Familie, gehören, vermittelt (Abb.2).¹⁷⁻¹⁹ Zu dieser Todesrezeptorfamilie zählen der CD95-Rezeptor und die TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand)-Rezeptoren. Bei den TRAIL-Rezeptoren unterscheidet man zwei agonistische Rezeptoren (TRAIL-R1 und -R2), die das Todessignal am Rezeptor weiterleiten und zwei antagonistische, sogenannte „Decoy“-Rezeptoren (TRAIL-R3 und -R4), die aufgrund eines funktionellen Defektes am Rezeptor die Signal-Weiterleitung blockieren.²⁰⁻²² Die Aktivierung des entsprechenden Todesrezeptors erfolgt über die extrazelluläre Bindung seines spezifischen Liganden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung des death-inducing signaling complex (DISC), bestehend aus dem intrazellulären Anteil des Rezeptors, dem Adaptermolekül FADD und der inaktiven Vorstufe von Caspase-8/-10. Die Formation dieses hochmolekularen Proteinkomplexes führt zur Aktivierung der Initiatorcaspasen-8/-10, welche ihrerseits eine Reihe weiterer Effektorcaspasen aktivieren. Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6- oder -7 verursachen durch

die Spaltung zahlreicher Proteine die biochemischen und morphologischen Veränderungen des apoptotischen Zelltodes. Die DISC-Bildung und dadurch erfolgte Caspase-Aktivierung im extrinsischen Signalweg kann durch das anti-apoptotische Molekül FLIP (Flice Inhibitory Protein) mit seinen Splice-Varianten (Flip-1 und Flip-s) inhibiert werden.

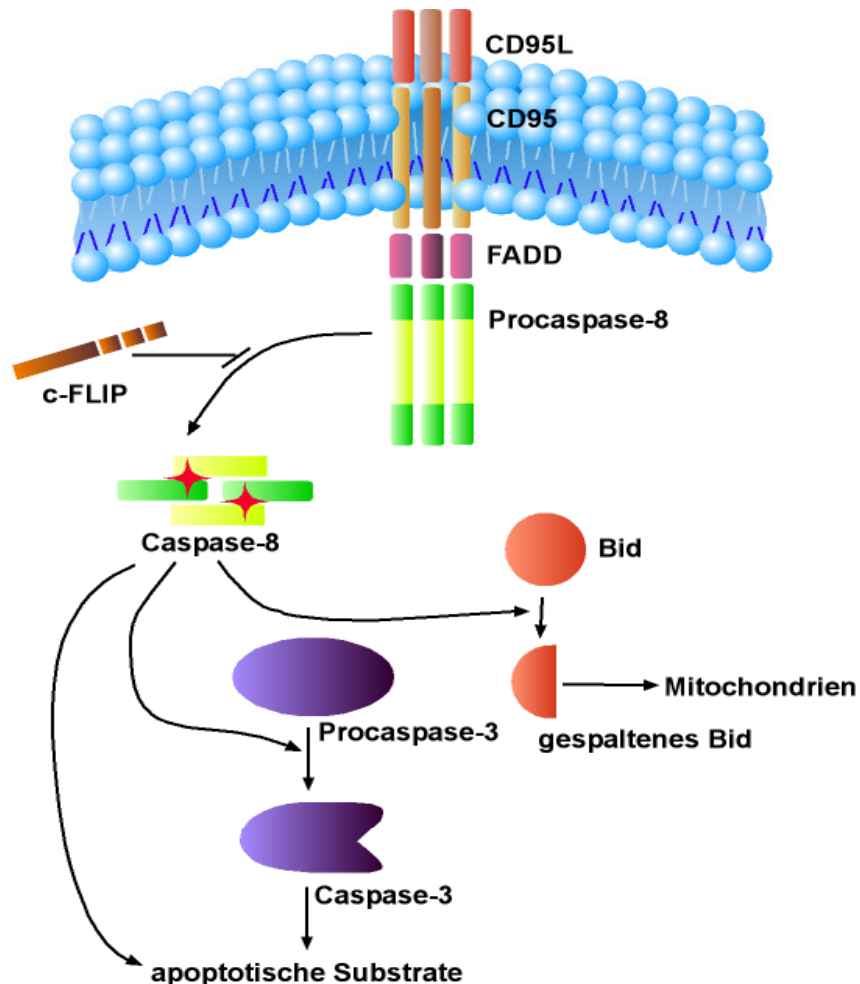


Abbildung 2: Todesrezeptor-vermittelter (extrinsischer) Signalweg der Apoptose. Die Bindung eines spezifischen Liganden an den Todesrezeptor führt zur Todesrezeptorkomplexbildung, die sich aus dem Adaptorprotein FADD, Pro-Caspase-8 (oder -10) sowie dem intrazellulären Rezeptoranteil zusammensetzt. Durch diese Komplexbildung kommt es zur autoproteolytischen Aktivierung von Initiatorcaspase-8 (-10), die nachfolgende Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert. Effektorcaspasen spalten eine Vielzahl von zellulären Substraten und induzieren somit den apoptotischen Zelltod. In bestimmten Zellen führt aktivierte Caspase-8 zur Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid, das über den intrinsischen Signalweg die Aktivierung von Effektorcaspasen verstärkt.

Der intrinsische Signalweg wird durch zelluläre Stressfaktoren, die über die Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Moleküle, wie Bim, Bax, Bak, PUMA, Noxa, eine mitochondriale Cytochrom c-Freisetzung bedingen, induziert (Abb.3). Cytochrom c bildet mit dem Adaptormolekül APAF-1 und der Pro-Caspase-9 in einem (d)ATP-abhängigen Prozess einen

Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird.²³ Ähnlich der DISC-Formation im extrinsischen Signalweg, führt die Apoptosom-Bildung im intrinsischen Signalweg zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9, welche die nachgeordneten Effektorcaspasen proteolytisch aktiviert. Die über den intrinsischen Signalweg aktivierten Effektorcaspasen, wie Caspase-3, -6, oder -7 spalten wie bereits oben im extrinsischen Signalweg beschrieben zelluläre Substrate und induzieren somit den apoptotischen Zelltod.²⁴ Die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien und damit die Caspase-Aktivierung über den intrinsischen Signalweg kann über anti-apoptotische Moleküle der Bcl-2-Familie inhibiert werden.

