

# IV

## Ergebnisse

Mit Hilfe von Reporterassays wurde der Einfluss einzelner klonaler HCV-Proteine auf die IFN-Antwort untersucht. Basierend auf den Literaturdaten wurde der Fokus hierbei auf das NS5A-Protein gelegt. Als Grundlage zur molekularen Charakterisierung dienten Patientenseren, die im Rahmen von klinischen Studien von unserem Kooperationspartner PD Dr. T. Berg am Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin asserviert wurden. Zur funktionalen Charakterisierung wurden die Proteine im eukaryontischen System zur Expression gebracht und zunächst in zwei unterschiedlichen Reportersystemen untersucht. Da für das NS5A eine PKR-Bindung charakterisiert ist und ein Zusammenhang von Mutationen in der ISDR mit dem Verlauf der IFN-Therapie besteht, wurde zunächst der Einfluss auf die IFN-Induktion untersucht.

### IV.1 Vorbereitung

Als Expressionssystem für die Reporterassays wurde der eukaryontische Expressionsvektor pCAGGS (Niwa et al., 1991) gewählt, da dieser bereits für verschiedene Reportersysteme etabliert ist (Basler et al., 2003; Yokoyama et al., 1997) und der verwendete Promotor ( $\beta$ -Actin) gute Expressionraten in den zu untersuchenden Zelllinien liefert.

Für die Reporterassays wurden verschiedene NS5A-Klone von Patienten mit unterschiedlichem Therapieerfolg isoliert und in pCAGGS kloniert. Da der virale Genotyp stark mit der Therapieantwort assoziiert ist (siehe I.4), wurden NS5A-Klone unterschiedlicher Genotypen analysiert. Speziell der HCV-Genotyp 1a/b ist mit einer NR assoziiert und war daher von besonderem Interesse. Der HCV-Genotyp 3 korreliert stärker mit einer SVR und ist in Deutschland weniger stark vertreten, daher standen hierfür nur wenige Patientenseren mit einer gut charakterisierten Therapieantwort zur Auswahl. Der HCV-Genotyp 2 verhält sich in Bezug auf den Therapieverlauf ähnlich wie HCV-Genotyp 3, spielt aber in Deutschland eine untergeordnete Rolle und wurde daher für diese Untersuchungen nicht in Betracht gezogen. Gleiches gilt für die Genotypen 4 bis 6, die in ihrem Einfluss auf das Therapieansprechen vergleichsweise schlecht charakterisiert sind.

### IV.1.1 Klonierung von NS5A

Zunächst wurde NS5A-cDNA aus insgesamt 9 Patientenseren der HCV-Genotypen 1a/b und 3 isoliert. Zwei Seren stammten hierbei von Patienten mit einer SVR, eines von einem BT Patienten und 6 von NR-Patienten. Die Daten zur Therapieantwort (siehe Tab. IV.1) wurden an der Charité im Rahmen von klinischen Studien erhoben.

**Tab. IV.1: Patientendaten zur Therapieantwort**

Patienten Code	HCV- Genotyp	Therapie- ansprechen	Viruslast[Woche]			
			t <sub>0</sub> [IU/ml]	t <sub>2</sub> [IU/ml]	t <sub>12</sub> [IU/ml]	t <sub>20</sub> [IU/ml]
106214	1a	NR	6.120.000	502.000	58.400	175.000
107881	1b	NR	28.900.000	7.480.000	908.000	1.490.000
108413	1b	NR	17.700.000	657.000	1.510.000	7.890.000
108414	1b	NR	5.440.000	524.000	30.400	972.000
109734	1a	BT	2.340.000	18.400	0	259.000
110072	1b	NR	1.980.000	593.000	659.000	3.220.000
111275	1a	SR	12.100.000	0	0	0
103626	3a	SR	keine Angaben			
104113	3a	NR	1.820.000	453.000	97.100	800.000

Nach Isolation von HCV-RNA aus dem Patientenserum wurde ein subgenomisches Fragment, welches u.a. den NS5A Leserahmen enthält, in cDNA umgeschrieben. *Nested-PCR* Primer, zur Amplifikation von NS5A aus Patientenserum, wurden unter Verwendung von genomischen HCV-Sequenzen aus der PubMed-Datenbank entworfen. Da die Sequenzen der verschiedenen Isolate zunächst noch nicht bekannt waren, wurde die amplifizierte cDNA über TA-Klonierung in pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His (Invitrogen) inseriert und sequenziert, um dann in pCAGGS subkloniert zu werden. Der pCAGGS-Vektor besitzt keine MCS und für die Klonierung ist nur eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle vorgesehen.

