

I

Einleitung

I.1 Hepatitis C

Hepatitis C ist eine virale Infektion der Leber, die bis zu ihrer Entdeckung 1989 (Choo et al., 1989) als parenteral übertragene Non-A-Non-B-Hepatitis (NANBH) klassifiziert wurde. Das Hepatitis-C-Virus (HCV) besitzt ein ca. 9,6 kb großes Einzelstrang-RNA (ssRNA)-Genom in positiver Orientierung und wird seit 1991 als eigenständiges Genus „Hepacivirus“ den *Flaviviridae* zugeordnet.

Die chronische Hepatitis C (CHC)-Infektion kann nach langjährigem, oft asymptomatischem Krankheitsverlauf Leberzirrhose hervorrufen und zur Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms führen. Das Virus ist stark wirtsspezifisch und befällt nur Menschen und Schimpansen. Derzeit ist es nicht möglich, HCV effizient in Zellkultur oder im Kleintiermodell zu replizieren. Das Virus ist sehr variabel und eine protektive Immunität konnte bisher nicht gezeigt werden. Eine Impfung gegen HCV ist derzeit nicht möglich.

Standardtherapie der HCV-Infektion ist die Gabe von PEG-Interferon- α (PEG-IFN- α) plus Ribavirin. Der Therapieerfolg ist stark vom viralen Genotyp abhängig. Interferon (IFN) ist ein Zytokin mit antiviralen Eigenschaften und eine essentielle Komponente der angeborenen Immunität. Viele Viren, insbesondere RNA-Viren, haben verschiedene Strategien entwickelt, IFN zu antagonisieren, um somit der initialen Immunantwort des Wirtes zu entgehen.

I.2 Epidemiologie

I.2.1 Prävalenz

HCV ist die häufigste Ursache der chronischen Hepatitis, der Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms (Lauer und Walker, 2001). Schätzungen zufolge gibt es weltweit ca. 123 Millionen HCV-Träger, dies entspricht ca. 2 % der Weltbevölkerung (Shepard et al., 2005). Im Vergleich zum humanen Immundefizienzvirus (HIV) sind dies etwa dreimal so viele Virusträger. Jährlich kommen etwa 3–4 Millionen Neuinfektionen hinzu. In Deutschland wird von einer Prävalenz von 0,5–0,6 % (500.000 HCV-Träger) bei ca. 7000 Neuinfektionen pro Jahr ausgegangen (Palitzsch et al., 1999; Radun und Hamouda, 2004).

I.2.2 Übertragung

HCV wird hauptsächlich durch direkten Kontakt mit humanem Blut übertragen. Speziell nosokomiale Infektionen haben zur Verbreitung von HCV beigetragen. Da das Virus erst 1989 entdeckt und ein Screening der Blutkonserven erst Anfang der 90iger Jahre eingeführt werden konnte, ist ein Großteil der HCV-Infektionen bis zu diesem Zeitpunkt auf kontaminierte Blutprodukte zurückzuführen. Durch die Einführung der Untersuchung von Blutprodukten auf HCV-Kontamination 1990 sank die Zahl transfusionsassoziiertes HCV-Infektionen erheblich (Löwer, 1998). In Deutschland werden Blutprodukte seit 1999 durch Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) u.a. auf HCV-Kontamination untersucht. Trotz eines verbleibenden Restrisikos von 1: 1.000.000 (Offergeld et al., 2003), ist seit Einführung des Screenings kein deutscher Fall einer HCV-Infektion durch kontaminierte Blutprodukte vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) bestätigt worden. Auch nosokomiale Infektionen treten aufgrund der üblichen hohen Hygienestandards nur sporadisch auf.

Ein Großteil der HCV-Infektionen (etwa 20–50 %) ist immer noch unbekanntes Ursprungs (Haushofer et al., 2001; Heintges und Wands, 1997; Zeuzem et al., 1996). Den Hauptübertragungsweg stellt heute die Mehrfachbenutzung von Spritzbesteck bei i.v.-Drogenabhängigen dar. Eine sexuelle, sowie eine vertikale Mutter-Kind-Übertragung ist möglich, bezogen auf die anderen Übertragungswege ist das Risiko jedoch sehr gering (Meisel et al., 1995; Polywka et al., 1997).

Einzelne Unfälle haben in der Vergangenheit zur einer lokalen Verbreitung von HCV beigetragen. So hat eine groß angelegte parenterale Therapie gegen Schistosomie in Ägypten in den Jahren 1960 bis 1980, vermutlich durch schlecht durchgeführte Sterilisation des wieder benutzbaren Injektionsbestecks, die HCV-Inzidenz in dem Land versechsfacht (Frank et al., 2000). Ende der 70iger Jahre kam es unabhängig von einander im Rahmen einer Anti-D Immunprophylaxe in der DDR (Dittmann et al., 1991; Meisel et al., 1995; Wiese et al., 2000) und in Irland (Power et al., 1995) zu HCV-Infektionen von ca. 2500 bzw. 800 schwangeren Müttern.

I.3 Pathogenese

Nach einer Inkubationszeit von ca. 2–26 Wochen, führt die akute Infektion bei ca. 25 % der Erkrankten zu grippeähnlichen Symptomen, Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden und auch zur Gelbsucht (30 %). Meist verläuft diese jedoch asymptomatisch. Eine spontane Ausheilung wird bei ca. 25 % angenommen (CDC, 1998). Bis zu 75–80 % der akut HCV-Infizierten entwickeln eine CHC. Über einen Zeitraum von 20–30 Jahren kommt es dann bei etwa 10–20 % der chronisch Erkrankten zu einer Leberzirrhose und bei ca. 1–5 % zu einem hepatozellulären Karzinom.

Die CHC wird als Hauptursache für Leberkrebs angegeben und stellt die häufigste Indikation für eine Lebertransplantation dar (Montalbano und Neff, 2005).

Die Pathogenese einer HCV-Infektion wird durch verschiedene virale, sowie Wirtsfaktoren beeinflusst. Zu den entscheidenden viralen Faktoren zählen vor allem der virale Genotyp, Viruslast und Variabilität der Quasispezies (siehe I.5.3). Auf Wirtsseite ist die initiale Immunantwort von zentraler Bedeutung (siehe I.3.2), aber auch genetische Faktoren des Wirtes können einen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die antivirale Therapie nehmen (Mueller et al., 2004; Mosley et al., 2005).

I.3.1 Tropismus

Der Tropismus von HCV ist immer noch nicht vollständig geklärt. HCV repliziert zwar primär in der Leber, wo Virustiter von 10^8 bis 10^{11} RNA-Kopien pro Gramm Gewebe nachgewiesen wurden, dennoch sind hier nur 5–19 % der Hepatozyten HCV-positiv (Nouri-Aria et al., 1995).

Genomische HCV-RNA konnte auch in hämatopoetischen Zellen, speziell in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nachgewiesen werden (Lerat et al., 1996; Wang et al., 1992). Hierbei konnten signifikante Unterschiede in der HCV-Quasispeziespopulation (siehe I.5.3) in der Leber, im Serum und in PBMCs nachgewiesen werden. Beobachtungen, dass die Quasispeziesverteilung in gleichen Kompartimenten verschiedener Patienten ähnlicher ist, als die in verschiedenen Kompartimenten des gleichen Patienten (Fernandez-Gutierrez et al., 1999), zeigen, dass der Tropismus von HCV einen selektiven Einfluss auf die Virusvermehrung ausübt. Die Viruslast im Serum und der Leber korrelieren, so dass der im Serum gemessene Virustiter ebenfalls die intrahepatische HCV-Replikation darstellt (Vona et al., 2004).

I.3.2 Immunantwort

Das HCV ist kein zytopathisches Virus. Der Verlauf der HCV-Infektion wird durch die Interaktion des Immunsystems mit dem Virus bestimmt (siehe auch I.8). Eine polyklonale und multispezifische $CD8^+$ T-Zell-Antwort, zusammen mit einer anhaltenden $CD4^+$ Antwort, ist mit einer Elimination bzw. Kontrolle des HCV und einer selbstlimitierten akuten Hepatitis C assoziiert, eine schwache T-Zell-Antwort hingegen mit viraler Persistenz und einem chronischen Krankheitsverlauf (zusammengefasst in Sun et al., 2004).

Die humorale Immunantwort spielt bei der HCV-Infektion wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle. Erste HCV-spezifische Antikörper können zwar ab der 7. Woche nach Infektion und im weiteren Verlauf gegen alle HCV-Proteine «Struktur- sowie Nichtstrukturproteine» nachgewiesen werden (Chien et al., 1992). Dennoch konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass Reinfektionen mit einem gleichen oder unterschiedlichen Inokulum möglich sind (Prince et al., 1992). Antikörper, die putativ neutralisierend wirken, sind vor allem gegen die Hypervariable Region 1 (HVR1) im E2 (Zibert et al., 1995) beschrieben. Eine protektive Immunität wird aber nur bedingt vermittelt (Kaplan et al., 2003).

I.4 Behandlung und Prävention

I.4.1 Therapie der CHC

Heute wird die CHC mit pegyliertem IFN- α (PEG-IFN- α) plus Ribavirin behandelt (Zeuzem, 2004).

Bereits zu Beginn der achtziger Jahre wurde IFN- α -2b zur Therapie der NANBH eingesetzt (Hoofnagle et al., 1986). Der zunächst mäßige Erfolg dieser Monotherapie konnte durch Kombination mit dem ursprünglich in der HIV-Therapie eingesetzten Guanosinanalogs „Ribavirin“ (1- β -ribafuranosyl-1,2,3-triazol-3-carboxamid) sehr deutlich verbessert werden (Banner et al., 1997). Der Wirkungsmechanismus

von Ribavirin auf die HCV-Infektion ist derzeit noch nicht bekannt, insbesondere da die Ribavirinmonotherapie keinen signifikanten Einfluss auf die Virämie einer CHC ausübt. An Polyethylenglykol (PEG) gekoppeltes IFN verfügt über eine deutlich längere Halbwertszeit, was eine nur einmal wöchentliche Verabreichung ermöglicht. Die Standardtherapie besteht derzeit in der wöchentlichen Gabe von 180 μg PEG-IFN- α s.c. und der täglichen Verabreichung von 1000–12.000 mg Ribavirin pro Tag, in der Regel über einen Zeitraum von 48 Wochen (Zeuzem, 2004). Die Behandlung wird den prognostischen Parametern, insbesondere dem Status der Virämie und dem viralen Genotyp, angepasst (Berg und Hopf, 2001). Bei einigen Patienten kann es unter Therapie auch zu Nebenwirkungen kommen, die vor allem durch das IFN ausgelöst werden, was im Einzelfall eine Dosisanpassung oder gar einen Abbruch der Therapie erfordern kann. Die Gesamtkosten einer in Deutschland durchgeführten 48-wöchigen Kombinationstherapie mit PEG-IFN- α plus Ribavirin betragen ca. 23,500 € pro Patient (Schreier et al., 2003).

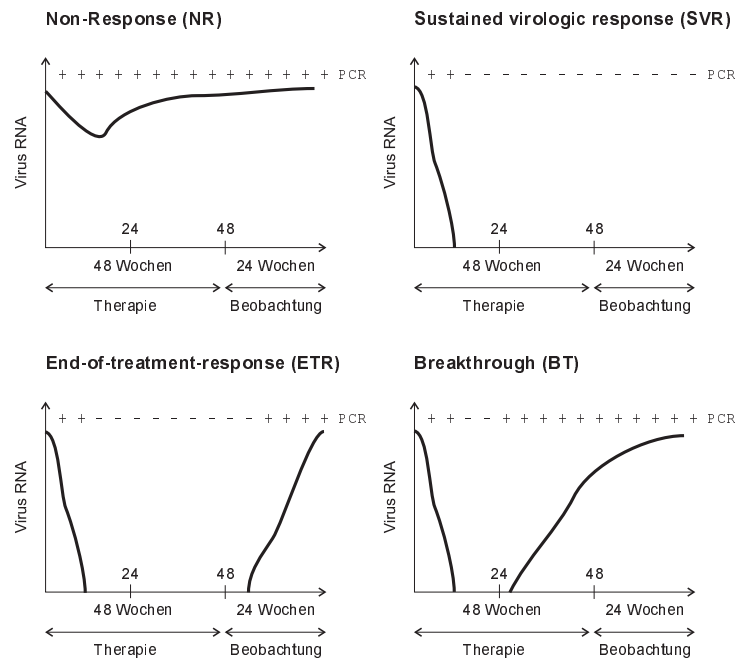


Abb. I.1: Exemplarische Darstellung des Therapieansprechens von Patienten mit CHC.

Das Therapieansprechen wird folgendermaßen definiert (siehe Abb. I.1), bei Patienten die auf Therapie ansprechen und das Virus nachhaltig eliminieren, als *sustained virologic response* (SVR), bei Patienten, die nicht auf Therapie ansprechen, als *non-response* (NR), bei Patienten, die während der Therapie vorübergehend HCV-negativ waren, als *breakthrough* (BT) und bei Patienten, die erst nach der Therapie wieder HCV-positiv werden, als *end-of-treatment-response* (ETR).

I.4.2 Prognostische Faktoren der IFN-Therapie

Verschiedene virale aber auch Wirtsfaktoren beeinflussen den Erfolg der IFN-Therapie (Hu et al., 2001). Der Therapieerfolg der CHC hängt neben der Viruslast stark vom viralen Genotyp ab. Insbesondere der in Europa und USA weit verbreitete Genotyp 1 lässt sich im Vergleich zu den Genotypen 2 und 3 schlecht behandeln (Zeuzem et al., 2004). Unter Kombinationstherapie liegt die SVR bei Genotyp 1-infizierten Patienten derzeit bei ca. 50 % (Pawlotsky, 2003), während sie für HCV-2 mit ca. 70 % und für HCV-3 mit

über 80 % angegeben wird (Mangia et al., 2005). Dies stellt immer noch eine deutliche Verbesserung zu der bis 1997 standardmäßig eingesetzten Monotherapie dar. Hier lag die SVR bei Genotyp 1 infizierten Patienten bei < 10 % und bei Genotyp 2/3 infizierten bei ca. 32 % (McHutchison et al., 1998).

