

Charakterisierung des Hepatitis C Virus NS5A-Proteins als funktionalen Inhibitor der Interferon induzierten antiviralen Immunantwort

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



vorgelegt von
Stefan Taube, M.Sc. B.Sc.
aus Berlin

November 2005

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

Erster Gutachter: Prof. E. Schreier
Zweiter Gutachter: Prof. R. Mutzel

Tag der Verteidigung: 03-Feb-2006

Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle. Es ist das Grundgefühl, das an der Wiege von wahrer Kunst und Wissenschaft steht. Wer es nicht kennt und sich nicht mehr wundern, nicht mehr staunen kann, der ist sozusagen tot und sein Auge erloschen.

Albert Einstein – um 1930

Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Familie, die mir in jeder Lage den Rücken frei gehalten hat, meiner Frau Barbara und meiner Tochter Johanna.

Prof. E. Schreier danke ich recht herzlich für seine intensive fachliche und menschliche Betreuung, seine Geduld bei allen Fragen und Problemen, für seinen Einsatz gegenüber allen seinen Mitarbeitern und seine stete umfangreiche Diskussionsbereitschaft.

Prof. R. Mutzel danke ich für die externe Betreuung meiner Doktorarbeit für die Freie Universität Berlin.

Hep-Net danke ich für die Finanzierung dieses Projektes und den Hep-Net Mitarbeitern Frau S. Meyer und Frau C. Zapf für die freundliche Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt den lieben Kollegen und Stützen der AG-Schreier: Dr. Andreas Mas Marques, Bernd Vollnberg, Birthe Müller, Daniela Gutt, Dr. Djin-Ye Oh, Heidrun Linke, Heidrun Roeske, Kathrin Stanossek, Dr. Marina Höhne, Monika, Wolf, Paula Silva, Dr. Sabine Diedrich, Sonja Zimmermann und Ute Pätzold.

PD Dr. T. Berg und Dr. T. Müller möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die enge Kooperation im Hep-Net-Projekt, sowie für die Bereitstellung der HCV-Seren und Patientendaten danken.

Prof. H. Hengel hatte immer eine offene Tür für alle diejenigen, die seinen Rat suchten. Vielen Dank für die rege Anteilnahme an diesem der CMV-Forschung doch entlegenen Projekt. Die Bereitstellung von M27 als Positivkontrolle für die ISRE-Reporterassays war eine grosse Hilfe.

An dieser Stelle möchte ich auch der gesamten AG Hengel danken, insbesondere Mirko Trilling hat viel seiner Zeit investiert und ohne seine Hilfe wären die EMSAs nicht zu Stande gekommen. Khanh Le danke ich für das p-125-Luc^{neo}-Plasmid. Dr. A. Zimmermann möchte ich für die vielen interessanten Diskussionen danken, die mich jedesmal motiviert haben und bei denen ich viel gelernt habe.

PD Dr. M Lu möchte ich sehr herzlich für die interessanten Ideen und Diskussionen danken, sowie der Einladung nach Essen, um die Proben im Makroarray durchzutesten. Dr. S. Guan danke ich sehr herzlich für die Einarbeitung in die Makroarrays. Weiterer Dank geht an die Essener Kollegen Prof. M. Roggendorf, Dr. S. Viazov und M. aus dem Siepen für die Kooperation im Rahmen von Hep-Net.

PD Dr. T. Wolff möchte ich für meine Zeit bei der NG2 danken, hier habe ich sehr viel lernen können. Vielen Dank auch für die Bereitstellung von Plasmiden, insbesondere dem NS1-Expressionsplasmid, Zelllinien und Virusstocks. Herzlichst gedankt sei hier auch den Mitarbeitern der NG2 und insbesondere Gudrun Heins für ihre grosse Hilfsbereitschaft.

Dr. T. Buerckstuemmer danke ich für das exzellente anti-HCV-NS5A Serum.

PD. Dr. E. Mühlberger möchte ich sehr herzlich für die Bereitstellung des VP35 Expressionsvektors danken, Dr. J.-I. Miyazaki für den erstklassigen Expressionsvektor pCAGGS und Dr. T. Fujita für den IFN- β Reporter p-125-Luc.

Zu guter Letzt möchte ich den zahlreichen Mitarbeitern, Kollegen, Korrekturlesern und Freunden danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier namentlich leider keinen Platz mehr gefunden haben.