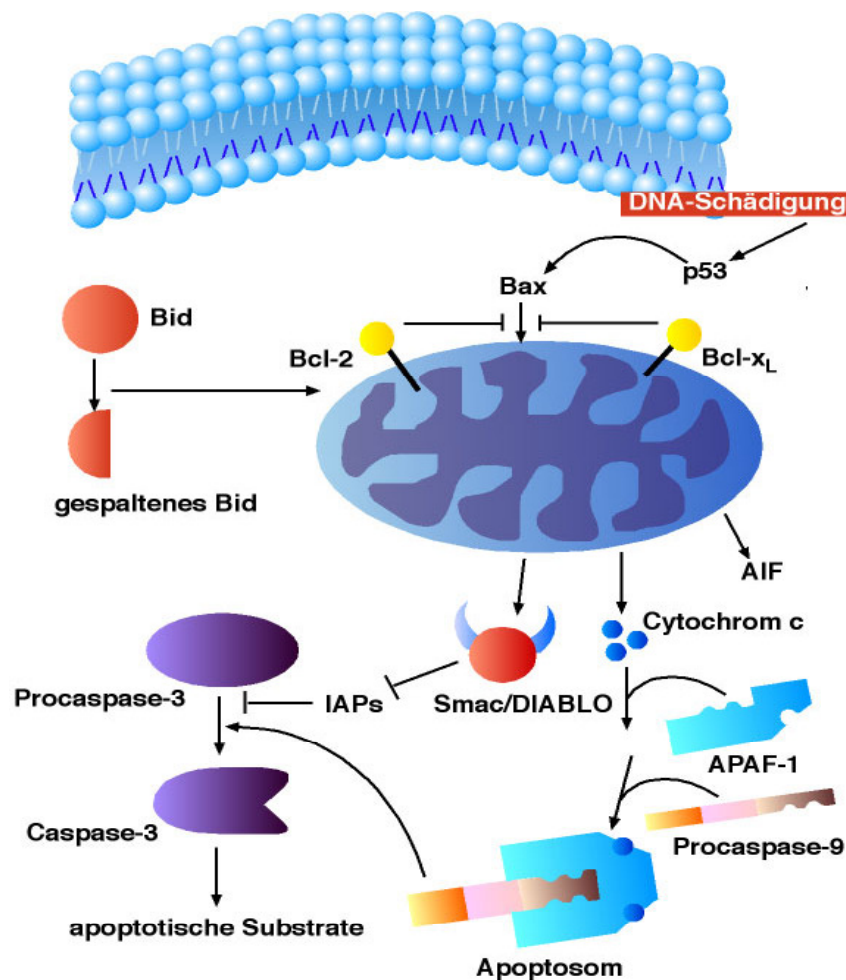


Abbildung 3: Mitochondrialer (intrinsischer) Signalweg der Apoptose. DNA-Schädigung führt über eine p53-vermittelte Aktivierung des pro-apoptischen Moleküls Bax zur Induktion des intrinsischen Signalweges mit Freisetzung pro-apoptischer Faktoren wie AIF (Apoptose-induzierender Faktor), Smac/DIABLO und Cytochrom c, die durch anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2/Bcl-xL inhibiert werden kann. Cytochrom c bildet mit dem Adaptormolekül APAF-1 und Pro-Caspase-9 das so genannte Apoptosom, das zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 mit nachfolgender Aktivierung von Effektorcaspasen wie Caspase-3 führt. Zytosolisches Smac/DIABLO inhibiert dabei anti-apoptotische Moleküle der IAP-Familie, die direkt Effektorcaspasen wie Caspase-3 inhibieren.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation ist der Rolle der Apoptose in Lebererkrankungen gewidmet, wobei insbesondere die durch Hepatitis C-Virus (HCV)-Infektion verursachte Leberschädigung untersucht wurde.

Die chronische HCV-Infektion zeichnet sich durch eine entzündliche Leberschädigung aus, die zur Leberfibrosierung führt und in eine Leberzirrhose mit dem Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms münden kann. Weltweit sind ca. 3% der Bevölkerung mit HCV infiziert.²⁵ In Europa dürften nach Schätzungen ca. 9 Millionen HCV-infizierte Menschen leben, wobei die Prävalenz zunimmt, da im Gegensatz zur Hepatitis-A oder -B-Virus-Infektion eine prophylaktische Vakzinierung nicht verfügbar ist. Ein weiteres Problem der chronischen Hepatitis C Virus Infektion ist das unbefriedigende Ansprechen auf die Standardtherapie mit pegyliertem Interferon und Ribavirin. Nur ungefähr die Hälfte der Patienten, die mit dem am häufigsten vorkommenden Genotyp 1 infiziert sind, sprechen auf diese antivirale Therapie an und eine effizientere Therapie ist gegenwärtig noch nicht verfügbar.^{26,27} Wir haben uns deshalb mit der Bedeutung der Caspase-Aktivierung für die HCV-vermittelte Leberschädigung und Viruselimination in einem Forschungsschwerpunkt dieser Dissertationsarbeit beschäftigt.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. Die Bedeutung der Apoptose bei chronischer HCV-Infektion

Die chronische HCV-Infektion ist durch eine apoptotische Leberzellschädigung gekennzeichnet.²⁸⁻³⁰ Über welche Mechanismen eine HCV-Infektion zur Apoptose der Leberzellen führt, ist bislang nur unzureichend untersucht. Im Zusammenhang hiermit gibt es sehr widersprüchliche Beobachtungen, wonach die Expression einzelner oder mehrerer HCV-Proteine einen direkten zytopathischen Einfluss auf die Leberzellen hat.³¹ Andere Beobachtungen deuten jedoch daraufhin, dass die Apoptose-Induktion bei HCV-Infektionen vermutlich eher über wirtseigene zelluläre Mechanismen gesteuert wird.^{32,33} Hierbei scheinen zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen, die Todesliganden exprimieren und mit Todesrezeptorpositiven Hepatozyten interagieren, eine wichtige Stellung einzunehmen. In der HCV-Infektion korreliert eine erhöhte hepatozelluläre Expression des Todesrezeptors CD95 mit der Entzündungsaktivität.³⁴ Ebenso wurde beobachtet, dass entsprechend der Entzündungsreaktion CD95L-exprimierende T-Zellen die Leber infiltrieren.³⁵ Es wird deshalb vermutet, dass der HCV-assoziierte Leberzelltod zumindest teilweise über eine CD95/CD95L-Interaktion vermittelt wird. Die Bedeutung des CD95/CD95L-Systems für die Virus-induzierte Leberzellschädigung wird weiterhin durch die kürzlich erfolgten Beobachtungen im Mausmodell evident. Dabei wurde gezeigt, dass die CD95-vermittelte Apoptose in Hepatozyten mit der Entwicklung einer Leberfibrose einhergeht.³⁶ Die Applikation von neutralisierendem anti-CD95L-Antikörper führte nicht nur zu einem deutlichen Rückgang der Entzündungsreaktion und Apoptoserate der Leber, sondern reduzierte auch die Fibroserate deutlich.³⁷

In einem Schwerpunkt dieser Dissertation wurde analysiert, welche Rolle Caspasen für die HCV-vermittelte entzündliche und fibrotische Leberschädigung spielen. Für den Nachweis der Caspase-Aktivierung wurde in Vorarbeiten ein monoklonaler Antikörper etabliert, der selektiv ein Neo-Epitop eines durch aktivierte Caspasen generierten Cytokeratin-18 Fragments erkennt.³⁸ Da das Intermediärfilamentprotein Cytokeratin-18 von Hepatozyten, nicht jedoch von Entzündungszellen exprimiert wird, ist dieser Antikörper geeignet, eine Caspase-Aktivierung spezifisch in Hepatozyten nachzuweisen. Durch den Einsatz dieses Antikörpers konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der hepatozellulären Caspase-Aktivierung mit der Entzündungsaktivität bei chronischer HCV-Infektion korreliert.