Die Sequenzanalyse der in pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His klonierten NS5A-Leseraster zeigte, dass einige NS5A-Klone des Genotyps 1a/b bereits eine oder mehrere EcoRI-Schnittstellen (G'AATTC) aufwiesen, so dass die Subklonierung in pCAGGS über eine alternative Endonuklease (MunI bzw. MfeI) erfolgte. MunI-Schnittstellen (C'AATTG) wurden in keinem untersuchten NS5A-Leseraster gefunden und die produzierten Überhänge (AATT) sind zum EcoRI kompatibel. Im NS5A-Leseraster von Genotyp 3-Isolaten wurden keine EcoRI-Schnittstellen gefunden, so dass hier über EcoRI kloniert werden konnte. Eine Übersicht der Klonierung ist in Abb. IV.2 dargestellt.

Alle Plasmide wurden endotoxinfrei präpariert, da bakterielles Endotoxin, speziell LPS, Einfluss auf die zu untersuchenden Signalwege haben könnte.

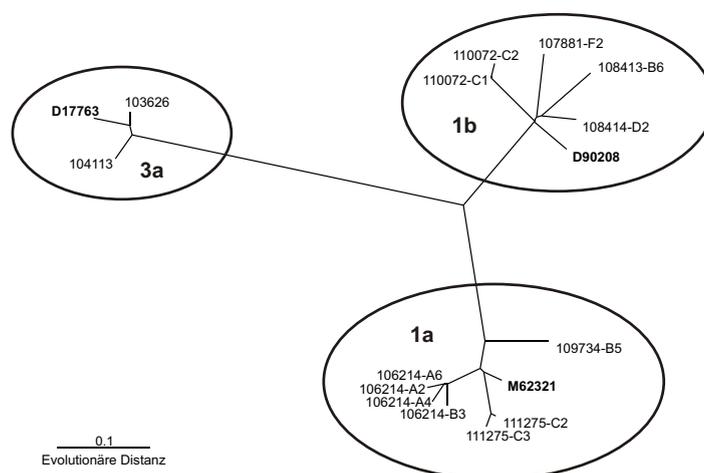
Von einzelnen Patienten wurden unter Berücksichtigung der Quasispeziespopulation zusätzlich differente NS5A-Proteine mit einbezogen. Insgesamt wurden 14 unterschiedliche

NS5A Leserahmen kloniert und sequenziert. Eine Übersicht der in pCAGGS klonierten NS5A-Leserahmen ist in Tabelle IV.2 dargestellt.

**Tab. IV.2: Übersicht der pCAGGS-NS5A-Klone**

NS5A-Klon	HCV-Genotyp	Therapieansprechen	Länge	Antikörper	MW
106214-A2	1a	NR	450 aa	Serum, IBT	56 kD
106214-A4	1a	NR	450 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
106214-A6	1a	NR	450 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
106214-B3	1a	NR	450 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
109734-B5	1a	BT	450 aa	Serum, IBT	56 kD
111275-C2	1a	SVR	450 aa	Serum, Biogenesis	56 kD
111275-C3	1a	SVR	450 aa	Serum, Biogenesis	56 kD
107881-F2	1b	NR	449 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
108413-B6	1b	NR	449 aa	Serum, Biogenesis	56 kD
108414-D2	1b	NR	449 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
110072-C1	1b	NR	449 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
110072-C6	1b	NR	449 aa	Serum, IBT, Biogenesis	~58 kD
103626	3a	SVR	453 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD
104113	3a	NR	453 aa	Serum, IBT, Biogenesis	56 kD