Ein hoher Virustiter vor Therapiebeginn ist mit vermehrter NR assoziiert. Je früher ein Patient auf die Therapie anspricht, desto besser sind seine Chancen auf eine SVR. Dauer und Status der Infektion spielen eine Rolle, eine akute Infektion lässt sich deutlich besser therapieren als eine chronische. Patienten mit ausgeprägter Zirrhose oder Fibrose tendieren eher zu einer NR. Einige Studien postulieren einen Zusammenhang zwischen der Quasispeziesheterogenität und Therapieerfolg, da eine erhöhte Anzahl an Immunfluchtmutanten zur Verfügung steht. Dies betrifft vor allem die Heterogenität der Quasispezies der HVR-1/2 im E2, sowie der ISDR und V3 im NS5A (Duverlie et al., 1998; Gonzalez-Peralta et al., 1996; Kanazawa et al., 1994; Koizumi et al., 1995; Nousbaum et al., 2000; Okada et al., 1992; Pascu et al., 2004; Pawlotsky et al., 1998b). Es gibt Hinweise darauf, dass Unterschiede in der HVR1-Quasispezies eher die Frühphase der Infektion beeinflussen, aber isoliert betrachtet nicht eine SVR erklären (Chambers et al., 2005). Im Zusammenhang mit dem Therapieerfolg sind auch eine Reihe von Wirtsfaktoren beschrieben worden, von denen viele mit der adaptiven Immunantwort assoziiert sind (Berg et al., 2000; He und Katze, 2002; Jung et al., 1994; Mueller et al., 2004).

I.4.3 Therapie der akuten HCV-Infektion

Patienten mit akuter Hepatitis-C-Infektion haben gute Chancen auf eine SVR. Etwa 20 % der akut HCV-Infizierten können das Virus spontan eliminieren. Ist eine Therapie angezeigt, erfolgt sie, wie bei der CHC, mit der Gabe von PEG-IFN α plus Ribavirin. Da die akute HCV-Infektion meist asymptomatisch verläuft, beschränken sich die Daten zur Therapie auf vergleichsweise kleine Patientenkollektive. Je nach Studie wird die SVR einer akuten HCV-Infektion unterschiedlich zwischen 81 % und 95 % angegeben (Gerlach et al., 2003; Jaeckel et al., 2001).

I.4.4 Alternative Therapieansätze

Da viele Patienten nicht therapierbar sind und die Nebenwirkungen der IFN-Therapie eine starke Belastung darstellen, ist die Entwicklung neuer Therapieansätze weiterhin ein wichtiges Ziel. Vielversprechend sind hierbei Proteaseinhibitoren, die die Prozessierung des HCV-Polyproteins hemmen können. Dazu gehört der seit 2003 in Phase II klinischer Studien befindliche Inhibitor der HCV-NS3/4A-Protease, *BILN-2061* (Lamarre et al., 2003) und der nicht für alle Genotypen wirksame Protease Inhibitor *VX-950* (Babine et al., 2002). Hierbei ist die Entstehung von Resistenzen ein entscheidendes Kriterium für den möglichen therapeutischen Einsatz (Lin et al., 2004; Lu et al., 2004).

Weitere alternative Therapieansätze, die sich derzeit in der Entwicklung befinden, umfassen u.a. Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclosporin A (CsA) (Watashi et al., 2003), Polymeraseinhibitoren z.B. Thiophene-2-Carboxylsäure (Chan et al., 2004) und Ionenkanalhemmer z.B. Amantadine (Carlsson et al., 2000; Engler et al., 2004; Piai et al., 2003).

I.5 Molekularbiologie des HCV

I.5.1 Phylogenetische Klassifizierung

Aufgrund seiner molekularbiologischen Eigenschaften wurde das HCV in die eigenständige Gattung „Hepaciviren“ der Familie der *Flaviviridae* eingeordnet (Francki et al., 1991). Weitere wichtige tier- und humanpathogene Vertreter dieser Familie sind die Flaviviren, die unter anderem das Gelbfiebertvirus, das West-Nile-Virus und das FSME-Virus beinhalten, sowie die Gattung der Pestiviren und einige unklassifizierte Viren (z.B. GBV-C). Allen gemein ist das positive ssRNA-Genom, welches vom Nukleokapsid und einer vom Wirt stammenden Zellmembran umschlossen ist, sowie ein gleichartiger Genomaufbau. Phylogenetisch ist HCV jedoch enger mit den Pestiviren, als mit den Flaviviren verwandt.

I.5.2 Morphologie

Das Partikel besteht aus dem Nukleoprotein „Core“, welches das virale Genom umschließt, sowie einer umhüllten Membran, die dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) des Wirtes entstammt und die glykosylierten Hüllproteine E1 und E2 enthält. Beschrieben wurden Durchmesser virusähnlicher Partikel von 20–30 nm (Falcon et al., 1999) und 55–70 nm (Kaito et al., 1994; Prince et al., 1996). Die Dichtebestimmung von HCV-Partikeln durch Ultrazentrifugation zeigte Werte zwischen 1,04 g/ml (Bradley et al., 1991) und 1,20 g/ml (Carrick et al., 1992; Miyamoto et al., 1992).

Für *in vitro* generierte infektiöse Partikel, ist ein Durchmesser von 55 nm und eine Dichte von 1,15–1,17 g/ml (Wakita et al., 2005) beschrieben.

I.5.3 Quasispezies und Virusdynamik

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) besitzt keine *proof-reading* Aktivität, was zufolge hat, dass Fehlpaarungen während der Replikation nicht korrigiert werden können. Die daraus resultierende Fehlerrate wird auf 10^{-4} bis 10^{-5} Nukleotidaustauschen pro Replikationszyklus geschätzt (Martell et al., 1992). Der tägliche Umsatz von geklärten und neu generierten HCV-Partikeln beträgt etwa 10^{12} Virionen bei einer durchschnittlichen Halbwertszeit von ca. 3–5 Stunden (Neumann et al., 1998; Rice, 2003; Zeuzem et al., 1998). Dies entspricht ungefähr 50 Virionen pro infizierter Zelle pro Tag (Neumann et al., 1998). Aufgrund des hohen Umsatzes und der Fehlerrate der viralen RdRp kommt es innerhalb eines Patienten zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Varianten. Diese Population wird in seiner Gesamtheit als Quasispezies bezeichnet (Martell et al., 1992). Die Variabilität der Quasispezies im Vergleich zur Konsensussequenz beträgt in den meisten Genomregionen nicht mehr als 5 %. Auf einzelne Proteine bezogen bilden hier aber das E2 Protein, welches zwei HVR aufweist und das NS5A mit einer variablen Region (V3), eine Ausnahme (Hohne et al., 1994; Inchauspe et al., 1991).

I.5.4 Genotypen

2005 waren in der HCV-Datenbank (Kuiken et al., 2005) 221 vollständig sequenzierte HCV-Genome abrufbar.

Das HCV-Genom wird in mindestens 6 verschiedene Genotypen und über 50 Subtypen unterteilt (Robertson et al., 1998; Simmonds et al., 1994), siehe Abb. I.2.

Nach Simmonds liegt ein neuer Genotyp dann vor, wenn die Homologie der Aminosäuresequenz von zwei Isolaten bezogen auf das Gesamtgenom weniger als 72 % beträgt. Bei einer Sequenzhomologie zwischen 75 und 86 % wird das Isolat als unterschiedlicher Subtyp klassifiziert (Davis, 1999; Simmonds et al., 1994). Verschiedene HCV-Genotypen sind auch geographisch unterschiedlich angesiedelt, siehe Tab. I.1.

Neben der geographischen Verteilung spielen auch demographische Faktoren eine wichtige Rolle, z.B. ist der Genotyp 3 bei i.v.-Drogenabhängigen stark überpräsentiert (Dubois et al., 1997).

Ein Zusammenhang des HCV-Genotyps mit dem Krankheitsverlauf ist in der Literatur beschrieben (Kobayashi et al., 1993; Mihm et al., 1997), jedoch umstritten (Simmonds, 2004), da hier auch andere Faktoren mit hineinspielen, die mit dem Genotyp assoziiert sind, z.B. Patientenalter oder Übertragungsweg.

Im Idealfall beruht die Typisierung eines HCV-Isolates auf der Sequenzanalyse des Gesamtgenoms. Im allgemeinen reicht es jedoch aus, hochkonservierte Teilsequenzen des Genoms, wie z.B. die 5'-UTR zu analysieren (Bukh et al., 1992; Smith et al., 1995). Hierbei kommen neben der molekularen Sequenzierung die PCR mit typspezifischen Primern, sowie der kommerzielle LiPA-Test (*Reverse Hybridisation Line Probe Assay*) zum Einsatz (siehe II.12.3).

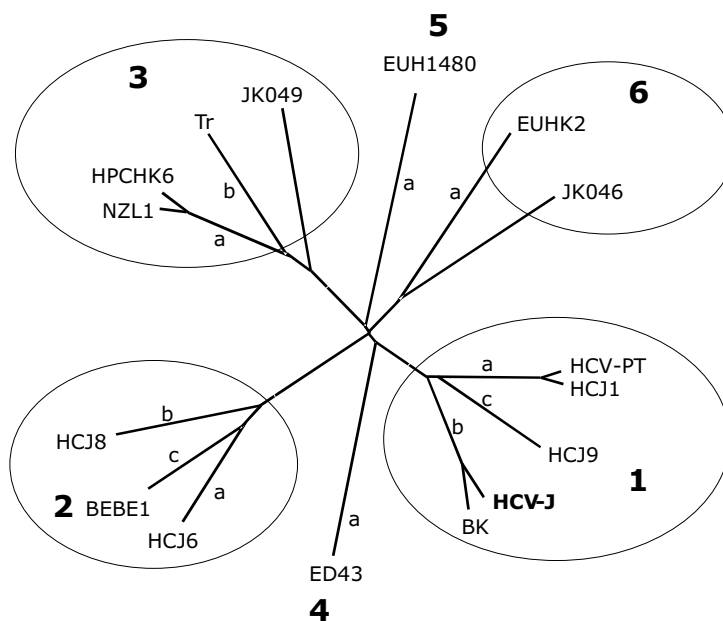


Abb. I.2: Phylogenetische Analyse ausgewählter HCV-Isolate.

Tab. I.1: Geographischen Verteilung der HCV-Genotypen/Subtypen

Land	Genotyp/Subtyp
USA/Kanada	1a,1b , 2a, <i>2b</i> , 3a
Südamerika	1a,1b , 2, 3a
Europa	1a, 1b , 2a, <i>2b</i> , 2c, 3a
Nord- und Zentralafrika	4
Südafrika	5a , 1, 2, 3
Asien	1b , 6
Indien	1b , 3a
Japan, Taiwan, China	1b , <i>2a</i> , 2b, 6
Vietnam, Thailand, Hong Kong	6a,1b,2
Australien	1a , 3a
Indonesien	3b

Der am meisten verbreitete Genotyp/Subtyp ist fett-, der häufigste Subtyp innerhalb eines Genotypes ist kursiv gedruckt

I.6 Genomorganisation

Das positive ssRNA Genom umfasst ca. 9,6 kb und enthält einen offenen Leserahmen, der am 5' und 3' Ende von nicht-translatierten Regionen (UTR) flankiert wird (siehe Abb. I.3). Die ca. 340 nt lange 5'-UTR enthält eine *internal ribosome entry site* (IRES), die eine

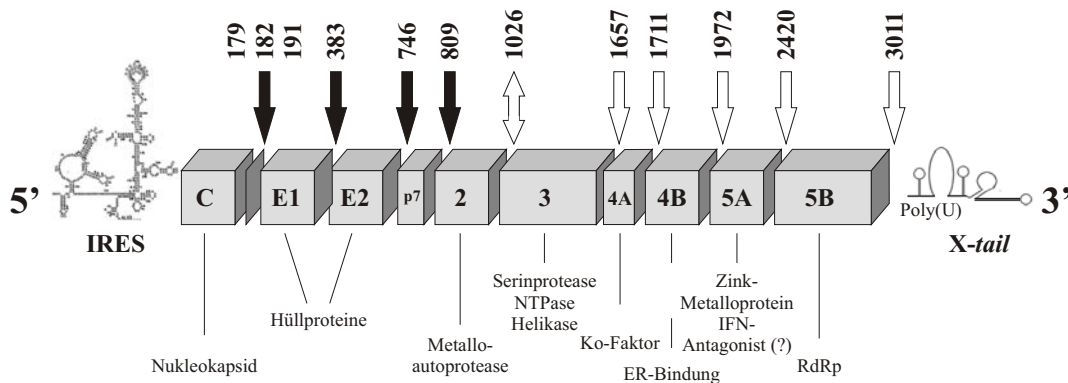


Abb. I.3: Modell der Genomstruktur des HCV. (nach Hofmann et al., 2005)

CAP-unabhängige Initiation der Translation des (+)RNA-Genoms ermöglicht. Interessanterweise reicht die IRES bis in den kodierenden Bereich des viralen Genoms hinein. Die ca. 230 nt lange 3'-UTR enthält neben einer sehr variablen Poly(U) Sequenz einen hoch konservierten *X-tail* aus 3 *Stem-Loop*-Strukturen, der vermutlich bei der Initiation der Replikation des (-)Stranges eine wichtige Rolle spielt.

Der offene Leserahmen kodiert ein lineares Polyprotein von ca. 3010 Aminosäuren. Ein zweites Translationsprodukt, das Protein F, entsteht durch einen ribosomalen Frameshift an Aminosäureposition 11 im HCV-Core und umfasst 172 Aminosäuren (Xu et al., 2003). Welche Rolle das F-Protein für die HCV-Replikation spielt, ist bisher nicht bekannt.

Das Polyprotein enthält alle derzeit bekannten HCV-Proteine und wird co- und posttranslational in seine Komponenten gespalten. Die drei Strukturproteine: Core, E1 und E2 werden von wirtseigenen, die Nichtstrukturproteine NS2–5 von viruscodierten Proteasen gespalten, (siehe Abb. I.3). Eine Übersicht der HCV-Proteine ist in Tabelle I.2 dargestellt, da die Länge des Genoms einzelner Isolate variiert, beziehen sich die im Folgenden angegebenen Aminosäure- bzw. Nukleotidpositionen, soweit nicht anders angegeben, auf das Referenzisolat HCV-J [acc. D90208, Kato et al., 1990].