Zusammenfassung

Zur Therapie der chronischen Hepatitis C wird derzeit pegyliertes Interferon (IFN)- α in Kombination mit dem Nukleosidanalogue «Ribavirin» eingesetzt. Der Erfolg der Kombinationstherapie ist stark genotypabhängig. Derzeit sind etwa 40 % der Genotyp-1 und 70–80 % der Genotyp-2/3 Patienten in der Lage, das Virus nachhaltig zu eliminieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Resistenz von HCV gegenüber der antiviralen IFN-Therapie untersucht. Als Grundlage zur molekularen Charakterisierung dienten Seren von 9 Patienten mit den HCV-Genotypen 1a/b und 3, die im Rahmen von klinischen Studien charakterisiert wurden. Der Fokus dieser Arbeit wurde auf das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) gelegt.

Mit Hilfe von funktionalen Reporterassays wurde der Einfluss von insgesamt 14 verschiedenen NS5A-Proteinen untersucht. Hierbei wurden Isolate der HCV-Genotypen 1a, 1b und 3a von Patienten mit unterschiedlichem Therapieansprechen (*non-response (NR)*, *sustained virologic response (SVR)* und *breakthrough (BT)*) analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass NS5A IFN-Signaling funktional durch Inhibition des Transkriptionsfaktors p48 (IRF-9) inhibieren kann. Alle 14 NS5A-Proteine waren in der Lage *IFN-stimulated response element (ISRE)*-vermittelte Genexpression zu inhibieren. Dieser Effekt ist somit unabhängig vom Therapieansprechen des Patienten und vom viralen Genotyp. Co-Expression von p48 führte zu einer Wiederherstellung des IFN-Signaling in NS5A-transfizierten Zellen, nicht aber in Zellen, die mit dem IFN-Antagonisten M27 transfiziert wurden.

Mutagenesestudien zeigten, dass die funktionale Domäne für diese Inhibition auf den N-terminalen 238 Aminosäuren von NS5A liegt und weder die putative ISDR, PKR oder V3-Region hierbei involviert sind. Die N-terminalen Deletionsmutanten NS5A-239–451 und 279–451 zeigten keinen Einfluss auf Typ-1-IFN vermitteltes Signaling.

Ein Effekt auf IFN-Induktion wurde ebenfalls beobachtet, verhielt sich aber im Vergleich zu bekannten Antagonisten dieser Signalkaskade, wie z.B. dem Influenza A Protein «NS1» und dem Ebola Protein «VP35» sehr viel schlechter.

Eine biologische Relevanz konnte mit Hilfe der IFN-sensitiven Rekombinante des Influenza A-Virus «delNS1» gezeigt werden. NS5A war hierbei in der Lage, Viruswachstum in IFN-kompetenten MDCK2-Zellen wiederherzustellen. Somit kann NS5A den IFN-Antagonisten NS1 funktional komplementieren.

Insgesamt unterstützt diese Arbeit die Beobachtung, dass NS5A in der Lage ist, IFN-*Signaling* zu inhibieren. Es wurde erstmalig gezeigt, dass NS5A p48 (IRF-9) inhibieren kann und somit ISRE-abhängige Genexpression blockiert wird.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Zusammenfassung	iii
Abkürzungsverzeichnis	ix
I Einleitung	1
I.1 Hepatitis C	1
I.2 Epidemiologie	1
I.2.1 Prävalenz	1
I.2.2 Übertragung	2
I.3 Pathogenese	2
I.3.1 Tropismus	3
I.3.2 Immunantwort	3
I.4 Behandlung und Prävention	3
I.4.1 Therapie der CHC	3
I.4.2 Prognostische Faktoren der IFN-Therapie	4
I.4.3 Therapie der akuten HCV-Infektion	5
I.4.4 Alternative Therapieansätze	5
I.5 Molekularbiologie des HCV	6
I.5.1 Phylogenetische Klassifizierung	6
I.5.2 Morphologie	6
I.5.3 Quasispezies und Virusdynamik	6
I.5.4 Genotypen	7
I.6 Genomorganisation	8
I.6.1 Core	9
I.6.2 E1/E2	10
I.6.3 NS2	11
I.6.4 NS3	11
I.6.5 NS4A/B	11
I.6.6 NS5A	12
I.6.7 NS5B	15
I.7 HCV-Replikation	15
I.7.1 Zellkultur	15
I.7.2 HCV-Replikon	15
I.7.3 HCV-Pseudopartikel (HCVpp)	16
I.7.4 Tiermodell	16
I.7.5 Modell zur HCV-Replikation	17
I.8 Das Immunsystem	18