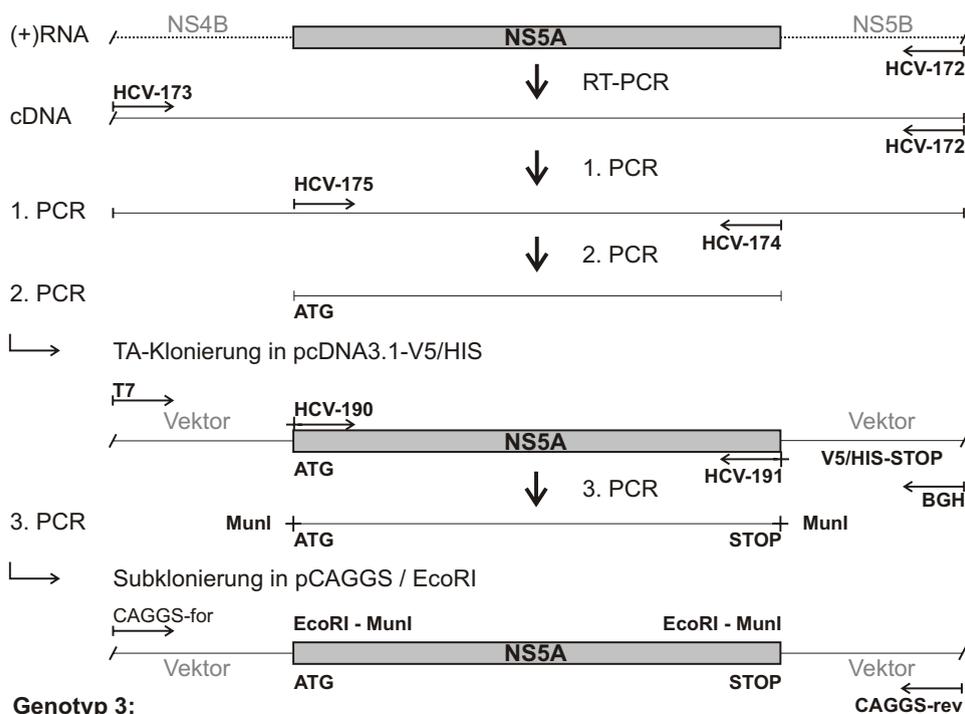
Der virale Genotyp der einzelnen HCV-Seren wurde zunächst an der Charité im In-no LiPA in der 5'-UTR bestimmt. Eine Zuordnung der Genotypen ist in Abb. IV.1 als phylogenetische Analyse dargestellt.



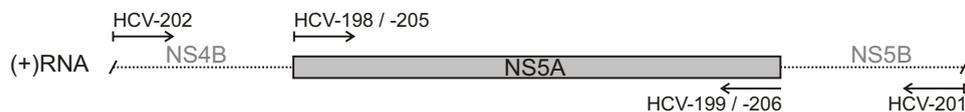
**Abb. IV.1: Phylogenetische Analyse der klonierten NS5A-cDNAs.** Zur Analyse des viralen Genotyps wurden die Aminosäuresequenzen von 14 verschiedenen NS5A-Isolaten phylogenetisch mit den definierten Referenzsequenzen der Genotypen 1a, 1b und 3a verglichen. Die entsprechenden Referenzstämme sind durch Fettdruck hervorgehoben. Der Skalierungsbalken repräsentiert die evolutionäre Distanz (Nukleotidaustausche pro Position). Die Astlängen des wurzellosen Phylogenetischen Baumes (*unrooted tree*) entsprechen den evolutionären Distanzen zwischen den einzelnen Sequenzen.

Die in der 5'-UTR bestimmten Genotypen stimmten für die untersuchten Isolate mit dem Genotyp des NS5A überein, da diese mit den entsprechenden Referenzsequenzen phylogenetisch clustern. Auch Quasispeziesklone aus einem Patienten heben sich als eigenständige Cluster hervor (110072, 106241 und 111275). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Klone sind im Anhang (siehe A.2.1) als Alignment mit den entsprechenden Referenzsequenzen (HCV1a [acc. M62321] (Choo et al., 1991), HCV-1b [acc. D90208] (Kato et al., 1990) und HCV-3a: [acc. D17763] (Sakamoto et al., 1994)) dargestellt. Die ISDR wies bei allen NS5A-cDNAs unabhängig vom Therapieverhalten keine *mutant type*-Sequenzen auf.