Tab. I.2: Übersicht der HCV-Proteine

Protein	Nukleotidposition	Aminosäureposition	Größe [kD]	Funktion
5' UTR	1-341			Initiierung der Translation und Replikation
C	342-857	1-191/179/182	p21/p19	virales Nukleokapsid, putativer IFN-Antagonist
E1	915-1490	192-383	gp31	Hüllprotein
E2	1491-2579	384-746	gp70	Hüllprotein, putativer IFN-Antagonist
E2-p7	1491-2768	384-809	gp77	unbekannt
p7	2580-2768	747-809	p7	unbekannt
NS2	2769-3419	810-1026	p21	zinkabhängige Metalloautoprotease, HCV-Replikation
NS3	3420-5312	1027-1657	p70-72	Serinprotease, NTPase, Helikase, IFN-Antagonist, HCV-Replikation
NS4A	5313-5476	1658-1711	p6	Kofaktor der NS3 Serinprotease, HCV-Replikation
NS4B	5477-6257	1712-1972	p27	ER bindendes Protein, HCV-Replikation
NS5A	6258-7600	1973-2420	p56-58	Zink-Metalloprotein, putativer IFN-Antagonist, HCV-Replikation
NS5B	7601-9374	2421-3011	p68-70	RNA-abhängige RNA-Polymerase, HCV-Replikation
3' UTR	9375-9621			HCV-Replikation, Verpackung

I.6.1 Core

Das HCV-Core Protein stellt das virale Nukleokapsid dar und wird bei Aminosäure 191 des Polyproteins von zellulären Signalpeptidasen gespalten. Das Protein besitzt zwei Homooligomerisierungsdomänen (Matsumoto et al., 1996; Nolandt et al., 1997) sowie eine RNA-Bindedomäne (Santolini et al., 1994), die es als Nukleokapsid auszeichnen. Im Elektronenmikroskop erscheint das Core als ikosaedrischer Partikel (Takahashi et al., 1992). Das Vorläuferprotein hat ein Molekulargewicht von 21-23 kD und ist hoch konserviert. Unterschiedliche Molekulargewichte resultieren aus C-terminal trunkierten Produkten, wobei das 21 kD Protein in Patientenseren nachgewiesen wurde und somit das reife Protein repräsentiert (Yasui et al., 1998). Die verkürzten Proteine sind im Zellkern lokalisiert und haben somit Funktionen unabhängig von der Kapsidbildung. Der Carboxyterminus ist stark hydrophob und in die ER-Membran integriert (McLauchlan, 2000). Der Aminoterminus enthält mehrere putative Kernimportsignale (Chang et al., 1998). Die prozessierte Form des Core-Proteins befindet sich im Zellkern sowie im perinukleären Bereich der Zelle

(Moradpour et al., 1996; Santolini et al., 1994; Selby et al., 1993).

Neben der Eigenschaft als Nukleokapsidbildner sind für das HCV-Core auch antiapoptotische Eigenschaften beschrieben. In Zellkultur beeinflusst es verschiedene zelltodregulierende Proteine, wie fas, c-myc, p53, p21 und TNF α . (Ghosh et al., 2000a; Ray et al., 1996). Dies führt dazu, dass die Promotorenaktivität verschiedener Viren, insbesondere SV40, HBV, HIV und RSV, beeinflusst und Genexpression konkurrierender Viren gehemmt werden kann (Okuda et al., 1999; Shih et al., 1993; Srinivas et al., 1996). Das hepatozelluläre Karzinom ist ebenfalls mit den zelltransformierenden Eigenschaften des HCV-Core assoziiert (Ray et al., 1996).

Auch IFN-antagonisierende Eigenschaften sind für das HCV-Core beschrieben (siehe I.13).

I.6.2 E1/E2

Die Glykoproteine E1 (gp31) und E2 (gp70) stellen die viralen Hüllproteine dar und werden an den Aminosäuren 383 bzw. 746 abgespalten (Major et al., 2001). Eine weitere Spaltstelle befindet sich zwischen E2 und NS2 an Position 809 und generiert die Proteine E2-p7 sowie p7 (Lin et al., 1994; Mizushima et al., 1994; Selby et al., 1994). Die Spaltung an Position 809 verläuft sehr ineffizient und scheint ebenfalls genotyp- bzw. sequenzspezifisch zu sein. P7 wird als putativer Ionenkanal diskutiert (Griffin et al., 2003) und stellt ein für die Infektion essentielles Protein dar (Sakai et al., 2003).

Beide Glykoproteine enthalten aminoterminal Signalpeptide und werden an das ER transportiert. E1 und E2 interagieren mit Hilfe von Chaperonen des ER (Dubuisson und Rice, 1996) zu einem nicht-kovalent gebundenen Heterodimer (Ralston et al., 1993). Für das E2 wurde eine Interaktion mit dem CD81 Transmembranprotein beschrieben (Flint et al., 1999). Allerdings ist diese Interaktion relativ schwach und abhängig vom viralen Genotyp. Eine direkte Interaktion mit dem humanem *Scavenger-Rezeptor Class-B Type-I* (SR-BI) ist sehr selektiv und stellt vermutlich die für die HCV-Aufnahme essentielle Rezeptorbindung dar (Bartosch et al., 2003; Scarselli et al., 2002).

Es wird vermutet, dass das Virus während der chronischen Infektion durch *Escape-Mutationen* neue Quasispeziesvarianten bildet und sich somit der Elimination durch das Immunsystem entzieht. Da das E2-Protein dem Immunsystem an der Oberfläche der HCV-Virionen präsentiert wird, herrscht hier ein starker Selektionsdruck. Dieser konzentriert sich auf zwei Regionen, die verschiedene B-Zell Epitope enthalten (Nakamoto et al., 1996; Taniguchi et al., 1993) und mit T_h Aktivierung assoziiert sind (Del Porto et al., 2000). Beide Regionen weisen im Vergleich zum viralen Genom sehr viel mehr Nukleotidaustausche auf und wurden daher als Hypervariable Regionen (HVR-1 aa 383-410 und HCV-2 aa 474-480, bezeichnet (Kato et al., 1992). Neutralisierende Antikörper gegen die HVR-1 und -2 sind beschrieben (Rosa et al., 1996; Shimizu et al., 1996), vermitteln aber keine ausreichende protektive Immunität (Kato et al., 1992). Die Bedeutung der HVR-2 ist bisher noch unklar (Kato et al., 1992; Hughes et al., 2004)

Am Carboxylende befindet sich eine 12 Aminosäuren umfassende Domäne, die Homologien zu einer Phosphorylierungsstelle der PKR sowie des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors (eIF)2 α aufweist und als PKR/eIF2 α phosphorylation homology domain (PePHD) bezeichnet wird, siehe I.13.

I.6.3 NS2

Das NS2-Protein des HCV ist ein hydrophobes Transmembranprotein, dessen carboxy-terminaler Bereich im Lumen des ER lokalisiert ist, während der aminoterminaler Bereich ins Zytoplasma weist (Santolini et al., 1995). NS2 wird an seinem N-Terminus durch eine zelluläre Signalpeptidase an Position 809 vom Polyprotein abgespalten, der C-Terminus hingegen wird autoproteolytisch im Verbund mit dem aminoterminalen Ende von NS3 bei Aminosäure 1026 abgespalten (Grakoui et al., 1993). Da die Spaltung von NS2/3 zink-abhängig ist und sich durch EDTA inhibieren lässt, wird NS2/3 auch als zinkabhängige Metalloprotease bezeichnet.

I.6.4 NS3

Das NS3-Protein ist ein multifunktionelles Protein, für das Eigenschaften als Serinprotease, NTPase und RNA-Helikase beschrieben wurden. Im Verbund mit NS4A ist es als Protease bei der Abspaltung aller Nichtstrukturproteine beteiligt. Sequenzvergleiche zwischen HCV und anderen Flaviviren zeigten drei hoch konservierte Aminosäuren an den Positionen His-1083, Asp-1107 und Ser-1165, die die katalytische Triade der Serinprotease Familie konstituieren (Chambers et al., 1990). Die Abspaltung vom NS2 erfolgt, wie oben beschrieben, autoproteolytisch im Verbund mit NS2. Für die Spaltung von NS3/4, NS4B/5A ist das NS4A-Protein als Co-Faktor notwendig (Major et al., 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NS4A zur strukturellen Stabilität von NS3 beiträgt, wobei der N-Terminus von NS3 direkt mit dem NS4A interagiert (Failla et al., 1994).

Die Helikase- und NTPase-Aktivitäten von HCV-NS3 liegen im C-terminalen Bereich. Die Helikaseaktivität dient dem Auflösen von Sekundärstrukturen der dsRNA in 3'→5' Orientierung, wobei die benötigte Energie durch die Hydrolyse von NTP und dNTP (NTPase-Aktivität) umgesetzt wird (Major et al., 2001). Man nimmt an, dass die Helikaseaktivität von NS3 bei der viralen RNA-Replikation eine Rolle spielt.

Untersuchungen bei Flaviviren haben gezeigt, dass ein NS3-Homolog essentiell für die Virusvermehrung ist (Chambers et al., 1990). Basierend auf der dreidimensionalen Raumstruktur des Proteins (Kim et al., 1998; Yao et al., 1997) wurden die bereits erwähnten synthetischen Peptide *BILN-2061* und *VX-950* entworfen (siehe I.4.3). *BILN-2061* und *VX-950* binden die katalytische Domäne von NS3 und inhibieren somit die für das Virus essentielle Proteaseaktivität.

Kürzlich wurde gezeigt, dass NS3/4A die IFN- β -Induktion inhibieren kann (siehe I.13).

I.6.5 NS4A/B

NS4A ist ein für das Virus essentieller Kofaktor der NS3-Protease. Das Protein ist mit 54 Aminosäuren sehr klein und wird in drei Regionen unterteilt. Von Region I (aa 1-20) wird angenommen, dass sie als Transmembranregion dient (Rost et al., 1995) und die NS3-Bindung ermöglicht (Bartenschlager et al., 1995). Für Region II (aa 21-34) wurde beschrieben, dass sie für die Aktivierung der Serinproteaseaktivität von NS3 notwendig ist (Butkiewicz et al., 1996). NS4A assoziiert mit der ER-Membran (Hugle et al., 2001) und man vermutet, dass dies in Assoziation mit NS3 eine wichtige Rolle bei der Bildung von polioähnlichen membranassoziierten Replikationskomplexen spielt (Bienz et al., 1992; Moradpour et al., 2003).

Über das 27 kD große NS4B Protein ist noch relativ wenig bekannt. Es wird komplett in die ER Membran eingebaut (Hugle et al., 2001). Man nimmt an, dass NS4B die ER-Membran so verändert (*membranous web*), dass sie als Gerüst für den HCV-Replikationskomplex dienen kann (Egger et al., 2002; Moradpour et al., 2003).

I.6.6 NS5A

Die Funktion von NS5A ist immer noch nicht eindeutig geklärt. Allgemein akzeptiert ist, dass das Protein einen essentiellen Teil des viralen Replikationskomplexes darstellt. Kontrovers diskutiert wird immer noch eine Rolle als potenter Immunmodulator, speziell auf das angeborene Immunsystem (siehe I.13), was auch Fokus dieser Untersuchungen ist.

NS5A wird durch die virale Protease NS3/4A an den Aminosäure Positionen 1973 und 2419 vom Polyprotein abgespalten. Eine schematische Übersicht des Proteins ist in Abb. I.4 dargestellt.

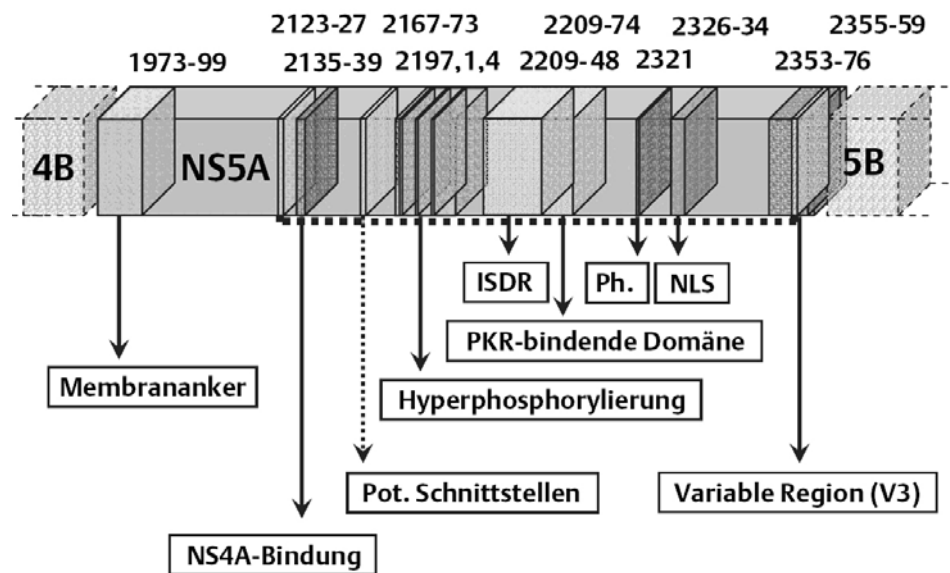


Abb. I.4: Modell des HCV-NS5A Proteins (aa 1973-2419). (nach Hofmann et al., 2005)

Der N-Terminus des NS5A (aa 1973–1999) stellt einen Membrananker zum ER dar (Brass et al., 2002). Zusammen mit NS5B wird NS5A über das human vesicle associated protein (hVAP33) an die perinukleären ER-Membran gebunden [Tu 1999]. Das komplette NS5A lokalisiert am ER im Zytoplasma (Ide et al., 1996), obwohl sich am N-Terminus des Proteins ein putatives Kernimportsignal (aa 2326–2324) befindet. N-terminal trunkiertes NS5A hingegen wandert in den Zellkern (Song et al., 2000).