I.9	Interferon	19
I.9.1	Typ-1-IFN	19
I.9.2	Typ-2-IFN	22
I.10	Antivirale Wirkungsweise von IFN	23
I.10.1	dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR)	23
I.10.2	2'-5'-Oligoadenylatsynthase (OAS)	23
I.10.3	Mx-Proteine	24
I.10.4	ADAR1	24
I.10.5	iNOS	24
I.11	Inhibition der IFN-Antwort	25
I.12	Virale IFN-Antagonisten	25
I.13	HCV und das IFN-System	26
I.14	Zielstellung	31
II	Materialien	33
II.1	Antibiotika	33
II.2	Primär Antikörper	33
II.3	Sekundär Antikörper	33
II.4	Chemikalien	34
II.4.1	Standard Puffer und Lösungen	36
II.5	DNA-modifizierende Enzyme	39
II.6	Sonstige Enzyme	39
II.7	Radiochemikalien	39
II.7.1	Sonstiges	40
II.8	Zellkultur	40
II.9	Medien & Puffer	41
II.9.1	Medien für Bakterienkulturen	41
II.9.2	Medien für Zellkultur	41
II.10	Plasmide	42
II.10.1	Expressionsvektoren	42
II.10.2	Reporterplasmide	42
II.11	Oligonukleotide	43
II.11.1	Kommerzielle Oligonukleotide	43
II.11.2	HCV-Oligonukleotide	43
II.11.3	Sonstige Oligonukleotide	44
II.11.4	EMSA-Sonden	44
II.12	Organismen und biologisches Material	45
II.12.1	Bakterienstämme	45
II.12.2	Eukaryontische Zelllinien	45
II.12.3	Patientenseren	45
II.12.4	Viren	45
III	Methoden	47
III.1	Nukleinsäuretechniken	47
III.1.1	Präparation von Nukleinsäuren	47
III.1.2	Enzymatische Reaktionen	48
III.1.3	Nukleinsäureamplifikation	49

III.1.4	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	52
III.2	Mikrobiologische Methoden	52
III.2.1	Anzucht von Bakterien	52
III.3	Proteinchemische Methoden	53
III.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
III.3.2	Immundetektion von Proteinen (Westernblot)	54
III.3.3	Bestimmung von Proteinmengen mittels Bradford-Reagenz	55
III.4	Reporterassays	56
III.4.1	IFN- β -Reporterassay	56
III.4.2	ISRE-Reporterassay	56
III.4.3	Luciferaseassay	57
III.4.4	Betagalaktosidaseassay	57
III.5	<i>Electromobility Shift Assay</i> (EMSA)	57
III.5.1	Herstellen der Sonde	58
III.5.2	Herstellen der Lysate	58
III.5.3	<i>Shift-</i> und <i>Supershift</i> -Reaktion	59
III.5.4	Native PAGE	59
III.6	Gewebekultur	59
III.7	Virologische Methoden	62
III.7.1	Hämagglutinationstest	62
III.7.2	Infektion von Kulturzellen mit dem Influenza A-Virus	62
III.7.3	Virusanzucht von Influenza A im embryonierten Hühnerei	62
III.7.4	Influenza A Titerbestimmung (Plaquetest)	63
III.7.5	HCV-Genotypbestimmung	64
III.7.6	HCV-Titerbestimmung	64
IV	Ergebnisse	65
IV.1	Vorbereitung	65
IV.1.1	Klonierung von NS5A	66
IV.1.2	Nachweis der NS5A-Expression	69
IV.2	Reporterassay zum Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion	70
IV.2.1	Etablierung eines IFN- β -Reporterassays	70
IV.2.2	Titration von NS5A im IFN- β -Reporterassay	71
IV.2.3	Screening verschiedener NS5A-Klone im IFN- β -Reporterassay	73
IV.3	Reporterassays zum Einfluss von NS5A auf Typ-1 IFN-Signaling	75
IV.3.1	Etablierung eines ISRE-Reporterassays	75
IV.3.2	Kinetik der IFN- β -Stimulation im ISRE-Reporterassay auf 293T-Zellen	75
IV.3.3	Titration von NS5A im ISRE-Reporterassay	78
IV.3.4	Screening verschiedener NS5A-Klone im ISRE-Reporterassay	80
IV.3.5	Co-Expression von p48 im ISRE-Reporterassay	82
IV.4	Gelshiftassay zur Untersuchung zum Einfluss von NS5A auf die ISRE-Bindung von ISGF3	85
IV.5	Untersuchung von NS5A-Deletionsmutanten	86
IV.5.1	Design und Klonierung der NS5A-Deletionsmutanten	86
IV.5.2	Screening von NS5A-Deletionsmutanten im ISRE-Reporterassay	88