### Genotyp 1a/b:



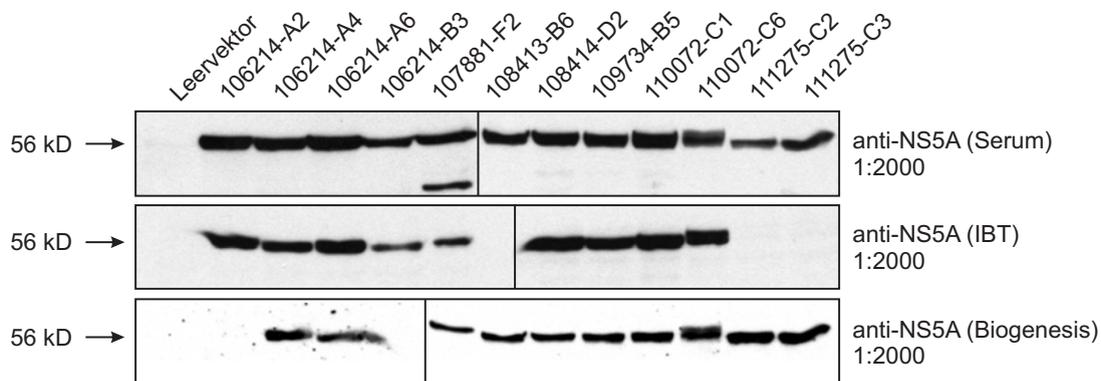
### Genotyp 3:



**Abb. IV.2: Schaubild zur Klonierung von NS5A.** Subgenomische HCV-cDNA wurde mit den Primern HCV-172 (Genotyp 1) und HCV-201 (Genotyp 3) mittels RT umgeschrieben. Zur Amplifikation des NS5A-Leserasters wurde in einer ersten PCR ein Fragment aus dem HCV-Genom isoliert, welches neben NS5A auch Teile der flankierenden Leseraster für NS4B und NS5B enthielt. Dies erfolgte über die Primer HCV-173 und HCV 172 (Genotyp 1) sowie HCV-201 und HCV-202 (Genotyp 3). In einer zweiten PCR wurde mit den Primern HCV-175 und HCV-174 (Genotyp 1), sowie HCV-198 und HCV-199 (Genotyp 3) der Leserahmen von NS5A isoliert. Der verwendete sense-Primer enthielt ein für die Expression notwendiges Start-Codon „ATG“, welches der isolierten cDNA fehlte, da NS5A nicht separat abgelesen, sondern aus dem Polyprotein prozessiert wird. Durch die Klonierung in pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His wurde ein im Vektor befindliches V5/HIS-*tag* sowie ein STOP-Codon an das 3'-Ende der cDNA angehängt. Für die Sequenzierung wurden die kommerziellen vektorspezifischen Primer T7 und BGH verwendet, sowie die NS5A-spezifischen Primer HCV-203 (Genotyp 1) und HCV-209/210 (Genotyp 1a/b und 3). Zur weiteren Subklonierung in pCAGGS wurde NS5A aus dem pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His-Vektor mit den Primern HCV-190 und HCV-191 subkloniert, wobei eine entsprechende Kozak-Sequenz vor das Start-Codon und ein für die Terminierung der Translation notwendiges STOP-Codon direkt (ohne V5/HIS-*tag*) an das 3'-Ende des Leserasters angehängt wurde. Alle pCAGGS-NS5A Vektoren wurden mit den Vektorprimer CAGGS-for und CAGGS-rev, sowie über die entsprechenden NS5A-Primer sequenziert.