Einfluss von NS5A auf virale Replikation:

NS5A interagiert direkt mit allen viralen Nichtstrukturproteinen, sowie mit sich selbst (Dimitrova et al., 2003). Kartiert sind derzeit eine NS4A-Bindestelle, aa 2135–2139, (Asabe et al., 1997), sowie zwei unabhängige NS5B-Bindestellen, aa 2078–2135 und 2250–2307, (Shirota et al., 2002). Die Komplexierung mit viralen Nichtstrukturproteinen am ER deutet auf einen Einfluss auf RNA-Replikation hin, was ebenfalls durch die Beobachtung

gestützt wird, dass spezifische Mutationen im NS5A für eine effiziente Vermehrung des HCV-Replikons notwendig sind (Bartenschlager et al., 2003).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das NS5A ein Zink bindendes Metalloprotein darstellt (Tellinghuisen et al., 2004). Anhand der Aminosäuresequenz wurde ein putatives Zink-Finger-Motiv bestehend aus vier konservierten Cysteinen C(X)₁₇CXC(X)₂₀C am N-Terminus des NS5A identifiziert und funktional bestätigt. Mutagenesestudien im Replikonsystem zeigten, dass die NS5A-vermittelte Zink-Koordination essentiell für HCV-RNA-Replikation ist (Tellinghuisen et al., 2004).

NS5A ist ein Phosphoprotein:

Reifes NS5A liegt als phosphoryliertes p56 oder hyperphosphoryliertes p58 Protein vor. Die grundlegende Phosphorylierung unterscheidet sich bei den Genotypen und erfolgt hauptsächlich an den Serinresten, speziell Serin 2321 (Reed und Rice, 1999), aber auch Threoninphosphorylierung findet zu einem geringen Teil statt. Hyperphosphorylierung erfolgt in *cis* durch den Komplex aus NS3/NS4A und NS4B an den Serinen 2197, 2201 und 2204 (Koch und Bartenschlager, 1999). Eine biologische Relevanz der Phosphorylierung konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Hyperphosphorylierung scheint allerdings Einfluss auf RNA-Replikation zu haben. Untersuchungen am Replikon konnten zeigen, dass vermehrte Mengen von NS5A-p58 die HCV-RNA-Replikation inhibieren können (Evans et al., 2004; Namba et al., 2004; Neddermann et al., 2004). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass das Verhältnis von NS5A zu NS5B Einfluss auf die virale RNA-Replikation hat. Ein molares Verhältnis zugunsten von NS5A wirkt sich hierbei negativ auf die Replikation aus, während eines zugunsten von NS5B die Polymerase leicht stimulieren kann (Shimakami et al., 2004).

Einfluss von NS5A auf Apoptose:

NS5A besitzt zelltodinhibierende und Wachstums modulierende Eigenschaften, die sowohl mit Chronifizierung der Infektion, als auch dem HCC assoziiert sind. Auch diese sind zunächst PKR-abhängig. Durch die Inhibition der PKR wird eIF2- α nicht mehr phosphoryliert, was u.a. eine Inhibition der Apoptose zur Folge hat (Taylor et al., 1999). NS5A inhibiert auch die Aktivierung der Caspase-3 durch PKR und verhindert somit die TNF- α -vermittelte Apoptose (Ghosh et al., 2000a; Majumder et al., 2002). Es wurde beobachtet, dass NS5A gleichfalls Einfluss auf den zellulären Transkriptionsmodulator p58^{IPK} nimmt, indem es den Promotor p21/waf1 inhibiert. Die Genprodukte p21/waf1 fungieren als cyclinabhängige Kinaseinhibitoren, vermindern Zellwachstum und können proapoptotisch wirken. Ferner wurde eine direkte Interaktion zwischen NS5A und p58^{IPK} gezeigt (Lan et al., 2002; Majumder et al., 2001). Eine Kollokalisierung von NS5A und PKR in der Zelle konnte über konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nicht bestätigt werden (Francois et al., 2000). Daher werden für das NS5A PKR-unabhängige Mechanismen der IFN- und Apoptoseinhibition postuliert. So wurde gezeigt, dass NS5A über eine Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Level, reaktiven Sauerstoff in den Mitochondrien erhöht und damit oxidativen Stress induziert, was STAT3 und NF κ B aktiviert (Gong et al., 2001). NF κ B stimuliert eine Reihe antiapoptotischer Gene und auch STAT3 weist verschiedene antiapoptotische und zellwachstumsmodulierende Eigenschaften auf. Dennoch konnten die antiapoptotischen Eigenschaften von NS5A nicht in jedem Zellsystem bestä-

tigt werden (Ezelle et al., 2001). In humanen Osteosarcoma-Zellen wurden auch gegenteilig wachstumshemmende Eigenschaften nachgewiesen (Yoshida et al., 2001).

Einfluss von NS5A auf zelluläre Transkription:

Für den C-Terminus des NS5A wurden transkriptionsaktivierende Eigenschaften beschrieben (Fukuma et al., 1998; Ghosh et al., 1999; Kato et al., 1997). Interessanterweise besitzt NS5A keine Struktur motive, die einer Phosphatase- oder Kinaseeigenschaft entsprechen (Gale et al., 1997). Mutationsstudien haben gezeigt, dass die Regionen 2135-2248 (Kato et al., 1997) und 2207-2325 essentiell für die transkriptionelle Aktivierung sind, nicht aber das komplette Protein. Song et al., 2000 haben gezeigt, dass NS5A durch die Caspase-3 in Säugerzellen apoptoseabhängig zwischen Asp154/Gly155 und Asp389/Ser390 gespalten werden kann. Ein N-terminal deletiertes NS5A (1999-2240) lokalisiert zusammen mit der α -katalytischen Untereinheit der Protein Kinase A (PKA), einer putativen NS5A-Kinase (Ide et al., 1996), hauptsächlich im Zellkern.

Es ließ sich zeigen, dass NS5A den Transkriptionsfaktor SR-CAP aktiviert. SR-CAP ist ein CREB bindendes Protein (CBP), welches chromatinverändernde Eigenschaften besitzt, sowie Einfluss auf die DNA-Reparatur nimmt und in der Lage ist, die Transkription zu regulieren (Ghosh et al., 2000b).

Einfluss von NS5A auf den mitogenaktivierten Protein Kinase (MAPK)-Pathway:

Ein weiterer Bindungspartner des NS5A ist der Wachstumsfaktor „*Growth Factor Receptor-Bound 2*“ (Grb2) (Macdonald und Harris, 2004; Tan et al., 1999). Die Bindungsstelle wurde kartiert (aa 2248 und 2419) und stellt eine prolinreiche Src-homology 3 (SH3) Bindedomäne dar (PXXP). Durch das SH3-Bindemotiv interagiert NS5A mit den SH3-Domänen von Grb2 und der Src-Homologiedomäne des Amphiphysin II (Zech et al., 2003). Grb2 assoziiert mit dem Nukleotidaustauschfaktor „*son of seven*“ (SOS) und aktiviert den Wachstumsfaktor Ras, was zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade führt. Die MAPK-Kaskade reguliert Zellwachstum, Differenzierung und Überleben der Zelle. Eine Störung der MAPK-Kaskade kann sich auch direkt auf das IFN-Signaling auswirken, da verschiedene Überschneidungen zwischen den Signaltransduktionswegen beschrieben sind (Ihle, 1996; Ishihara und Hirano, 2002; Leaman et al., 1996; Winston und Hunter, 1996). Der Interaktion mit Amphiphysin II konnte bisher noch kein Effekt zugewiesen werden.

Einfluss von NS5A auf Kernimport:

Als weiterer potentieller Bindungspartner des NS5A wurde das Karyopherin- β 3-Protein identifiziert (Chung et al., 2000). Karyopherin- β 3 gehört zur Karyopherinfamilie, deren prominenteste Vertreter, Importin- β (Karyopherin- β 1) in Verbindung mit Importin- α (Karyopherin- α), Proteine mit klassischem Kernimportsignal (NLS) in den Kern transportieren. Die exakte Funktion von Karyopherin- β 3 ist bisher nicht bekannt, da Karyopherin- β 3 aber signifikante Ähnlichkeit mit Karyopherin- β 1 hat und deletierte Kernimportfaktoren in Hefe komplementieren kann, scheint das Protein im Kernimport aktiv zu sein.

I.6.7 NS5B

NS5B stellt das letzte C-terminale Protein des HCV dar und wird an Aminosäure Position 2421 vom NS5A abgespalten. Es beinhaltet das RdRp Motiv G-D-D (2737 bis 2739) und erscheint als membranassoziiertes Phosphoprotein. Wie für (+)Strang-RNA-Viren üblich, wird die Polymerase nicht mit verpackt, da sich das Virus der Proteinbiosynthese des Wirts bemächtigen kann. Die virale (+)RNA wird zunächst als mRNA für die Translation der viralen RdRp verwendet, um dann als Template von dieser in komplementäre (-)RNA umgeschrieben zu werden. Die (-)RNA kann dann wieder sehr effizient von der viralen RdRp in genomische (+)RNA transkribiert werden.

NS5B ist unabhängig von anderen Proteinen integral in die ER-Membran integriert (Schmidt-Mende et al., 2001), wobei die funktionale Domäne in das Zytosol weist. Damit gehört NS5B zu der kleinen Gruppe von Membranproteinen, die als *tail-anchored protein* bezeichnet werden (Kutay et al., 1993).

I.7 HCV-Replikation

Ein großes Hindernis zur Untersuchung der HCV-Replikation und Pathogenese, ist nach wie vor der Mangel eines effizienten Zellkultursystems sowie eines Kleintiermodells. Dennoch konnten durch verschiedene Modellsysteme wertvolle Informationen zur HCV-Replikation gewonnen werden.

I.7.1 Zellkultur

Es gibt einige Berichte über Säugerzelllinien, die HCV geringfügig replizieren können. Zu diesen Zellen gehören u.a. Daudi, MT-2, PBMC, Lymphozyten, sowie Hepatozyten von Mensch und Schimpansen (Bartenschlager und Lohmann, 2000). Der Nachweis erfolgte in der Regel über die schwer zu interpretierende strangspezifische RT-PCR, also den Nachweis von replikativer (-)Strang-RNA oder alternativ über Veränderungen in der Quasispezies. Ein Nachweis der Infektiosität der aus Zellkultur stammenden Hepatitis-C-Viren, war bisher nur eingeschränkt möglich. Schimpansen, die mit Zellkulturüberstand aus Daudi-Zellen infiziert wurden, konnten das Virus zunächst replizieren, waren aber nach einem Zeitraum von 58 Tagen wieder HCV-negativ (Shimizu et al., 1998).

I.7.2 HCV-Replikon

Den ersten großen Durchbruch in der *in vitro* Replikation von HCV stellte das von V. Lohmann im Labor von R. Bartenschlager entwickelte HCV-Replikon dar (Lohmann et al., 1999). Hierbei handelte es sich zunächst um subgenomische HCV-RNA-Moleküle, die selbständig in stabiltransfizierten Zellen replizierten. Das Replikon basierte auf dem Konsensusgenom Con1 [Genotyp 1 – acc. AJ238799], welches aus der Leber eines CHC-Patienten isoliert wurde. Es enthielt zunächst nur die Nichtstrukturproteine, die über eine EMCV-IRES translatiert wurden. Zur stabilen Transfektion wurde anstelle der Strukturproteine ein Neomycin-Resistenz Gen inseriert. Die zunächst moderate Replikation wurde schließlich durch adaptive Mutationen vor allem im NS5A, aber auch im NS3 und NS4B deutlich verbessert (zusammengefasst in Bartenschlager et al., 2003). Das Wildtyp Con1-Genom

ohne adaptive Mutationen repliziert nur sehr ineffizient, ist aber im Gegensatz zum adaptierten Genom in der Lage, infektiöse HCV-Partikel zu produzieren, was Infektionsstudien am Schimpansen gezeigt haben (Bukh et al., 2002).

Zu den Zellen, die das Replikon replizieren, gehört in erster Linie die humane Hepatoma Zelllinie Huh7 (Lohmann et al., 1999), wobei mittlerweile auch effiziente Replikation des Genotyp-2a-Replikons in den nicht hepatischen Zellen 293 (siehe II.12.2) und HeLa beschrieben ist (Ali et al., 2004; Kato et al., 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Derivat der Huh7-Zelllinie „Huh7.5“, die Replikationseffizienz des Con1-Replikons deutlich verbessern konnte. Man nimmt an, dass der hyperpermissive Phänotyp dieser Zellen durch eine Mutation (T55I) einer Komponente der angeborenen Immunität (RIG-I) (Breiman et al., 2005; Yoneyama et al., 2004) hervorgerufen wird (Sumpter et al., 2005), siehe auch I.13.

Im Labor von T. Wakita wurde das erste Genotyp 2-Replikon entwickelt. Dieses subgenomische Replikon wurde aus dem Klon JFH-1 [Acc. No. AB047639] kloniert, welcher ursprünglich aus dem Konsensusgenom eines Patienten mit fulminanter Hepatitis isoliert wurde (Kato et al., 2003). Das JFH-1-Replikon ist in der Lage ohne adaptive Mutationen in Zellkultur zu replizieren (Kato et al., 2003; Kato et al., 2005).

Untersuchungen zum Einfluss von IFN- α auf das Replikon haben gezeigt, dass sowohl das subgenomische, als auch das komplette Replikon hoch sensitiv selbst auf geringe Mengen IFN- α sind (Blight et al., 2000; Frese et al., 2001; Guo et al., 2001; Lanford et al., 2003).

Im Juli 2005 wurde von T. Wakita und R. Bartenschlager ein chimäres Genom vorgestellt, welches die Infektiosität des Con1-Genoms mit der Replikationseffizienz des JFH-1-Genoms verbindet und es erstmalig ermöglicht, effizient infektiöse Partikel *in vitro* zu generieren (Wakita et al., 2005), die sowohl Zellen, als auch Primaten infizieren. Aber auch dieses rekombinante Virus besitzt einen attenuierten Phänotyp. So wurde gezeigt, dass die Infektiosität der rekombinanten Viren nach mehreren Zellkulturpassagen abnimmt und nach Infektion von Schimpansen eine Serokonversion nur zwischen der 2. und 5. Woche nachweisbar war, da diese spontan ausheilten.