IV.6 NS5A stellt virales Wachstum von delNS1 wieder her	93
V Diskussion	95
V.1 Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion	96
V.2 Einfluss von NS5A auf IFN-Signaling	96
V.3 NS5A inhibiert die Promotorbindung von ISGF3	98
V.4 Mutagenesestudien	99
V.5 Biologische Relevanz	100
V.6 IFN-Antagonismus und die Konsequenzen für die antivirale Therapie . . .	100
V.7 HCV und das IFN-System	102
V.8 Ausblick und Perspektiven	103
Literatur	105
A Anhang	131
A.1 Übersicht viraler IFN-Antagonisten	131
A.2 Sequenzdaten und Alignments	133
A.2.1 Aminosäuresequenzen der NS5A-Klone	133
A.2.2 Aminosäurealignment der NS5A-Deletionsmutanten	140
A.2.3 Weitere Sequenzdaten	143
A.2.4 Sequenz des p48-cDNA-Klons	143

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
acc.	PubMed <i>Accession Number</i>
ADAR1	RNA-spezifische Adenosindeaminase
ASFV	Afrikanisches Schweinefiebertivirus
ATP	Adenosinetriphosphat
AV	Adenovirus
bp	Basenpaare
BRSV	Bovines Respiratorisches Syncytialvirus
BSA	Rinderserumalbumin – <i>Bovine Serum Albumin</i>
BT	<i>Breakthrough</i>
CBP	CREB bindendes Protein
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
CHC	chronische Hepatitis C
Ci	Curie
CIAP	alkalische Phosphatase – <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CPE	zytopathischer Effekt – <i>Cytopathic Effect</i>
DC	Dendritische Zellen
delNS1	rekombinantes Influenza-Virus ohne NS1
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelstrang
EBV	Epstein-Barr-Virus
eIF	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETR	<i>End-of-Treatment-Response</i>
FSME	Frühsommer Meningitis Virus
GAF	<i>Gamma Activated Factor</i>
GAS	<i>Gamma Activated Site</i>
GBV C	GB Virus C, auch als Hepatitis-G-Virus (HGV) bezeichnet
gp	Glykoprotein
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound 2</i>
h	Stunden
HAV	Hepatitis-A-Virus

HBV	Hepatitis-B-Virus
hCMV	humanes Zytomegalievirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCVpp	HCV-Pseudopartikel
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPIV	humanes Parainfluenzavirus
HPV	humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HVR	Hypervariable Region
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
iNOS	induzierbare Stickstoff Synthase – <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRF	<i>IFN-Response Factor</i>
ISDR	<i>IFN sensitivity determining region</i>
ISG	<i>IFN-Stimulated Gene</i>
ISGF3	<i>IFN-Stimulated Growth Factor 3</i>
ISRE	<i>IFN-Stimulated Response Element</i>
IU	<i>International Units</i>
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LiPA	<i>Line Probe Assay</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Protein Kinase
mCMV	murines Zytomegalievirus
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPV	murines Polyomavirus
MW	Molekulargewicht – <i>Molecular Weight</i>
NANBH	Non-A-Non-B-Hepatitis
NAT	Nukleinsäure-Amplifikationstechniken
NK	Natürliche Killerzellen
NLS	Kernimportsignal – <i>Nuclear Localisation Signal</i>
NR	<i>non-response</i>
nt	Nukleotide
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthase
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster – <i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerasekettenreaktion – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEG-IFN-α	pegyliertes Interferon- α
PePHD	PKR/eIF2 α <i>Phosphorylation Homology Domain</i>
PFU	<i>Plaque Forming Units</i>
p.i.	<i>Post Infection</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
PKA	Protein Kinase A
PKR	Protein Kinase R
poly(I:C)	Polyinosine-Polycytidylic Acid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PV	Poliovirus
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
ReV	Reovirus
RKI	Robert Koch-Institut
RLU	rohe Lichteinheiten – <i>Raw Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
RoV	Rotavirus
rpm	Umdrehungen pro Minute – <i>Revolutions per Minute</i>
RSV	Respiratorisches Syncytial Virus
RT	Reverse Transkriptase
Rt	Raumtemperatur
s	Sekunde
SeV	Sendai-Virus
siRNA	<i>Short-Interfering-RNA</i>
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signalling</i>
ss	Einzelstrang
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SV5	Simian-Virus-5
SVR	<i>Sustained Virologic Response</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
UTR	nicht-translatierten Region – <i>Untranslated Region</i>
vol.	Volumen
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
VV	Vacciniavirus
w/v	Gewicht pro Volumen – <i>Weight per Volume</i>