Die Bedeutung der Caspase-Aktivierung für die entzündliche Leberschädigung wird weiterhin durch die Beobachtung unterstrichen, dass durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren im Tiermodell die Induktion einer experimentell induzierten Hepatitis verhindert werden kann.³⁹⁻

⁴¹ Nicht zuletzt wird die bedeutende Rolle von Effektor-Caspasen für die inflammatorische Leberzellschädigung durch die Beobachtung ersichtlich, dass sich Caspase-3-Knockout-Mäuse gegenüber CD95-induzierter Leberzellschädigung als resistent erweisen.⁴² Diese Schlüsselenzyme der Apoptose eröffnen somit eine interessante Perspektive bezüglich der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien.

2.2. Nachweis von Caspase-Aktivierung im Serum: Ein neuer nicht invasiver Biomarker für die apoptotische Leberschädigung bei chronischer HCV-Infektion

Aufbauend auf diesen Ergebnissen haben wir anschließend untersucht, ob sich eine erhöhte Caspase-Aktivierung nicht nur in der Leberbiopsie, sondern auch über nicht-invasive Methoden im Serum von HCV-Patienten nachweisen lässt (Publikation 1, Seite 30).²⁸ Da die Gewebeentnahme nach wie vor mit klinischen Komplikationen assoziiert bleibt, ist die Identifikation neuer nicht invasiver Serum-Marker zur Beurteilung der Krankheitsaktivität von großem diagnostischen und therapeutischen Interesse.

Mittels Immunpräzipitation konnten wir ein Caspase-gespaltenes CK18-Fragment von 21 kD im Serum von Patienten mit chronischer HCV-Infektion nachweisen, das im Serum gesunder Kontrollpersonen nicht vorgefunden wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nachfolgend ein ELISA entwickelt, der eine Quantifizierung von Caspase-gespaltenem CK-18 im Serum ermöglicht (Abb.4). Im Einklang mit den histologischen Untersuchungen zeigten Patienten mit chronischer HCV-Infektion signifikant höhere CK-18-Fragment-Spiegel im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

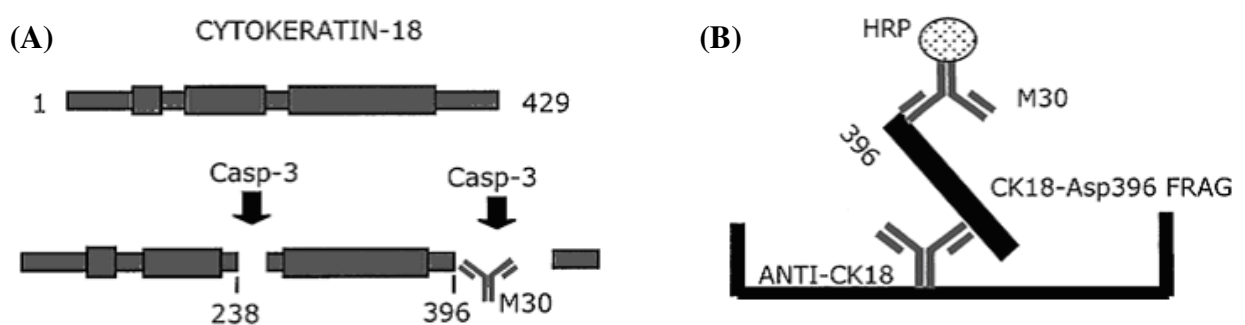


Abbildung 4: Das Prinzip des M30-ELISA-Assays (A) Während der Apoptose wird Cytokeratin 18 durch Caspasen an Asp238 und Asp 396 gespalten. Die Spaltung an Asp396 führt zur Freilegung des Neo-Epitops, welches vom M30-Antikörper erkannt wird. (B) Im M30-ELISA wird ein Antikörper, der ein Epitop N-terminal von Asp396 erkennt, als „Catcher“ verwendet. Als „Detektor“ dient ein HRP-konjugierter M30-Antikörper.

Die Messung der Serumkonzentration der Transaminasen ist ein gebräuchlicher Marker für die Beurteilung der Leberschädigung. Jedoch zeigen ungefähr 25% der Patienten mit chronischer HCV-Infektion im Normbereich liegende Transaminasen. Gegenwärtig wird intensiv debattiert, ob diese Patienten leberbiopsiert und therapiert werden sollten, da bisher bei diesen Patienten von einer geringen Krankheitsaktivität ausgegangen wurde. Neuere Studien mit größeren Patientenzahlen belegen jedoch, dass eine nicht unerhebliche Anzahl an HCV-Patienten mit normalen Transaminasen bereits eine fortgeschrittene Leberschädigung mit höhergradiger Fibrosierung aufweist.⁴³⁻⁴⁵ In einem weiteren Projekt haben wir deshalb untersucht, inwieweit eine Caspase-Aktivierung im Serum von Patienten mit chronischer HCV-Infektion und normwertigen Transaminasen nachgewiesen werden kann (Publikation 1, Seite 30). Interessanterweise zeigte mehr als die Hälfte der HCV-Patienten mit im Normbereich liegenden Transaminasen eine bereits erhöhte Caspase-Aktivierung im Serum. Äußerst interessant war dabei die Beobachtung, dass 30% der Patienten mit normalen Transaminasen und erhöhter Caspase-Aktivierung bereits höhergradige Fibrosestadien aufwiesen. Der Nachweis der Caspase-Aktivierung repräsentiert im Vergleich zur Transaminasen-Bestimmung damit einen sensitiven Biomarker, der es ermöglicht, bereits bei Patienten mit im Normbereich liegenden Transaminasen eine Leberschädigung zu detektieren (siehe auch Kommentare zu unserer Arbeit^{46,47}).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass wir unter Verwendung des o. g. ELISAs Caspase-Aktivierung auch bei Patienten mit akutem Leberversagen (ALF) verstärkt im Serum nachweisen konnten (Publikation 5, Seite 34).⁴⁸ Zum Nachweis von Nekrose im Serum wurde ein weiterer ELISA etabliert, der sowohl Caspase-gespaltene als auch ungespaltene Cytokeratin-18 (Gesamt-Cytokeratin-18) erkennt. Unter Verwendung beider Nachweisverfahren konnte somit eine vergleichende Analyse von apoptotischem und nekrotischem Zelltod bei diesen Patienten erfolgen. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit akutem Leberversagen, die eine spontane Remission zeigten, bereits am Tag der Klinikeinweisung signifikant höhere Caspase-Aktivität im Serum aufwiesen im Vergleich zu Patienten mit akutem Leberversagen, die keine spontane Remission zeigten, d.h. die verstarben oder transplantiert werden mussten. Zusammenfassend konnten wir neue Biomarker für das akute Leberversagen identifizieren, die durch die Unterscheidung von Apoptose und Nekrose äußerst frühzeitig auf den Krankheitsverlauf schließen lassen. Diese Daten bilden eine molekulare Grundlage für neue innovative diagnostische und therapeutische Strategien beim akuten Leberversagen.