I.7.3 HCV-Pseudopartikel (HCVpp)

Einen viel versprechenden Ansatz, die Virusaufnahme zu untersuchen, stellen infektiöse HCV-Pseudopartikel dar (Bartosch et al., 2003; Lavillette et al., 2005; Castet und Moradpour, 2003). Hierbei werden die beiden HCV-Glykoproteine E1 und E2 in die Membran retroviraler Hüllpartikel inseriert. Über einen verpackten grün-fluoreszierenden Proteinmarker kann dann die Infektiosität der Pseudopartikel nachgewiesen werden. Dies ist besonders zur Etablierung eines Neutralisationsassays sehr wertvoll.

I.7.4 Tiermodell

Neben dem Schimpansen gibt es kein effizientes Tiermodell für *in vivo*-Untersuchungen zur HCV-Replikation. Das einzige Modell ist derzeit eine chimäre SCID-Maus, die durch Transplantation von humanen Hepatozyten eine humane Leber generiert hat (Mercer et al., 2001). Das Tupaia (*Tupaia belangeri chinensis*) konnte mit HCV (Genotyp 1a, 1b und 3) infiziert werden, allerdings bei inkonsistenter Virämie und mit geringer Serokonversion (Xie et al., 1998). Studien am Schimpansen haben gezeigt, dass virale RNA

bereits zwei Tage nach Infektion in der Leber, dem primären Ort der viralen Replikation, nachgewiesen werden konnte.

I.7.5 Modell zur HCV-Replikation

Basierend auf den Literaturdaten der verschiedenen Modellsysteme und den bekannten Replikationszyklen anderer Flavi- und Pestiviren wird derzeit folgendes Modell der Replikation von HCV postuliert (siehe Abb. I.5):

Nach Initiierung der Virusaufnahme durch die viralen Glykoproteine E1-E2, wird das Virus rezeptorvermittelt (Endozytose) aufgenommen (Bartenschlager und Lohmann, 2000), wobei die viralen Glykoproteine E1-E2 die Virusaufnahme initiieren (Farci et al., 1996; Rosa et al., 1996; Zibert et al., 1995). Ein zellulärer Rezeptor, der für das Andocken des Virus verantwortlich ist, konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Hierbei scheint ein Komplex aus mehreren Oberflächenproteinen beteiligt zu sein, bei dem der *Scavenger-Receptor Class-B Type-I* (SR-BI) (Bartosch et al., 2003; Scarselli et al., 2002) sowie der LDLR (*low density lipoprotein receptor*) (Agnello et al., 1999; Monazahian et al., 1999) und das CD81 (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003; Wakita et al., 2005) maßgeblich involviert sind, .

Im sauren Milieu des Endosoms kommt es dann vermutlich zu Strukturveränderungen an den Hüllproteinen und damit zur Fusion mit der endosomalen Membran (*uncoating*) (Major et al., 2001). Das Genom gelangt in das Zytoplasma, assoziiert IRES-vermittelt (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993) mit Ribosomen und wird dort von zellulären Polymerasen ribosomal translatiert (Bartenschlager und Lohmann, 2000). Viele Indizien deuten darauf hin, dass die RNA-Replikation, wie bei vielen anderen (+)Strang RNA-Viren (Bolten et al., 1998; Westaway et al., 1997), am ER abläuft (Dimitrova et al., 2003). Der RNA-Replikationskomplex besteht aus einem Verbund aller Nichtstrukturproteine (Dimitrova et al., 2003), wobei das NS5B die eigentliche virale RdRp darstellt. Das virale Genom repliziert an veränderten Membranstrukturen im ER, die als *membranous web* bezeichnet werden (Moradpour et al., 2003). (-)Strang-RNA wird produziert, welche wiederum als Matrize für neue genomische-RNA dient. Die virale Hülle erhält das Virus bereits aus der ER-Membran (Bartenschlager und Lohmann, 2000). Man nimmt weiterhin an, dass sich das Kapsidprotein ausschließlich mit der positiven RNA zu Nukleokapsiden formiert, die dann über Exozytose abgeschnürt werden. Hierbei könnte insbesondere das Transmembranprotein CD81 involviert sein (Bartosch et al., 2003; Flint et al., 1999; Pileri et al., 1998; Roccasecca et al., 2003).

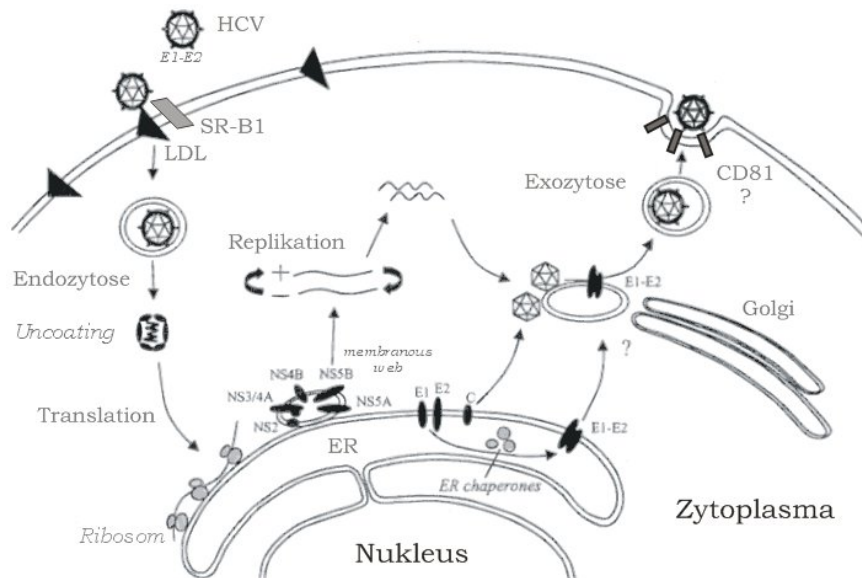


Abb. I.5: Schematische Darstellung des HCV-Replikations Modells. (nach Thomson und Liang, 2000)

I.8 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere wird in zwei Komponenten unterteilt, das angeborene (*innate response*) und das adaptive Immunsystem. Die angeborene Immunität reagiert schnell, aber unspezifisch und wird vor allem durch Komplement, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und dendritische Zellen (DC) vermittelt. Durch Phagozytose der Erreger und Aktivierung des alternativen Komplementsystems, sowie durch Sekretion von Zytokinen (speziell IFN) und Chemokinen wird eine Infektion solange bekämpft, bis sich eine adaptive Immunität ausgebildet hat. Zytokine spielen auch bei der spezifischen Immunität eine wichtige Rolle (Medzhitov und Janeway, 2000).

Die adaptive Immunität stellt die zweite Stufe der Immunantwort dar. Sie benötigt etwa 3–4 Tage zur Reifung und ist dann in der Lage, den Erreger spezifisch vor allem durch klonale Expansion antigenspezifischer Immunzellen zu eliminieren und über ein immunologisches Gedächtnis den Körper vor weiteren Infektionen anhaltend zu schützen. T-Zellen gehören zur zellulären Immunantwort und werden anhand ihrer Rezeptoreigenschaften in $CD4^+$ T-Helferzellen (T_h) oder $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (T_c) eingeteilt. T-Helferzellen werden aufgrund ihrer Produktion und Antwort auf Zytokine in T_{h0} , T_{h1} und T_{h2} Zellen weiter unterteilt. T_{h0} Zellen stellen die naiven Vorläufer der T-Helferzellen dar und werden durch spezifische Zytokinprofile zu T_{h1} oder T_{h2} differenziert. T_{h1} -Zellen induzieren über die Produktion von verschiedenen Zytokinen, insbesondere von Interleukin-2 (IL-2), IFN- γ (IFN- γ) und *tumour-necrosis-factor- α* (TNF- α) die zelluläre Immunantwort. T_{h2} Zellen produzieren vor allem IL 4, 5 und $\tilde{10}$ und unterstützen die humorale Immunantwort.

I.9 Interferon

IFN ist ein Zytokin, welches in der frühen Phase der Immunantwort (*innate response*) als Reaktion z.B. auf eine Virusinfektion gebildet wird. Am Gelbfiebervirus entdeckten Hoskins et al. 1935 ein Phänomen, das sie als Interferenz beschrieben (Lennette, 1951).

Nach Infektion eines Versuchstiers mit einem avirulenten Gelbfiebervirus, war dieses für 24 h, also noch vor dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort, vor einer Infektion mit dem Wildtyp-Virus geschützt. 1957 zeigten Isaacs und Lindenmann, dass IFN für diesen antiviralen Effekt verantwortlich war (Isaacs und Lindenmann, 1987).

Tab. I.3: IFN-Präparate gegen virale Hepatitiden

IFN	Produkt	Hersteller	Infektion
IFN- α 2a	Roferon A	Roche	HCV
IFN- α 2b	Intron A	Schering	HBV, HCV
IFN- α nl	Wellferon	GSK	HCV
IFN- α con	Infergen	Amgen	HCV
PEG-IFN- α 2a	PEG-Intron	Schering	HCV
PEG-IFN- α 2a	Pegasys	Roche	HCV

IFN aktiviert alle Effektorzellen des Immunsystems und hat potente antivirale Eigenschaften, die sowohl das Zellwachstum und Differenzierung regulieren, als auch Apoptose induzierend wirken können (Stark et al., 1998). Daher wird es in der Klinik sowohl zur antiviralen Therapie, als auch zur Tumorsuppression eingesetzt. Derzeit werden humanes IFN- α , - β und - γ in der antiviralen Therapie eingesetzt, wobei sich insbesondere IFN- α bewährt hat (siehe Tab. I.3). Weitere Viruserkrankungen, die mit IFN- α therapiert werden sind u.a. das Kaposi-Sarkom, Feigwarzen (*Condylomata acuminata*), Haarzell-Leukämie, die chronische-myeloische-Leukämie und das maligne-Melanom. IFN- β wird vor allem gegen die multiple Sklerose (MS) und IFN- γ zur Behandlung der erblichen Immunmangelkrankheit der chronischen Granulomatose eingesetzt.

Die Fähigkeit, IFN zu produzieren, ist bei allen Wirbeltieren vorhanden. IFN gehört zu einer Multigenfamilie induzierbarer pleiotropischer Zytokine und wird aufgrund der Aminosäuresequenz, Rezeptorspezifität und des Zelltropismus in Typ-1 und Typ-2-IFN unterteilt.

I.9.1 Typ-1-IFN

Typ-1-IFN, auch als virales IFN bezeichnet, beinhaltet mindestens 14 α -, einen β - und einen ω -Subtyp. Andere Subtypen wie IFN- τ oder IFN- δ wurden bislang nur bei Wiederkäuern oder Schweinen gefunden. Die individuellen Gene im IFN- α -Cluster sind in 80–90 % ihrer Sequenz homolog. IFN- α wird vorwiegend von Leukozyten, speziell von DCs, Makrophagen und hämatopoetischen Stammzellen produziert (Taniguchi und Taakaoka, 2002), IFN- β vorwiegend von Fibroblasten. IFN- α kann nachhaltig Einfluss auf den Verlauf einer Infektion nehmen, in dem es die Immunantwort in Richtung T_{h1} lenkt. Kleine Mengen von Typ-1-IFN werden konstitutiv exprimiert (Hertzog et al., 1994). Die Gene zu IFN- α und - β haben keine Introns und clustern auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 beim Menschen und 4 bei der Maus. Bedeutsam für die antivirale Aktivität sind die Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 1/98 und 29/138 für IFN- α und 31-141 für IFN- β . Man unterscheidet zwischen zwei Gruppen, den *immediate early* Genen, die ohne andauernde Proteinexpression induziert werden können und den *delayed early* Genen (IFN- α 2, IFN- α 5, IFN- α 6 und IFN- α 8), die eine verzögerte Induktion aufweisen und

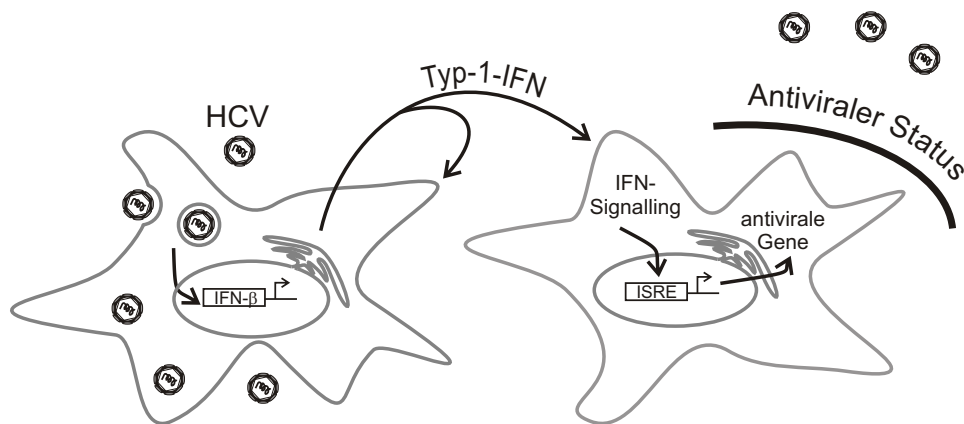


Abb. I.6: Typ-1-IFN generiert einen antiviralen Zustand.

auf Proteinexpression angewiesen sind. Die Gene, die IFN- α und IFN- β codieren, sind in etwa 30 % ihrer Sequenz homolog.

Nach Aktivierung des IFN- β -Promotors durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wird IFN- β produziert «Induktion» und in den extrazellulären Raum sowie die Blutbahn ausgeschüttet. Durch die Bindung von IFN an den entsprechenden Rezeptor werden verschiedene ISGs in den Zielzellen aktiviert «*Signaling*» (siehe Abb. I.6).

Induktion

IFN- β bindet an den Typ-1 IFN-Rezeptor und induziert eine Reihe antiviraler Gene, die die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzen und vor Infektion schützen können (siehe Abb. I.7). Verschiedene konservierte Erregermuster, die dem Wirt fremd sind, z.B. dsRNA oder virale Hüll- und Kapsidproteine, induzieren spezifische Transkriptionsfaktoren (Medzhitov, 2001), von denen u.a. die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR) sehr gut charakterisiert ist. Zu den Transkriptionsfaktoren, die spezifische Motive im IFN- β -Promotor erkennen, zählen IRF-3, DRAF-1, CBP/p300, ATF2/c-Jun (AP1) und NF κ B.