### IV.1.2 Nachweis der NS5A-Expression

Voraussetzung zur Analyse von Proteinen im Reporterassay ist ein Nachweis der Expression. Dieser erfolgte mit NS5A-spezifischen Antikörpern im Westernblot. Zunächst



**Abb. IV.3: Expression von NS5A in 293T-Zellen.** NS5A-Expression wurde im Westernblot mit zwei kommerziellen Antikörpern und einem anti-NS5A Serum untersucht.  $1 \times 10^6$  293T-Zellen wurden mit  $4 \mu\text{g}$  Expressionsvektor transfiziert und in Lysispuffer resuspendiert. Die Proteine wurden in einer 10 %igen SDS-Page aufgetrennt. Der Immunnachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern.

wurden sieben verschiedene monoklonale NS5A-spezifische Antikörper der Firma Biogenesis untersucht, da die in der Literatur beschriebenen Antikörper nicht mehr kommerziell erhältlich waren. Dazu wurde V5/HIS-markiertes NS5A in *E. coli* exprimiert und über eine NiNTA-Säule gereinigt. Diese Proteine wurden anschließend im Dot Blot getestet. Als positiv-Kontrolle diente ein V5-Antikörper gegen die N-terminale V5-Markierung und als Negativkontrolle wurde rohes Zelllysate eingesetzt. Von den sieben untersuchten Biogenesis-Antikörpern konnte nur der BGN-1246-5F6 das V5/HIS-markierte NS5A (108414-D2 /

Genotyp 1b) detektieren. Die Spezifität des Antikörpers wurde anschließend im Westernblot bestätigt. Aufgrund der beträchtlichen Sequenzunterschiede zwischen den NS5A-Isolaten war es zunächst nicht möglich, alle NS5A-Klone mit einem mAK zu detektieren, so dass zusätzlich weitere Antikörper getestet wurden. Der mAK der Firma IBT, war hierbei in der Lage, NS5A-Klone der Genotypen 1b und 3 zu detektieren und ein im Verlauf dieser Arbeit verfügbares polyklonales Serum konnte alle bisher untersuchten NS5A-Proteine (Genotypen 1a/b und 3) spezifisch detektieren. NS5A ohne V5/HIS-*tag* hatte im Westernblot ein Molekulargewicht von 56 kD, welches der basalphosphorylierten Form des NS5A entspricht (siehe Abb. IV.3). Der NS5A-Klon 110072-C6 lief bei gleicher Aminosäurelänge etwas langsamer in der PAGE (etwa 58 kD), so dass hier eine differentielle Phosphorylierung vermutet wird.

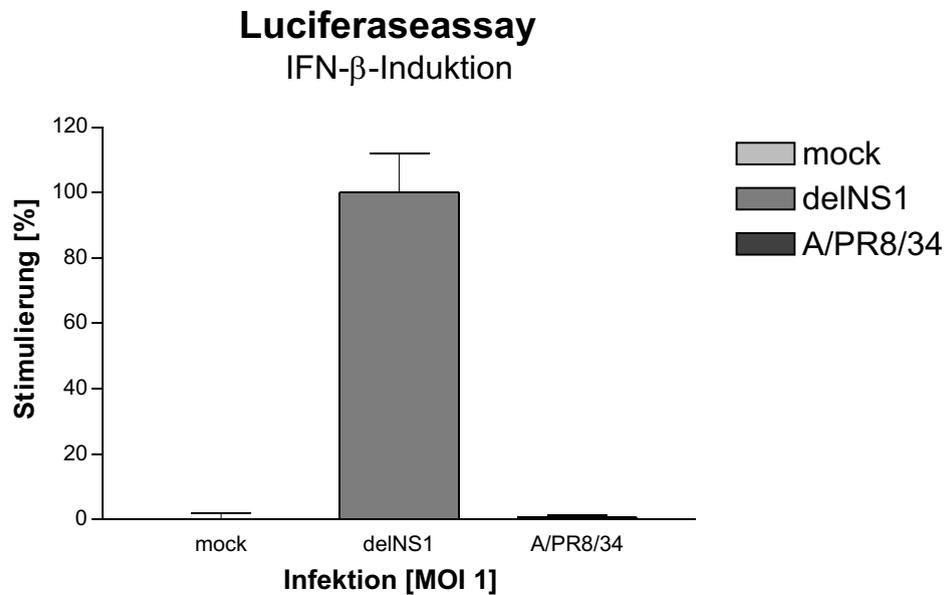
## IV.2 Reporterassay zum Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion

Der Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion wurde in einem Reporterassay, welches ursprünglich von Basler et al., 2000 zur Charakterisierung des Ebola IFN-Antagonisten VP35 etabliert wurde, untersucht. Als Grundlage für diese Untersuchungen wurde eine IFN-sensitive Rekombinante des Influenza A-Virus, das delNS1 Virus (Sato et al., 1998), verwendet. NS1 inhibiert IFN- $\beta$ -Induktion, so dass die Deletionsmutante delNS1 nur sehr schlecht auf IFN-produzierenden Zellen, wie den zur Anzucht des isogenen Wildtyp-Virus A/PR8/34 eingesetzten MDCK2 Zellen, wächst (siehe I.12). Das zum delNS1 isogene Wildtyp-Virus A/PR8/34 exprimiert NS1 und kann somit den antiviralen Effekt von IFN antagonisieren. Basler et al., 2003 konnten zeigen, dass delNS1-Wachstum durch die exogene Expression von NS1 *in trans* komplementiert werden kann und dass dies auch mit anderen IFN-Antagonisten, wie dem HSV-1 kodierten PKR-Inhibitor ICP34.5 und dem V35-Protein des Ebola Virus, möglich ist. Über einen CAT-Reporter, dem ein Element des IFN-Promotors vorgeschaltet ist, wurde der Mechanismus der IFN-Antagonisation von ICP34.5 und VP35 beschrieben.

### IV.2.1 Etablierung eines IFN- $\beta$ -Reporterassays

Basierend auf dem Protokoll von Basler et al., 2003 wurde ein Reporterassay etabliert, um die IFN- $\beta$ -Induktion mit Hilfe des nicht-radioaktiven Luciferase-Reporters p-125-Luc (Yoneyama et al., 1998) zu messen.

In einem ersten Test des Systems wurden MDCK2-Zellen mit einer Variante des Reporters (p-125-Luc<sup>neo</sup>), die zusätzlich ein Neomycin-Resistenz-Gen exprimiert, stabil transfiziert. Diese MDCK2<sup>125-Luc</sup> Zellen wurden mit dem IFN-sensitiven delNS1, sowie dem IFN-resistenten Wildtyp A/PR8/34 mit MOI 1 infiziert und acht Stunden nach Infektion geerntet. Das Influenza A-Virus exprimiert alle seine Proteine «inklusive des Nichtstrukturproteins NS1» innerhalb dieser acht Stunden. Während dieses Zeitfensters findet noch



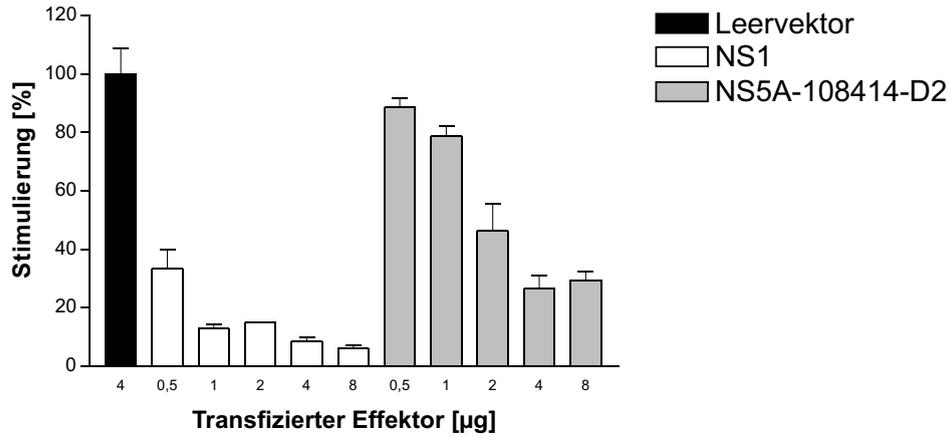
**Abb. IV.4: Induktion von IFN- $\beta$  durch delNS1.** MDCK2<sup>125-Luc</sup> Zellen wurden mit delNS1, /A/PR8/34 (MOI 1) bzw. mock (nur die Trägerlösung PBS/BA/Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ohne Virus) infiziert. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und im Luciferaseassay untersucht. Die Luciferaseaktivität wurde als rohe Lichteinheiten [RLU] gemessen und prozentual dargestellt.