2.3. Die Rolle von Caspasen in der HCV-vermittelten Leberverfettung

Ein gemeinsames Merkmal von Patienten mit chronischer HCV-Infektion ist die Leberzellverfettung – Steatose – welche mit einer erhöhten Leberschädigung und fortschreitender Fibrose assoziiert ist. Virale Faktoren und metabolische Komponenten wie Adipositas und Insulinresistenz, sowie zusätzliche toxische Einflüsse wie Alkoholkonsum scheinen in der Pathogenese der HCV-assoziierten Steatose eine Rolle zu spielen.⁴⁹⁻⁵³ Dagegen sind die Rolle der Apoptose und Caspasen in diesem Prozess bisher nur unzureichend bekannt. Wir haben deshalb die Caspase-Aktivierung bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion und unterschiedlich ausgeprägter Leberzellverfettung untersucht (Publikation 2, Seite 31).⁵⁴ Die Patienten wurden in eine Gruppe mit minimaler (< 10%), moderater (10-40%) und schwerer (> 40%) Leberverfettung eingeteilt. Die 3 Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich des BMI (body mass index), der histologischen Entzündungsaktivität (ISHAK A-D 5.2+/-0.2) und des Fibrosegrades (ISHAK F 1.2+/-0.1). Dadurch sollte eine von diesen Einflussfaktoren möglichst unabhängige Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Caspase-Aktivierung und dem Ausmaß der Leberverfettung erfolgen. In histologischen Untersuchungen dieser Patienten konnten wir zeigen, dass das Ausmaß der Leberverfettung mit der intrahepatischen Caspase-Aktivierung korreliert. Interessanterweise konnten wir nicht nur in Fett-transformierten Zellen, sondern auch in Hepatozyten mit normaler Morphologie eine erhöhte Caspase-Aktivierung detektieren. Die Detektion der serologischen Caspase-Aktivierung erfolgte einerseits mit Hilfe des zuvor beschriebenen ELISAs, über die Messung der Konzentration von Caspase-gespaltene CK-18. Als weitere Methode gelang es uns außerdem, ein Nachweissystem zu etablieren, das auf der luminometrischen Messung der Caspase-3/-7-Aktivität in Serumproben basiert. Bislang wird die proteolytische Aktivität von Caspasen in der Regel durch fluorimetrische oder kolorimetrische Verfahren ermittelt, die jedoch aufgrund des *Quenchings* des Signals durch Hämoglobin für Serumproben ungeeignet sind. Durch Verwendung eines luminogenen Substrats, welches nach Caspase-vermittelter Spaltung Lichtenergie emittiert, konnte dieses Problem gelöst werden. Durch den Einsatz beider Testverfahren konnte gezeigt werden, dass i) Patienten mit Leberverfettung eine signifikant höhere Caspase-Aktivierung gegenüber gesunden Kontrollpersonen im Serum aufweisen und dass ii) die Caspase-Aktivität im Serum mit der prozentualen Leberverfettung bei chronischer HCV-Infektion korreliert. Die enge Korrelation der Cytokeratin-18-Fragmente und aktivierter Caspasen lässt vermuten, dass die aktivierten Caspasen ebenso aus apoptotischen Hepatozyten und nicht aus Immunzellen ins Serum freigesetzt werden. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass im Gegensatz

zur Caspase-Aktivität die Messung der Transaminasen keine enge Korrelation zum Grad der Steatose aufwies, so dass offensichtlich auch in diesem Krankheitsbild der Nachweis von aktivierten Caspasen eine sensitivere Methode zur frühen Erfassung von HCV-vermittelten Leberschäden darstellt.

Die molekularen Mechanismen der Caspase-Aktivierung bei der HCV-vermittelten Leberverfettung sind noch weitestgehend unbekannt. Gegenwärtig werden mehrere Faktoren diskutiert, die die Caspase-Aktivierung und apoptotische Leberzellschädigung bei HCV-vermittelter Steatose wechselseitig beeinflussen. Beispielsweise führt oxidativer Stress im verfetteten Lebergewebe durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Produkten der Lipidperoxidation zur Steatohepatitis. Durch oxidativen Stress und der konsekutiven Entzündungsreaktion werden nicht nur pro-inflammatorische, sondern auch pro-apoptotische Zytokine wie CD95L freigesetzt, die zur Caspase-Aktivierung und Apoptose von Hepatozyten führen.⁵⁵ Die Phagozytose apoptotischer Hepatozyten durch ortsständige Makrophagen führt zur Aktivierung dieser Zellen mit Freisetzung von Faktoren, die die Fibroseentwicklung begünstigen bzw. initiieren.³⁶ Des Weiteren konnte *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell gezeigt werden, dass langkettige Fettsäuren anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2 inhibieren oder pro-apoptotische Mediatoren wie p53 oder Bax aktivieren.⁵⁶⁻⁵⁸ Somit ergibt sich eine Vielzahl von sich gegenseitig verstärkenden Mechanismen, die zur Caspase-Aktivierung und Hepatozytenapoptose bei Leberverfettung führen und schließlich die Entwicklung einer Leberfibrose begünstigen. Der Nachweis von aktivierten Caspasen im Serum repräsentiert möglicherweise ein einfaches Testverfahren, um frühzeitig Patienten mit Steatose/Steatohepatitis und somit einem Risiko der Entwicklung oder Progression einer Leberfibrose zu identifizieren. Des Weiteren könnte sich dieser Marker für das Monitoring der Therapieeffizienz (Rückbildung der Leberverfettung/-fibrose) eignen. In diesem Kontext ist interessant zu erwähnen, dass basierend auf unseren Daten eine weiterführende Studie veröffentlicht wurde, die zeigte, dass sich der serologische Nachweis von Caspase-gespaltenem CK18 als prognostischer Biomarker für die Krankheitsaktivität bei Patienten mit NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) eignet.⁵⁹