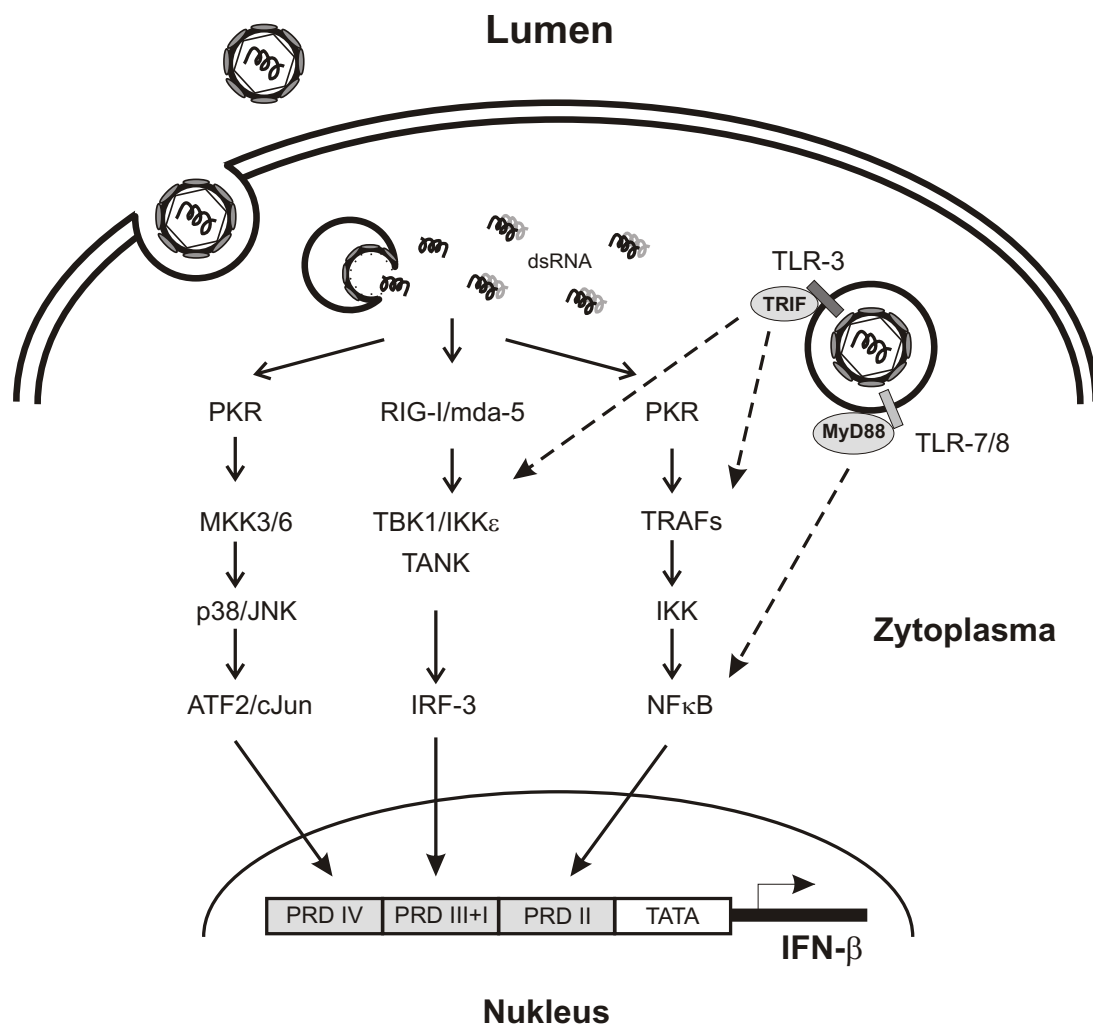


Abb. I.7: Schema der Typ-1-IFN Induktion. Durch Virusinfektion werden verschiedene Signaltransduktionswege induziert. So wirkt dsRNA z.B. auf PKR und RIG-I und induziert die Transkriptionsfaktoren ATF2/cJun, IRF-3 und NF κ B, die wiederum Motive im IFN- β -Promotor binden und transaktivieren. Neben dsRNA könne auch weitere erregerspezifische Muster verschiedene *toll like receptors* (TLRs) induzieren, die wiederum in die gleichen Signalwege eingreifen.

Signaling

Alle Typ-1-IFN binden den gemeinsamen IFN- α -Rezeptor, ein Heterodimer aus den Fragmenten IFNAR1 und IFNAR2 (Roberts et al., 1998) und aktivieren die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade (Jak ist eine Abkürzung für *Janus kinase* und STAT für *signal transducer and activator of transcription*).

Ein Transkriptionsfaktorkomplex, *IFN-stimulated growth factor 3* (ISGF3), bestehend aus STAT-1, STAT-2 und p48 (ISGF3 γ , IRF9), wird gebildet (Girard et al., 2002) und wandert in den Zellkern (siehe Abb. I.8). Die DNA-Bindung von ISGF3 wird über die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne des p48 vermittelt. ISGF3 bindet hierbei an ein 9–11 nt langes Konsensusmotiv (GAAA(N)1/2GAAA(G)0/1), welches als *IFN stimulated response element* (ISRE) bezeichnet wird und im Promotor von vielen IFN-stimulierten Genen (ISG) nachgewiesen wurde (Dale et al., 1989; Geiss et al., 2003). Aktiviert werden die ISG vermutlich über die transaktivierende Domäne (TAD) am carboxyterminalen

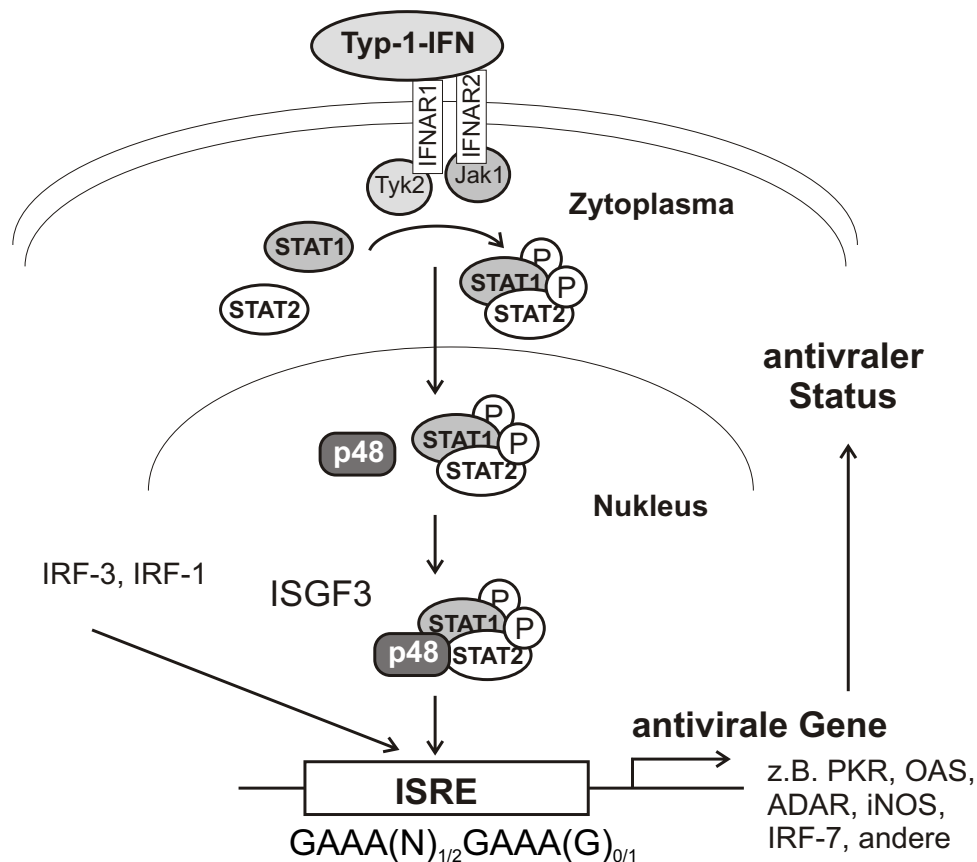


Abb. I.8: Modell der IFN- α/β aktivierten Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade.

Ende des STAT-2 (Leung et al., 1995). Die Kinetik des Typ-1-IFN-Signalings ist sehr schnell, der Transkriptionsfaktor befindet sich schon wenige Minuten nach Stimulation im Zellkern (siehe Abb. I.8).

Viele ISGs bewirken wiederum eine positive Rückkopplung (*feedback*) auf die eigene Kaskade, so fungiert z.B. ISRE-induziertes IRF-7 als Transkriptionsfaktor für IFN- α , welches wiederum an den Typ-1-IFN-Rezeptor bindet und Jak/STAT induziert. Ein weiteres Beispiel ist der Transkriptionsfaktor IRF-1, welcher ein spezifisches Konsensusmotiv (GAAGTGAAGT) bindet, das sowohl im IFN- β -Promotor, als auch in einigen ISRE vorhanden ist.

I.9.2 Typ-2-IFN

Typ-2-IFN (IFN- γ) wird auch als Immun-IFN bezeichnet und wird nur von Zellen des Immunsystems produziert. Es hat keine Homologie zu Typ-1-IFN und codiert ein Protein ähnlicher Größe, in dem bestimmte Aminosäurereste dieselben Positionen wie bei Typ-1-IFN besetzen. Daher ist anzunehmen, dass sich das IFN- γ Gen aus einem gemeinsamen Vorläufer weiter entwickelt hat. IFN- γ ist im Vergleich zu Typ-1-IFN schon in wesentlich geringeren Konzentrationen wirksam.

Im Gegensatz zum viralen IFN, wird IFN- γ hauptsächlich durch Mitogen oder Zytokin (z.B. IL-12) stimuliert. Es wird von fast allen Zelltypen produziert außer von reifen

Erythrozyten, da diese keinen Zellkern besitzen. Die Bindung von IFN- γ an den Rezeptor führt zu einer Homodimerisierung von STAT-1 und bildet den *gamma activated factor* (GAF). GAF wandert in den Zellkern und bindet die *gamma activated site* (GAS) (TTNC(N)₃AA) im Promotor von IFN- γ -aktivierten Genen. Zu den IFN- γ -aktivierten Genen gehören u.a. die Transkriptionsfaktoren IRF-1, IRF-2, p48, and IRF-8.

I.10 Antivirale Wirkungsweise von IFN

IFN sind essentiell für die antivirale Immunantwort bei Wirbeltieren, was u.a. durch Untersuchungen mit transgenen Mäusen, die keinen IFN-Rezeptor besitzen, gezeigt wurde (van den Broek et al., 1995). Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene redundante Mechanismen entwickelt, um virale Infektionen zu bekämpfen: die PKR, die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthase (OAS), Mx, RNA-spezifische Adenosindesaminasen (ADAR1) und eine induzierbare Stickstoff Synthase (iNOS). Darüber hinaus induziert IFN die Synthese weiterer Zellproteine, wobei u.a. MHC-Klasse-I-Rezeptorgene induziert werden, was die Fähigkeit der Antigenpräsentation steigert. Eine Übersicht der antiviralen Mechanismen ist in Abb. I.9 dargestellt.

I.10.1 dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR)

Die PKR, ursprünglich auch als DAI oder dsI bezeichnet, ist eine Serin-, Threoninkinase mit verschiedenen regulatorischen Eigenschaften hinsichtlich zellulärer Transkription und Translation und wirkt u.a. als Apoptoseinduktor und Tumorsuppressor (Proud, 1995; Tan und Katze, 1999). PKR wird normalerweise konstitutiv exprimiert und ist inaktiv. Am N-Terminus befinden sich zwei konservierte dsRNA-Bindemotive. Aktivierung durch dsRNA führt zur Autophosphorylierung und Dimerisierung. Die antivirale Aktivität wird durch die Phosphorylierung der α -Untereinheit des GTP bindenden eukaryontischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 α) am Ser51 ausgelöst. eIF2 α konvertiert so in einen kompetitiven Inhibitor des Nukleotidaustauschfaktors eIF2B, was wiederum zu einer Inhibition der zellulären Proteinsynthese und somit auch zum Arrest der viralen Replikation führt (Samuel, 2001).

Eine weitere Eigenschaft der PKR ist die Aktivierung von IFN- β über NF κ B. NF κ B ist konstitutiv exprimiert und wird durch seinen Inhibitor I κ B im Zytoplasma festgehalten. Aktivierte PKR phosphoryliert I κ B, so dass dieser nicht mehr an NF κ B binden kann. NF κ B kann nun in den Zellkern wandern und IFN- β induzieren. Viele Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, den antiviralen Effekt der PKR zu unterbinden (siehe I.10).

I.10.2 2'-5'-Oligoadenylatsynthase (OAS)

Die Aktivierung der OAS durch IFN führt zum Abbau von ssRNA durch RNase L. Eine Induktion der 2'-5'-OAS führt zur Veresterung von bis zu fünf ATP-Resten zu Oligoadenylaten. Diese binden RNase L und aktivieren sie. Exogene ssRNA ist, im Gegensatz zu der im Wirt nicht präsenten dsRNA, nur schwer bis gar nicht von der wirtseigenen RNA zu unterscheiden, so dass die zelluläre mRNA abgebaut wird. Auch wird nicht jede virale ssRNA von der RNase erkannt.

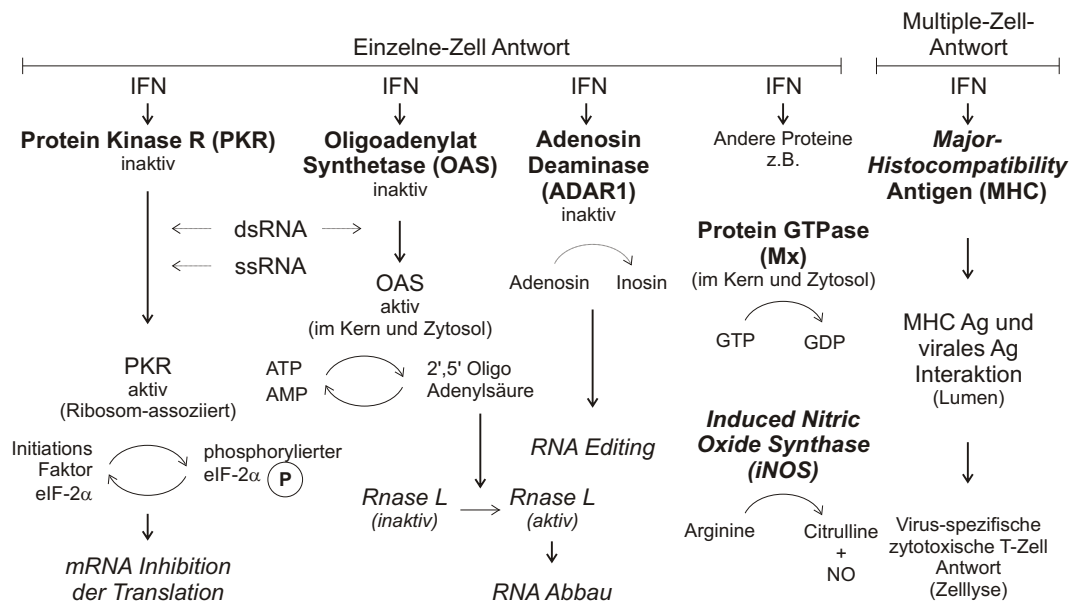


Abb. I.9: Übersicht antiviraler Mechanismen der IFN-Antwort. (nach Samuel, 2001).

Zu den viralen RNAs, die von RNase L abgebaut werden können, sind HIV-TAR- und Adenovirus-VA-RNA gut charakterisiert (Samuel, 2001).

I.10.3 Mx-Proteine

Mx-Proteine sind 70–80 kD große GTPasen der Dynamamin-Superfamilie und werden ebenfalls durch IFN induziert. Speziell (-)Strang-RNA-Viren, wie z.B. Influenza- und Thogoto-Viren, sind Mx-sensitiv. Man nimmt an, dass Mx seine antiviralen Eigenschaften durch Interaktion mit der viralen RNA-Polymerase ausübt. Ein Einfluss auf HCV-Replikation ist für Mx nicht beschrieben.

I.10.4 ADAR1

ADAR1 bewirkt eine posttranskriptionelle RNA-Modifikation. Hierbei wird virales und zelluläres Adenosin zu Inosin desaminiert. Die Base des Nukleotids Inosin ist Hypoxanthin und wird von zellulären und viralen Polymerasen als Guanin erkannt, was eine Degenerierung des genetischen Codes zu Folge hat. Zusätzlich wird inosinhaltige RNA von spezifischen RNasen erkannt und abgebaut (Samuel, 2001).

I.10.5 iNOS

Die Induktion von Stickoxiden durch die iNOS ist eine Eigenschaft aktivierter Makrophagen und wird speziell durch IFN- γ induziert. Neben den Stickoxiden wird durch Oxidation, Reduktion und Adduktion reaktiver Stickstoff produziert, der zytotoxisch wirkt und virale Replikation in Makrophagen unterbindet (Samuel, 2001).

I.11 Inhibition der IFN-Antwort

Da die IFN-induzierten Effekte auf die Dauer toxisch wirken, muss das Immunsystem in der Lage sein, die induzierten Kaskaden wieder herunterzuregulieren. Zu diesen natürlichen IFN-Antagonisten gehören die SH2-Phosphatasen (SHP), die *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS) und *suppressors of cytokine Signaling* (SOCS) (Wormald und Hilton, 2004). SHP-1 wird konstitutiv exprimiert und kann aktiviertes-Jak oder tyrosinphosphorylierte Rezeptoren dephosphorylieren. PIAS wird ebenfalls konstitutiv exprimiert und sumoyliert STAT, was zu einer Inhibition von STAT-induzierten Genen führt. SOCS können Jak ubiquitinylieren, so dass diese proteasomal abgebaut werden.

Auch einzelne Zytokine sind mit einer Inhibition der IFN-Antwort assoziiert. IL-8 ist ein chemotaktisches CXC-Chemokin, welches primär durch IL-1 und TNF- α von verschiedenen Zellen, z.B. Fibroblasten und Hepatozyten, induziert wird. Es gilt als primärer Vermittler der inflammatorischen Immunantwort gegen virale und bakterielle Infektionen und regelt IFN-*Signaling* herunter (Khabar et al., 1997).

IRF-8 (ICSBP) bindet an das ISRE-Promotormotiv und kann somit IFN-*Signaling* inhibieren (Nelson et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass eine exogene Expression von IRF-8 in der humanen embryonalen Karzinomzelle N-Tera2 den antiviralen Effekt von IFN auf HIV und VV antagonisieren kann. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in diesem Zusammenhang auch für IRF-2 gezeigt (Nelson et al., 1993).

I.12 Virale IFN-Antagonisten

Viele Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, die IFN-induzierten antiviralen Eigenschaften des Wirts zu antagonisieren (Alcami und Koszinowski, 2000; Goodbourn et al., 2000; Katze et al., 2002). So haben Viren im Laufe der Evolution Komponenten des IFN-Systems in das eigene Genom integriert. Pocken-Viren kodieren z.B. für eine lösliche Form des zellulären IFN-Rezeptors, der IFN absättigt bevor es seinen Rezeptor binden kann (Symons et al., 1995). Andere Viren, vornehmlich RNA-Viren, haben IFN-Antagonisten hervorgebracht die sowohl IFN-Synthese, *Signaling* oder den Effekt einzelner IFN-induzierter Proteine inhibieren können. Als Modellsystem zur Untersuchung von IFN-Antagonisten hat sich vor allem das Influenza-Virus hervorgetan. Schon die Entdeckung von IFN durch Isaacs und Lindenmann (Isaacs und Lindenmann, 1957) basierte auf Untersuchungen mit einem hitzeinaktivierten Influenza-Virus auf Hühnerzellen. Der antivirale Effekt von IFN auf das Virus wird hier vor allem durch die Mx-Proteine vermittelt (Haller et al., 1998). Dennoch richten sich die IFN-antagonisierenden Eigenschaften von Influenza nicht primär gegen Mx-Proteine, sondern greifen bereits früher, bei der IFN-Induktion, an. So inhibiert das NS1-Protein von Influenza A die Phosphorylierung und Aktivierung von IRF-3 und verhindert die Induktion von IFN- β (Talon et al., 2000). Obwohl NS1 viele Funktionen für das Virus wahrnimmt, ist es kein essentielles Protein. Ein rekombinantes Influenza-Virus (delNS1) ohne NS1 wächst nur in IFN-defizienten Systemen effizient, z.B. in 6-Tage alten embryonierten Hühnereiern oder Vero-Zellen (Garcia-Sastre et al., 1998). Somit ist delNS1 ein wertvolles Werkzeug, um putative IFN-Antagonisten funktionell zu untersuchen. Basler et al., 2003 benutzen das delNS1 Virus, um Ebola-Proteine auf IFN-Antagonismus zu untersuchen und identifizierten das VP35-Protein als funktionellen IFN-Antagonisten des Ebola-Viruses (Basler et al., 2000). Analog zum NS1-Protein von Influenza inhibiert auch

VP35 die Aktivierung von IRF-3 (Basler et al., 2003).

IFN-*Signaling* kann durch die Inhibition jeder einzelnen Komponente des Jak/Stat-Pathways unterbunden werden. So inhibiert z.B. das M27-Protein des murinen Zytomegalievirus Jak/Stat-*Signaling* durch proteasomalen Abbau von STAT-2 (Zimmermann et al., 2005; Khan et al., 2004). Andere Viren z.B. Polio, HBV, Reo, Vaccinia oder Adeno inhibieren direkt die antiviralen Mechanismen, die durch den Jak/Stat-Pathway induziert werden (PKR, Mx, OAS, iNOS, ADAR1).

Eine tabellarische Übersicht viraler IFN-Antagonisten und deren Mechanismus findet sich im Anhang (siehe A.1). Es ist bekannt, dass Viren IFN auf verschiedenen Ebenen gleichzeitig antagonisieren können, insbesondere das VV hat hierfür multiple Mechanismen entwickelt. Für das BRSV sind zwei Proteine, NS1 und NS2, in Kombination notwendig, um die IFN-Induktion zu inhibieren, ein jedes für sich hat keine IFN-antagonisierenden Eigenschaften. Der Mechanismus der IFN-Antagonisierung ist sehr spezifisch auf den Wirt abgestimmt, so kann z.B. hCMV humanes IFN antagonisieren, nicht aber murines. Entscheidend für das Virus ist die Balance, eine Infektion zu etablieren ohne den Wirt so zu schädigen, dass die eigene Verbreitung gefährdet ist.

I.13 HCV und das IFN-System

Ein spezifischer Mechanismus, durch den HCV die antivirale IFN-Antwort außer Kraft setzt, ist nicht bekannt. Ein großes Hindernis, den Einfluss des HCV auf das IFN-System zu untersuchen, ist der Mangel eines effektiven Zellkultursystems. Daher beschränken sich Untersuchungen zur Interaktion von HCV und dem IFN-System auf Modellsysteme. Dies hat bisher zu einer Vielfalt von teils widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Bislang sind vier HCV-Gene mit einer Inhibition des IFN-Systems in Verbindung gebracht worden: Core, E2, NS3/4A und NS5A (diskutiert in Hofmann et al., 2005; Taylor, 2000). Für alle wurde gezeigt, dass sie die IFN-Induktion *in vitro* inhibieren können, HCV-Core und NS5A werden auch mit einer Inhibition des IFN-*Signalings* in Verbindung gebracht (Duong et al., 2004; Blindenbacher et al., 2003; Heim et al., 1999). Heim und Kollegen konnten zeigen, dass HCV das IFN-*Signaling* im Jak/Stat-Pathway inhibieren kann (Heim et al., 1999). Hierbei wurde die IFN- α induzierte Aktivierung von ISGF3 vollständig inhibiert. Die Ursache hierfür konnte allerdings nicht eindeutig identifiziert werden. Bei den Untersuchungen wurde das gesamte HCV-Genom exprimiert, wobei nur das Core-Protein im Westernblot bestätigt werden konnte.

Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass virales Genom aus NR-Isolaten OAS herunterregelt, aber Isolate von SVR-Patienten nicht (Murashima et al., 2000; Murashima et al., 1999), auch hier gibt es konträre Ergebnisse (Pawlotsky et al., 1998a). Weitere ISG, die durch HCV herunterregelt werden können sind die Mx-Proteine (Antonelli et al., 1999) und der IFN- α Rezeptor (Yatsushashi et al., 1999).

Untersuchungen von Leberbiopsaten von HCV-Patienten zeigte eine erhöhte Expression der Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Duong et al., 2004). Funktional wurde in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt, dass Überexpression von PP2A zu einer verminderten Methylierung von STAT-1 führt. Hypomethyliertes STAT-1 assoziiert hierbei mit PIAS1 und unterbindet somit die DNA-Bindung von STAT-1.

Auf die Interaktionen einzelner HCV-Proteine mit dem IFN-System wird nun im Folgenden eingegangen. Eine Übersicht der wesentlichen Interaktionen von HCV-Proteinen

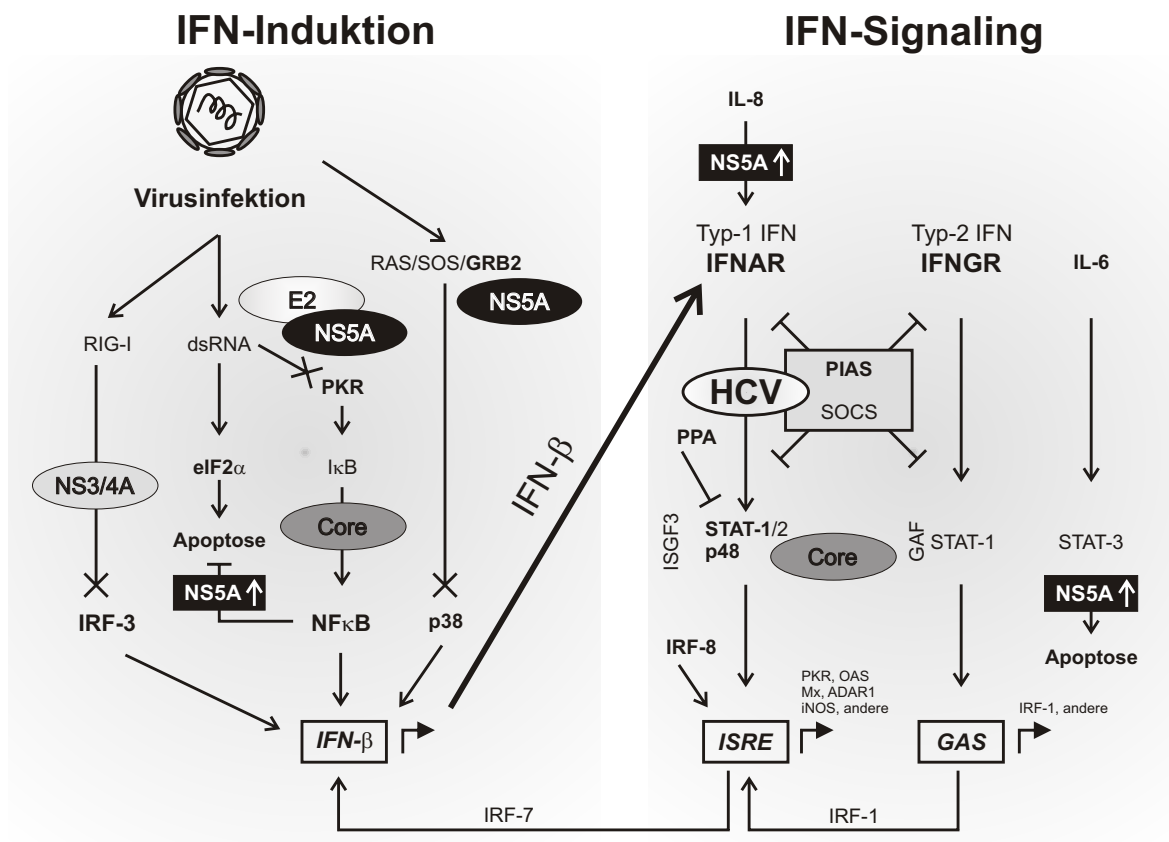


Abb. I.10: Schematische Übersicht der Interaktionen von HCV mit dem IFN-System.

mit dem IFN-System ist in Abb. I.10 schematisch dargestellt.