2.4. Die Bedeutung der Caspase-Aktivierung für das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion

In den vorangegangenen Studien haben wir gezeigt, dass Apoptose und Caspase-Aktivierung in der HCV-vermittelten Leberschädigung eine bedeutende Rolle spielen. Die Bedeutung der Caspase-Aktivierung für die Viruselimination bleibt jedoch unklar. Die Applikation von pegyliertem Interferon- α und Ribavirin ist gegenwärtig Standard der HCV-Therapie. Allerdings sprechen ca. 50% der Patienten mit dem häufig vorkommenden Genotyp I nicht auf diese Therapie an.^{26,27} Es ist von großer klinischer Relevanz, serologische Marker für den frühzeitigen Nachweis des Therapieansprechens zu finden, um Patienten vor den unerwünschten Nebenwirkungen einer potentiell ineffizienten Interferon-Therapie zu bewahren. Wir haben deshalb die Aktivierung von Caspasen im Serum von HCV-Patienten, die ein dauerhaftes Therapieansprechen zeigten, untersucht und mit der Caspase-Aktivität im Serum von Therapieversagern zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und während der Therapie mit Consensus-Interferon/Ribavirin verglichen (Publikation 3, Seite 32).⁶⁰ Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass die Caspase-Aktivierung im Serum HCV-infizierter Patienten, die auf die antivirale Therapie ansprachen, gegenüber therapierefraktären Patienten signifikant erhöht ist und mit der Viruselimination korreliert. Dabei ist interessant zu erwähnen, dass Patienten, die auf eine antivirale Therapie erfolgreich ansprachen, bereits vor Therapiebeginn eine verstärkte Caspase-Aktivierung zeigten, die vermutlich eine effiziente Immunantwort auf die HCV-Infektion reflektiert. Die Aktivierung von Caspasen scheint somit eine wichtige Rolle in der HCV-Elimination zu spielen. Mittels ROC-Analyse konnte ein Cut-Off-Wert der Caspase-Aktivität bestimmt werden, der bereits vor Therapie eine korrekte Vorhersage des Therapieansprechens mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 82% ermöglichte. Der Nachweis von Caspase-Aktivität könnte sich somit als prädiktiver Serum-Marker für das Therapieansprechen bei chronischer HCV-Infektion erweisen.

Die Apoptose-Signalwege, über welche Caspasen die Viruselimination beeinflussen, sind nur unzureichend bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Caspasen und andere pro-apoptotische Mediatoren ihre antivirale Rolle durch die Kontrolle der Replikation verschiedener Viren ausführen.^{61,62} Hierbei spielen vermutlich sowohl apoptotische als auch nicht-apoptotische Funktionen von Caspasen eine Rolle.⁶³ Caspasen können pro-inflammatorische Zytokine aktivieren, die für die HCV-Elimination von Bedeutung sind.^{64,65} Beispielsweise wird IL-18, auch als Interferon-gamma-induzierender Faktor bekannt, durch Caspasen aktiviert. Ähnlich

wie in dieser Arbeit für Caspase-Aktivierung gezeigt wurde, konnte auch für die IL-18-Aktivierung eine enge Korrelation mit der Viruselimination nachgewiesen werden.

Interferone (IFN), wie IFN-alpha, -beta und -gamma, stellen weitere wichtige Zytokine für die Viruselimination dar. Durch IFN wird über verschiedene molekulare Mechanismen, wie PKR- oder JAK/STAT-abhängige Signalwege, die Expression von proapoptotischen Molekülen wie TRAIL, CD95 und Caspasen induziert.⁶⁶⁻⁶⁸ In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass in unserem Kollektiv IFN-sensitive Patienten im Vergleich zu resistenten Patienten eine erhöhte Serumkonzentration von TRAIL aufwiesen (unveröffentlichte Daten). Es ist deshalb anzunehmen, dass Interferon zur TRAIL-vermittelten Caspase-Aktivierung und Apoptose virusinfizierter Leberzellen bei Interferon-sensitiven Patienten führt. Möglicherweise trägt bei IFN-resistenten Patienten eine ineffektive Immunantwort und konsekutive Apoptoseinduktion zur mangelnden Viruselimination bei.⁶⁹ In diesem Zusammenhang ist interessant zu erwähnen, dass bei therapierefraktären Patienten eine erhöhte Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 auf Hepatozyten nachgewiesen werden konnte.⁷⁰ Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine verminderte Expression anti-apoptotischer und verstärkte Expression pro-apoptotischer Moleküle zur Caspase-Aktivierung und Apoptose virusinfizierter Hepatozyten beitragen. Der serologische Nachweis von Caspase-Aktivierung könnte sich somit als sensitiver Biomarker für das Ansprechen auf eine antivirale Therapie erweisen. Somit könnten zukünftig Patienten vor den häufig unerwünschten Nebenwirkungen einer IFN-Therapie bewahrt und alternativen Therapiemöglichkeiten zugeführt werden.

In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass Apoptose-basierte Therapien kürzlich einen Einzug in die klinische Praxis erhielten. Ein therapeutischer Einsatz von z.B. Caspase-Inhibitoren, die gegenwärtig in Phase 2 bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion getestet werden, ist hierbei nicht nur für verschiedene Lebererkrankungen denkbar, sondern wird auch für degenerative Erkrankungen anderer Organsysteme in Erwägung gezogen.

2.5. Die Wirkung von TRAIL in der gesunden Leber und bei Lebererkrankungen

In der Elimination von Virus-infizierten und transformierten Zellen wird insbesondere dem TRAIL-TRAIL-Rezeptor-System eine bedeutende Rolle beigemessen. Die Besonderheit dieses Todesrezeptorsystems zeichnet sich dadurch aus, dass TRAIL im Gegensatz zu CD95L selektiv Apoptose in transformierten oder infizierten Zellen zu induzieren vermag, während sich gesunde Zellen als TRAIL-resistent erweisen.^{71,72} Dies zeichnet TRAIL als vielversprechendes neues Tumorthapeutikum aus, das im Gegensatz zu CD95L oder TNF keine Lebertoxizität erwarten lässt. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass TRAIL in primären humanen Hepatozyten (PHH) Apoptose induziert, wodurch der Einsatz von TRAIL bei Tumorpatienten in Frage gestellt wurde.⁷³⁻⁷⁶ Bisher bleibt jedoch unklar, ob sich die biologische Aktivität von TRAIL zwischen der Leber *in vivo* und isolierten Hepatozyten unterscheidet. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob Lebererkrankungen die Sensitivität gegenüber TRAIL beeinflussen. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation widmete sich deshalb der TRAIL-vermittelten Apoptose bei Lebererkrankungen wie der chronischen HCV-Infektion und der Leberverfettung (Publikation 4, Seite 33).⁷⁷