HCV-Core

Für das HCV-Core ist ein Einfluss auf IFN-Induktion beschrieben, wobei abhängig von individuellen Versuchsbedingungen, HCV-Core den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ sowohl stimulieren (Chung et al., 2001; Kim et al., 2001; Kato et al., 2000), als auch inhibieren konnte (Frese et al., 2001). Dennoch überwiegen die Beobachtungen, dass HCV-Core IFN inhibiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass HCV-Core durch direkte Interaktion mit $\text{IKK}\beta$ die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung inhibieren und somit $\text{IFN}\beta$ -Induktion blockieren kann (Joo et al., 2005).

Ein Einfluss auf *IFN-Signaling* wurde ebenfalls gezeigt (Hosui et al., 2003; Bode et al., 2003; Basu et al., 2001), allerdings sind die Beobachtungen auch hier widersprüchlich. Es ließ sich zeigen, dass HCV-Core die ISRE- und GAS-Bindung sowie die Tyrosinphosphorylierung von STAT-1 fördern und die Transkription von OAS, iNOS und IRF-1 stimulieren kann (Miller et al., 2004; Dansako et al., 2003), aber andererseits auch in der Lage ist, die ISRE-aktivierten Gene zu inhibieren (de Lucas et al., 2005). Ebenfalls wird eine direkte Interaktion von HCV-Core mit STAT-1 postuliert, die zu einem proteasomalen Abbau von STAT-1 und pSTAT-1 führt (Lin et al., 2005).

HCV-E2

Für das Hüllprotein E2 wurde gezeigt, dass es die PKR *in vitro* binden und IFN- β -Induktion genotypabhängig inhibieren kann. Im Hefesystem blockiert die PePHD aus HCV-1a/b die Inhibition der Proteinsynthese, wohingegen PePHD aus HCV-2 und -3 hierzu nicht in der Lage ist. Die Sequenzen in der PePHD der IFN-resistenten Genotypen entsprechen eher denen der PKR und der eIF2 α (Taylor et al., 1999). Dieser Effekt könnte die relative Therapieresistenz von Genotyp 1 (im Vergleich zu 2 und 3) erklären, nicht aber Unterschiede in den einzelnen Isolaten innerhalb eines Genotypes. Der Effekt ist nicht absolut, da auch Patienten mit einer PKR inhibierenden PePHD auf Therapie ansprechen und umgekehrt (Taylor, 2000).

Das E2-Protein gehört zu den variabelsten HCV-Proteinen, was auch damit zusammenhängt, dass es als virales Glykoprotein dem Immunsystem präsentiert wird. Die HVR1-Region enthält eine Reihe von Epitopen, die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden. Interessanterweise kommt es auch unter IFN-Therapie zu Veränderungen in der HVR1-Quasispezies (Pawlotsky et al., 1998b; Enomoto et al., 1994). Untersuchungen an HCV-Patienten, die eine Lebertransplantation erhalten haben, zeigten, dass ein hoher Grad an Diversität in der HVR mit NR und ein homogener Quasispeziespool mit SVR assoziiert ist (Okada et al., 1992).

HCV-NS3/4A

Kürzlich wurde gezeigt, dass HCV-NS3/4A die Phosphorylierung des IFN *regulating factor-3* (IRF-3) inhibieren und somit die Verlagerung von IRF-3 in den Zellkern unterbinden kann, welches die IFN- β -Induktion inhibiert (Foy et al., 2003). IRF-3 kann zum einen über *toll-like* Rezeptoren (TLR) (reviewed in Bowie und Haga, 2005) induziert werden, aber auch TLR-unabhängig über den kürzlich entdeckten *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I)-*Pathway* (Yoneyama et al., 2004). NS3/4A inhibiert beide Signaltransduktionswege. Funktional bestätigt wurden diese Untersuchungen durch die Wiederherstellung der IFN-Induktion durch den NS3/4A Proteaseinhibitor *BILN-2061* (Foy et al., 2005).

HCV-NS5A

Eine wachsende Anzahl an Studien postuliert einen Zusammenhang zwischen NS5A und IFN-Resistenz (zusammengefasst in He und Katze, 2002; Macdonald und Harris, 2004; Tan und Katze, 2001). Speziell der damit verbundene Einfluss von NS5A auf die IFN-Therapie wird immer noch kontrovers diskutiert. Einige der Eigenschaften des NS5A sind ebenfalls für das E2 Protein beobachtet worden. So wurde gezeigt, dass NS5A und E2 die PKR in Hefen binden (Gale et al., 1997; Gale et al., 1998) und inhibieren können (Gale et al., 1997; Lohmann et al., 1999). Der Phosphorylierungsstatus von NS5A hatte in diesen Untersuchungen keinen Einfluss. Die Interaktion war spezifisch und konnte durch die Einführung von Mutationen im NS5A wieder unterbunden werden. Die Autoren spekulierten, dass NS5A analog zum zellulären PKR-Inhibitor p58^{IPK} die Formation von Homodimeren inhibieren kann (Gale et al., 1998). Dennoch ist eine biologische Relevanz dieser Interaktion strittig, da NS5A und PKR in Leberzellen nicht co-lokalisieren und die Bindung *in vivo* auch nicht durch eine Immunpräzipitation aus Zelllysaten bestätigt werden konnte (Podevin et al., 2001).

Basierend auf statistischen Daten wurde eine Region des NS5A (2209-2248) als prognostischer Marker für den Therapieerfolg postuliert und als „*IFN sensitivity determining region*“ ISDR bezeichnet (Enomoto et al., 1995). Enomoto et al., 1996 brachten die Anzahl von Mutationen in der ISDR (relativ zu einer Genotyp 1b Referenzsequenz: HCV-J [D50480]) in Zusammenhang mit der Therapierbarkeit von chronischen HCV-Patienten in Japan. Isolate mit weniger als vier Mutationen in der ISDR wurden als Wildtyp bezeichnet und waren Therapieversagern zugeordnet, während der *mutant type* mit vier oder mehr Austauschungen mit Therapieerfolg korrelierte. Die statistischen Daten wurden in einer umfangreichen Metastudie als signifikant bestätigt (Pascu et al., 2004), sind aber ähnlich wie die PePHD im E2 nicht absolut. Interessanterweise ist die putative ISDR Bestandteil der PKR-Bindedomäne und steht somit auch funktional in direktem Zusammenhang mit der Regulation der IFN-Antwort. Allerdings sind konträr zur ISDR-Hypothese auch Wildtyp-Sequenzen bei Patienten beschrieben, die auf Therapie ansprechen, sowie *mutant type* Sequenzen bei Therapieversagern (Herion und Hoofnagle, 1997; Zeuzem et al., 1997). Somit ist ein direkter funktionaler Zusammenhang zwischen der ISDR und Therapieansprechen unwahrscheinlich. Auch funktionale Daten zur ISDR sind widersprüchlich. So wurde in so genannten *trans-rescue*-Experimenten gezeigt, dass eine NS5A-Deletionsmutante ohne ISDR virales Wachstum auf IFN-behandelten Zellen ebenso effizient wiederherstellen kann, wie das komplette Protein (Polyak et al., 1999). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass NS5A eines NR-Patienten EMCV-Wachstum wiederherstellen kann, NS5A eines SVR-Patienten jedoch nicht. Diese Daten konnten aber nur teilweise bestätigt werden, da in der gleichen Arbeit die selben NS5As in der Lage waren, VSV-Wachstum unter IFN-Behandlung wiederherzustellen. Die Beobachtung, dass NS5A EMCV bzw. VSV-Wachstum auf IFN-behandelten Zellen wiederherstellen kann, konnte auch von anderen Gruppen bestätigt werden (Aizaki et al., 2000; Podevin et al., 2001).

Ebenso wurde gezeigt, dass NS5A von NR-Patienten den antiviralen Effekt von IFN auf das Sendai-Virus (SeV) antagonisieren konnte, während NS5A von SVR-Patienten hierzu nicht in der Lage war (Aizaki et al., 2000; Polyak et al., 1999). Allerdings gibt es auch hier Daten, die exakt das Gegenteil zeigen (Paterson et al., 1999). NS5A war weiterhin in der Lage, die virale Proteinsynthese in VSV-infizierten, stabiltransfizierten HeLa-Zellen wiederherzustellen, sowie in HeLa-Zellen, die mit einer NS5A-exprimierenden Vaccinia-Virus-Rekombinante infiziert wurden (Taylor et al., 1999; He et al., 2001).

Eine Region *downstream* der PKR-Bindedomäne (aa 2353-2376) wird ebenfalls mit IFN-Sensitivität in Verbindung gebracht. Sequenzen von Patienten mit NR sind in dieser Region konserviert, wohingegen Sequenzen von SR-Patienten hier stark variieren (Duverlie et al., 1998). Die Region wird als V3 bezeichnet. Ein funktionaler Zusammenhang von V3 und Therapieantwort konnte bislang allerdings nicht gezeigt werden.

Beobachtungen, dass NS5A IL-8 mRNA in HeLa und Huh7 Zellen hoch reguliert und auch die Serum Level von IL-8 Level bei chronischen HCV-Patienten erhöht sind, sprechen dafür, dass NS5A IFN-hemmende Eigenschaften besitzt (Polyak et al., 2001b). IL-8 wurde bereits im Zusammenhang mit dem EMCV als natürlicher IFN-Antagonist beschrieben (Khabar et al., 1997).

Es gibt auch Untersuchungen, die zeigen, dass NS5A IFN-*Signaling* inhibieren kann. In *Microarray*-Untersuchungen wurden Huh7 Zellen, die NS5A stabil exprimieren, mit Kontrollzellen verglichen. 50 von 6300 untersuchten Genen wurden in diesen Untersuchungen durch IFN hochreguliert. Die Stimulation von 9 dieser 50 Gene wurde durch

NS5A inhibiert. Dies betraf speziell das OAS (Girard et al., 2002). Weitere *Microarray*-Untersuchungen wurden von Geiss et al., 2003 durchgeführt. Hier wurde gezeigt, dass NS5A 14 von ca. 50-60 IFN-stimulierten Genen in Huh7, Hela und primären Leberzellen inhibieren kann (Geiss et al., 2003). Die Bildung und der Kernimport des Transkriptionsfaktors ISGF3 waren allerdings nicht beeinträchtigt. Die STAT-1 Expression war auf NS5A-exprimierenden Zellen unverändert, aber es wurde eine verminderte p48-Expression beobachtet. Untersuchungen im Replikonsystem zeigten eine Inhibition der IFN-Induktion, aber keine Inhibition des IFN-Signalings durch das komplette HCV-Genom (Geiss et al., 2003).

Eine weitere Komponente des IFN-*Signalings*, der IFN- γ aktivierte IRF-1, kann durch NS5A inhibiert werden, was sich vor allem negativ auf die iNOS auswirkt (Pflugheber et al., 2002). Somit könnte NS5A auch einen positiven *Feedback*-Mechanismus des IFN-Systems inhibieren.

Ein weiteres Zytokin, welches durch NS5A hochreguliert werden kann, ist IL-8 (Polyak et al., 2001a). IL-8 ist ein natürlicher Antagonist des IFN-*Signalings* und erhöhte IL-8-Level wurden sowohl in NS5A-exprimierenden HeLa-Zellen (Polyak et al., 2001a), als auch bei NR-Patienten beobachtet (Polyak et al., 2001b). Girard et al., 2002 zeigten wiederum, dass in Huh7 Zellen IL-8 Induktion durch NS5A inhibiert werden kann.

I.14 Zielstellung

Für das Hepatitis-C-Virus (HCV) sind viele Mechanismen beschrieben, die antivirale Interferon (IFN)-Antwort zu inhibieren. Das Verständnis der involvierten Mechanismen eröffnet neue Möglichkeiten zur Entwicklung alternativer Therapieansätze. Da einige HCV-Isolate auf IFN-Therapie ansprechen, ist die Hoffnung gross, die viralen Strategien der IFN-Antagonisation zu umgehen. Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung molekularer Faktoren, die es HCV ermöglichen, die antiviralen Eigenschaften von IFN zu antagonisieren und somit der Therapie zu entgehen. Hierbei ist von besonderem Interesse, welche molekularen Mechanismen dazu führen, dass Patienten mit chronischer Hepatitis C (CHC) unterschiedlich auf IFN-Therapie ansprechen.

Als Grundlage zur molekularen Charakterisierung dienen Seren von HCV-Patienten, die uns im Rahmen von klinischen Studien bereitgestellt wurden. Basierend auf den Literaturdaten wird der Schwerpunkt zur Analyse eines potentiellen IFN-Antagonisten auf das NS5A-Protein gelegt. Mit Hilfe der klinischen Daten zum Therapieverlauf soll ein möglicher Zusammenhang von Funktion und Therapieansprechen untersucht werden. Da für verschiedene Genotypen ein unterschiedliches Therapieansprechen beschrieben ist, sollen auch differente NS5A-Proteine, insbesondere der Genotypen 1 und 3, hinsichtlich ihres Einflusses auf das IFN-System in beiden Reportersystemen untersucht werden.

Fokus dieser Untersuchungen soll die Charakterisierung eines molekularen *targets* sein. Hierbei sind die Komponenten des IFN-induzierten Transkriptionsfaktors ISGF3, *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-1, STAT-2 und p48 von besonderem Interesse. Zur Analyse eines putativen Motivs sollen Mutagenesestudien durchgeführt werden. Deletionsmutanten ohne die beschriebenen Domänen *IFN sensitivity determining region* (ISDR), Protein Kinase R (PKR)-Bindedomäne und V3 sollen funktional charakterisiert werden.

Da es bisher nicht möglich ist, HCV effizient *in vitro* zu replizieren, soll eine biologische Relevanz der IFN-Antagonisierung von NS5A am Modell des IFN-sensitiven rekombinanten Influenza-Virus „delNS1“ untersucht werden.