Wir haben zunächst die Effekte verschiedener Versionen von humanem rekombinantem TRAIL auf isolierte primäre humane Hepatozyten (PHH) untersucht. Unter Einsatz des oben beschriebenen luminometrischen Substrattests für den Nachweis aktivierter Caspase-3/-7 konnten wir eine verstärkte Caspase-Aktivierung in den isolierten Hepatozyten verzeichnen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit weiteren Publikationen, die zeigten, dass TRAIL in isolierten primären humanen Hepatozyten toxisch ist.^{73,78,79} Dabei wurde vermutet, dass die TRAIL-induzierte Toxizität in PHH auf die verwendete TRAIL-Version und auf die Zeit der Hepatozytenkultivierung vor der TRAIL-Behandlung zurückzuführen ist. Wir konnten zeigen, dass sich humane Hepatozyten 16 Stunden nach Isolation gegenüber verschiedenen TRAIL-Versionen (Histidin-, Leuzin-konjugiertes TRAIL sowie unkonjugiertes TRAIL) als sensitiv erweisen. Eine längere Kultivierung (> 24 h) primärer humaner Hepatozyten führte zum Verlust der Hepatozytenfunktion mit verminderter Sekretion von Albumin- und leberspezifischen Enzymen wie Cyp3A. Die verstärkte TRAIL-Sensitivität primärer humaner Hepatozyten 16 Stunden nach Isolation ist möglicherweise auf eine Stressgen-Induktion zurückzuführen, die zu einer erhöhten Apoptosesensibilisierung führt. Die fehlende TRAIL-Sensitivität von primären Hepatozyten, die über 4 Tage kultiviert wurden⁷⁹, ist vermutlich auf eine Entdifferenzierung der Hepatozyten mit verändertem Zellzyklusprofil zurückzuführen.^{80,81} Zusammengefasst erweisen sich primäre humane Hepatozyten als wenig

geeignet für *in vitro* Hepatotoxizitätsstudien. Darüber hinaus scheinen die toxischen Nebenwirkungen von TRAIL offensichtlich nicht auf isolierte PHHs beschränkt zu sein. Diverse Studien haben belegt, dass andere isolierte primäre Zellen, wie Prostata- und Schilddrüsen-Epithelzellen, mikrovaskuläre Endothelzellen, Keratinozyten und Hirnzellen auf eine TRAIL-Behandlung empfindlich reagieren.⁸²⁻⁸⁵

Wir haben deshalb ein Modell entwickelt, das uns ermöglicht, intaktes unfixiertes Lebergewebe ohne signifikante Gewebeschädigung zu kultivieren. Da im intakten unfixierten Lebergewebe eine rasche Dedifferenzierung und Induktion von Apoptose-relevanten Stressgenen nicht zu erwarten ist, bildet dieses neu etablierte *ex vivo* Leber-Modell im Gegensatz zu PHHs eine physiologische Grundlage für Hepatotoxizitäts-Analysen neuer Substanzen. Gesundes unfixiertes humanes Lebergewebe wurde in Kultur genommen und mit verschiedenen Versionen von TRAIL inkubiert. Danach wurde die Caspase-Aktivität und Apoptoserate im Lebergewebe immunhistochemisch analysiert. Wir konnten zeigen, dass im intakten Lebergewebe im Gegensatz zu CD95L (Positivkontrolle) *ex vivo* durch verschiedene TRAIL-Versionen keine signifikante Caspasen-Aktivierung und Apoptoserate induziert wird. Unsere Ergebnisse lassen deshalb vermuten, dass die o.g. phänotypischen Veränderungen der isolierten Hepatozyten für die Unterschiede in der TRAIL-Sensitivität zwischen diesen und dem intakten Lebergewebe verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Expression und intrazelluläre Verteilung von TRAIL-R2 oder FLIP, sich möglicherweise schnell während des Isolationsvorganges ändern.

Da sich über die Hälfte der bisher getesteten Tumorzellen als TRAIL resistent erweisen, ist eine Kombination mit TRAIL-sensibilisierenden Substanzen erforderlich, zu denen so genannte Histon-Deacetylase(HDAC)-Inhibitoren wie Depsipeptid zählen.⁸⁶⁻⁸⁹ Ob TRAIL in Kombination mit HDAC-Inhibitoren *in vivo* hepatotoxisch ist, bleibt jedoch unklar. Wir haben deshalb die Toxizität verschiedener TRAIL-Versionen in Kombination mit Depsipeptid im intakten, unfixierten gesunden Lebergewebe analysiert.

Gesundes unfixiertes humanes Lebergewebe wurde in Kultur genommen und mit verschiedenen Versionen von TRAIL mit und ohne Zusatz von Depsipeptid inkubiert. Danach wurde die Caspase-Aktivität und Apoptoserate im Lebergewebe immunhistochemisch analysiert. Mittels RT-PCR wurde eine vergleichende Expressionsanalyse pro- und anti-apoptotischer Moleküle zwischen Depsipeptid-behandeltem und unbehandeltem gesunden Lebergewebe vorgenommen. Wir konnten zeigen, dass im intakten gesunden Lebergewebe *ex vivo* durch die Kombination von TRAIL mit Depsipeptid im Gegensatz zur alleinigen TRAIL-Behandlung eine signifikante Caspase-Aktivierung und Apoptose induziert wird. Die durch

Depsipeptid induzierte TRAIL-Sensitivität im gesunden Lebergewebe konnte auf eine veränderte Expression von pro- und anti-apoptotischen Apoptose-Regulatoren wie TRAIL-Rezeptoren und Bcl-2-Moleküle zurückgeführt werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, dass Lebergewebe von Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen wie der chronischen Hepatitis C-Virus-Infektion und der Steatohepatitis im Gegensatz zu gesundem Lebergewebe eine erhöhte TRAIL-Sensitivität aufweist. Die Inkubation von entzündlich verändertem Lebergewebe mit den verschiedenen TRAIL-Versionen führte zu einer signifikanten Caspase-Aktivierung und Apoptose des Lebergewebes. Die verstärkte TRAIL-Sensitivität bei Leberverfettung und HCV-Infektion konnte dabei auf eine verstärkte Expression der agonistischen TRAIL-Rezeptoren sowie pro-apoptotischer Bcl-2-Moleküle (Bax, Puma, Noxa) und auf eine verminderte Expression anti-apoptotischer Regulatoren des intrinsischen (Bcl-2) und extrinsischen Signalweges (Flips/-1) zurückgeführt werden.

Diese Daten lassen vermuten, dass TRAIL bei Lebererkrankungen und in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in der gesunden Leber hepatotoxisch ist. Die Applikation von TRAIL bei Patienten mit chronisch entzündlichen Lebererkrankungen oder metabolischem Syndrom sowie der Einsatz von TRAIL mit weiteren Chemotherapeutika sollten deshalb unter engmaschigem Monitoring hinsichtlich einer potentiellen Hepatoxizität erfolgen (siehe auch Kommentar zu unserer Arbeit⁹⁰).

3. Literatur

1. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Brit Med Bull* 1997;53:451-465.
2. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
3. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Disturbance of apoptosis in the course of disease. *Biomedical Progress* 1999;12:75-80.
4. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986;7:115-119.
5. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99.
6. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
7. Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 1998;8:365-372.
8. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997 Apr 21;185(8):1481-6.
9. Robertson JD, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic cell death. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:491-6.
10. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998 Jun 1;12(11):1551-70.
11. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998 Aug 28; 281(5381):1312-6.
12. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999 Nov;6(11):1028-42.
13. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):817-27.
14. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997 Jul 18;272(29):17907-11.

15. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
16. Stroh C, Schulze-Osthoff K. Death by thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 1998;5:997-1000.
17. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal transduction: Lessons from knock-out mice. *Immunity* 1999;10:629-639.
18. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459.
19. Bantel H, Brüning T, Schulze-Osthoff K. Activation of caspases by death receptors. *Eur Cytokine Netw.* 1998;9:681-684.
20. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113.
21. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821.
22. Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004;14:359-372.
23. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57.
24. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998 Jun;1(7):949-57.
25. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-65S.
26. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
27. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.

28. Bantel H, Lügering A, Heidemann J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg CP, Manns MP, Schulze-Osthoff K. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004;40:1078-1087.
29. Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34:758-767.
30. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003;10:48-58.
31. Bantel H, Schulze-Osthoff K. Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 2003;10:48-58.
32. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997;99:1472-1477.
33. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:113-126.
34. Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996;110:1238-1243.
35. Mita E, Hayashi N, Ito S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:468-474.
36. Canbay A, Higuchi H, Bronk SF, Taninai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology* 2002;123:1323-1330.
37. Nakamoto Y, Kaneko S, Fan H, Momoi T, Tsutsui H, Nakanishi K, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-Fas ligand antibody therapy. *J Exp Med* 2002;196:1105-1111.
38. Bantel H, Ruck P, Gregor M, Schulze-Osthoff K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol* 2001;80:230-239.
39. Rouquet N, Pages JC, Molina T, Briand P, Joulin V. ICE inhibitor YVAD-cmk is a potent therapeutic agent against in vivo liver apoptosis. *Curr Biol* 1996;6:1192-1195.
40. Künstle G, Leist M, Uhlig S, Revesz L, Feifel R, MacKenzie A, Wendel A. ICE protease inhibitors block murine liver injury and apoptosis caused by CD95 or TNF-alpha. *Immun Lett* 1997;55:5-10.
41. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Cresnesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger P. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal

- normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 1999;13:253-261.
42. Woo M, Hakem A, Elia AJ, Hakem R, Duncan GS, Patterson BJ, Mak TW. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1999;163:4909-4916.
 43. Tassopoulos NC. Treatment of patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels. *J Hepatol* 1999;31:193-196.
 44. Marcellin P, Levy S, Erlinger S. Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology* 1997;26:133-136.
 45. Kronenberger B, Ruster B, Lee JH, Sarrazin C, Roth WK, Herrmann G, et al. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently normal or abnormal aminotransferase levels. *J Hepatol* 2000;33:640-647.
 46. Feldstein AE, Gores GJ. An apoptosis biomarker goes to the HCV clinic. *Hepatology*. 2004 Nov;40(5):1044-6.
 47. Foster GR. Apoptotic cell death: the caspase-cleavage "gold rush". *LANCET* 2005;365:1293-1294.
 48. Volkmann X, Anstaett M, Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology* 2008;47:1624-1633.
 49. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999;29:1215-1219.
 50. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*. 2001 Jun;33(6):1358-64.
 51. Monto A, Alonzo J, Watson JJ, Grunfeld C, Wright TL. Steatosis in chronic hepatitis C: relative contributions of obesity, diabetes mellitus, and alcohol. *Hepatology*. 2002 Sep;36(3):729-36.
 52. Lonardo A, Adinolfi LE, Loria P, Carulli N, Ruggiero G, Day CP. Steatosis and hepatitis C virus: mechanisms and significance for hepatic and extrahepatic disease. *Gastroenterology*. 2004 Feb;126(2):586-97.

53. Castera L, Hezode C, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Zafrani ES, Pawlotsky JM, et al. Worsening of steatosis is an independent factor of fibrosis progression in untreated patients with chronic hepatitis C and paired liver biopsies. *Gut* 2003;52:288-292.
54. Seidel N, Volkmann X, Laenger F, Flemming P, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 2005;42:113-120.
55. Bauer MK, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem* 1998;273:8048-8055.
56. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 2002;51:1437-1442.
57. Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, et al. p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004;279:20571-20575.
58. Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epand RM. Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. *Biochem J* 2004;377:509-516.
59. Wieckowska A, Zein N, Yerian L, Rocio Lopez A, McCullough A, Feldstein A. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; 44:27-33.
60. Volkmann X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;43:1311-1316.
61. Scheller C, Sopper S, Chen P, Flory E, Koutsilieri E, Racek T, et al. Caspase inhibition activates HIV in latently infected cells. Role of tumor necrosis factor receptor 1 and CD95. *J Biol Chem* 2002;277:15459-15464.
62. Cuconati A, Degenhardt K, Sundararajan R, Anselm A, White E. Bax and Bcl-2 function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J Virol* 2002;76:4547-4558.
63. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1453-1458.
64. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000 Feb;12(1):59-63.

65. Murata K, Yamamoto N, Kawakita T, Saito Y, Yamanaka Y, Sugimoto K, Shiraki K, Nakano T, Tameda Y. Up-regulation of IL-18 by interferon alpha-2b/ribavirin combination therapy induces an anti-viral effect in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*. 2005 Mar-Apr;52(62):547-51.
66. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999 Jul 15;163(2):920-6.
67. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 2001;31:3138-3146.
68. Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 1998;17:6888-6902.
69. Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001;284:1-12.
70. Anatol P, Danuta P, Janusz D, Bozena P. Expression of Bcl-2 protein in chronic hepatitis C: Effect of interferon alpha 2b with ribavirin therapy. *World J Gastroenterol* 2005;11:2949-2952.
71. Sträter J, Walczak H, Pukrop T, von Müller L, Hasel C, Kornmann M, Mertens T, Möller P. TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 2002;122:659-666.
72. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999;163:920-926.
73. Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2006;6:564-567.
74. Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60:6259-6265.
75. Lin T, Gu J, Zhnag L, Huang X, Stephens LC, Curley SA, et al. Targeted expression of green fluorescent protein/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand fusion

- protein from human telomerase reverse transcriptase promotor elicits antitumor activity without toxic effects on primary human hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:3620-3625.
76. Armeanu S, Lauer UM, Smirnow I, Schenk M, Weiss TS, Gregor M, et al. Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes. *Cancer Res* 2003;63:2369-2372.
77. Volkmann X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, MacFarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* 2007;46:1498-1508.
78. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* 2001;7:383-385.
79. Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Buchler P, Haas TL, et al. Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res* 2006;12:2640-2646.
80. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Nanhacke T, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 2006;7:629-660.
81. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes-past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:223-133.
82. Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, et al. Human brain-cell death induced by tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet* 2000;356:827-828.
83. Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:1135-1140.
84. Bretz JD, Mezosi E, Giordano TJ, Gauger PG, Thompson NW, Baker JR Jr. Inflammatory cytokine regulation of TRAIL-mediated apoptosis in thyroid epithelial cells. *Cell Death Differ* 2002;9:274-286.
85. Li JH, Kirkiles-Smith NC, McNiff JM, Pober JS. TRAIL induced apoptosis and inflammatory gene expression in human endothelial cells. *J Immunol* 2003;171:1526-33.

86. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Discov* 2006;5:769-784.
87. MacFarlane M, Inoue S, Majid A, Harper N, Kennedy DBJ, Dyer MJS, et al. Chronic lymphatic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death Differ* 2005;12:773-782.
88. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, et al. Inhibitors of histone deacetylase induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005;11:71-76.
89. Inoue S, Mai A, Dyer MJ, Cohen GM. Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 2006;66:6785-6792.
90. Malhi H. TRAILs and tribulation. *Hepatology* 2007;46:1320-1322.

4. Einzelarbeiten

Publikation 1: “Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury.”

Autoren: Bantel H, Lügering A, Heidemann J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg CP, Manns MP, Schulze-Osthoff K.

Publiziert in: Hepatology, 40 (2004), Seiten 1078-1087.

Diese Publikation ist in der vorliegenden Dissertation nicht enthalten, da die Publikationsrechte beim Verlag liegen.

Publikation 2: “The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum.”

Autoren: Seidel N, Volkmann X, Laenger F, Flemming P, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H.

Publiziert in: Hepatology, 42 (2005), Seiten 113-120.

Diese Publikation ist in der vorliegenden Dissertation nicht enthalten, da die Publikationsrechte beim Verlag liegen.

Publikation 3: “Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection.”

Autoren: Volkmann X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H.

Publiziert in: Hepatology, 43 (2006), Seiten 1311-1316.

Diese Publikation ist in der vorliegenden Dissertation nicht enthalten, da die Publikationsrechte beim Verlag liegen.

Publikation 4: “Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver.”

Autoren: Volkmann X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, MacFarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H.

Publiziert in: Hepatology, 46 (2007), Seiten 1498-1508.

Diese Publikation ist in der vorliegenden Dissertation nicht enthalten, da die Publikationsrechte beim Verlag liegen.

Publikation 5: “Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure.”

Autoren: Volkmann X, Anstaett M, Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H.

Publiziert in: Hepatology, 47 (2008), Seiten 1624-1633.

Diese Publikation ist in der vorliegenden Dissertation nicht enthalten, da die Publikationsrechte beim Verlag liegen.

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AIF	Apoptosis inducing factor
ALF	Acute liver failure
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-xL	Apoptosis regulator Bcl-x (Bcl-2-like 1 protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2 gene
Bid	BH3 interacting domain death antagonist
BMI	Body Mass Index
CD95L	CD95-Ligand
CK18	Cytokeratin 18
CYP3A	Cytochrom P450-Subfamilie 3A
DIABLO	Direct IAP binding protein
DISC	Death inducing signaling complex
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas associated protein with death domain
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
h	Stunde
HCV	Hepatitis C-Virus
HRP	Horse radish peroxidase
HDAC	Histondeacetylase
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Janus kinase
kD	Kilodalton
MDM-2	murine double minute Gen 2
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PARP	Poly-ADP-ribosylpolymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PHH	Primäre Humane Hepatozyten
PKR	ds RNA-abhängige Proteinkinase
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
ROC	Receiver operating characteristics
RT-PCR	Real time-PCR

Smac	Second mitochondrial activator of caspases
sog	sogenannten
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor

Publikationen**Veröffentlichungen**

Bantel H, Lügering A, Heidemann J, **Volkman X**, Poremba C, Strassburg CP, Manns MP, Schulze-Osthoff K. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology* 2004;40:1078-1087.

Seidel N, **Volkman X**, Laenger F, Flemming P, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *Hepatology* 2005;42:113-120.

Volkman X, Cornberg M, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Caspase activation is required for antiviral treatment response in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2006;43:1311-1316.

Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, MacFarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* 2007;46:1498-1508.

Volkman X, Anstaett M, Hadem J, Stiefel P, Bahr MJ, Lehner F, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology* 2008;47:1624-1633.

Posterpräsentationen

Volkman X, Michael P. Manns, Klaus Schulze-Osthoff, Heike Bantel (2004) Caspase activation is required for virus elimination in chronic HCV infection. *in*: 12th Euroconference on apoptosis, Chania, Griechenland.

Volkman X, Michael P. Manns, Klaus Schulze-Osthoff, Heike Bantel (2005) A novel apoptotic biomarker for sera from patients with chronic HCV infection reveals association of caspase activation with cryptic fibrotic injury. *in*: Drug Discovery Conference, London, England.

Volkman X, Nicole Seidel, Michael P. Manns, Klaus Schulze-Osthoff, Heike Bantel (2005) The extent of liver steatosis in chronic hepatitis C virus infection is mirrored by caspase activity in serum. *in*: 13th Euroconference on apoptosis, Budapest, Ungarn.

Volkman X, Michael P. Manns, Klaus Schulze-Osthoff, Heike Bantel (2006) Isolated human hepatocytes but not hepatocytes in human liver explants are sensitive to TRAIL. *in*: 14th Euroconference on apoptosis, Chia, Sardinien.

Volkman X, Michael P. Manns, Klaus Schulze-Osthoff, Heike Bantel (2006) TRAIL is required for virus elimination in chronic HCV infection. *in*: 1st Workshop on “The immune response against dying tumor cells”, Paris, Frankreich

Lebenslauf

Name Xandra Volkmann
Anschrift Lessingstrasse 67
39108 Magdeburg
Geburtsdatum 21.04.1978
Geburtsort Halle (Saale)

Schulische und berufliche Ausbildung

1984 – 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule
1991 – 1996 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Halle (Saale)
1996 – 2003 Studium der Diplom-Biologie an der Martin-Luther-Universität
Halle /Wittenberg
März 2003 Abschluss des Studiums mit der Diplomarbeit. Thema: „Konstruktion
eines Expressionssystems zur heterologen Genexpression in
Kluyveromyces lactis“
08/2003-12/2007 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover in der
Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie unter der
Leitung von PD Dr. H. Bantel, in Betreuung durch die Universität
Hannover, Prof. Dr. M.Gaestel, Institut für Physiologische Chemie

Berufliche Erfahrungen

09/00 – 10/00 Berufsorientiertes Praktikum am Umweltforschungszentrum (UFZ)
Leipzig-Halle. Thema: „Selektion von stress-induzierbaren Promotor-
Fusionen in *Comamonas acidovorans*“
12/00 – 05/01 Studentische Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg. Thema: “Produktion von biopolymeren Proteinen in
Bakterien und Hefen”
05/02 – 03/03 Studentische Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg. Thema: „Technologien für die industrielle
Produktion von rekombinanten Proteinen”

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die praktischen Arbeiten wurden im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heike Bantel in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie an der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Magdeburg, 1.Oktober 2008