keine Zellyse statt. Durch Infektion mit delNS1 reagierten die Zellen auf die virale Stimulation mit der Induktion von IFN- $\beta$ , was anhand der Reporterstimulation gezeigt werden konnte (siehe Abb. IV.4). Hierbei war das Wildtyp-Virus nur marginal in der Lage den Reporter zu stimulieren, da das NS1-Protein den induzierten Signalingprozess antagonisiert. Das delNS1-Virus hingegen induzierte die IFN- $\beta$ -Induktion um mehr als das 150-fache im Vergleich zu den mock-infizierten Zellen. Somit wurden hier zunächst die Daten von Basler et al., 2003 bestätigt, dass sich das delNS1-Virus gut zur Stimulierung des IFN- $\beta$ -Reporters p-125-Luc eignet.

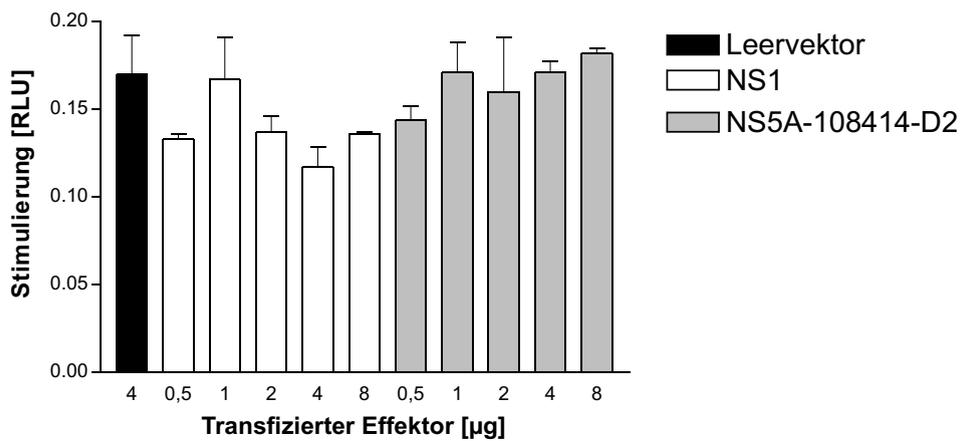
### IV.2.2 Titration von NS5A im IFN- $\beta$ -Reporterassay

Um den Einfluss von NS5A auf die IFN- $\beta$ -Induktion zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Mengen NS5A im Vergleich zu NS1 transient in MDCK2-Zellen transfiziert und im IFN- $\beta$ -Reporterassay untersucht (Abb. IV.5). Zur Etablierung des Assays wurde zunächst nur ein Klon (NS5A-108414-D2) eingesetzt.

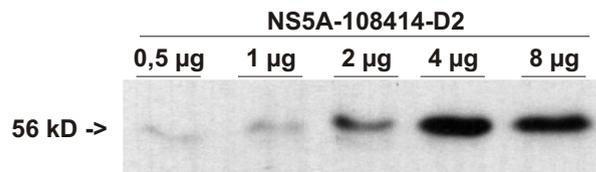
(a)

**Luciferaseassay**  
IFN- $\beta$ -Induktion

(b)

**Betagalaktosidaseassay**

(c)



**Abb. IV.5: Dosisabhängige Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion durch NS5A.** Es wurde der Einfluss von NS5A auf die IFN- $\beta$ -Induktion durch delNS1 im Vergleich zum Influenza A NS1-Protein untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  MDCK2-Zellen transient mit 100 ng p-125-Luc, 250 ng pCMV- $\beta$ Gal, sowie 0,5–8  $\mu$ g pCAGGS-NS5A bzw. pCAGGS-NS1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit delNS1-Virus stimuliert und nach 8 h geerntet. (a) Die Stimulierung des IFN- $\beta$ -Promotors wurde im Luciferaseassay gemessen und bezogen auf den transfizierten Leervektor prozentual dargestellt. (b) Die allgemeine Proteinexpression wurde mit Hilfe eines CMV-Reporters im Betagalaktosidaseassay bestimmt. (c) Die Expressionslevel von NS5A wurden im Westernblot bestimmt. Zur Detektion wurde der monoklonale anti-HCV-NS5A Antikörper (IBT) verwendet.

Hierbei waren sowohl NS1 als auch NS5A in der Lage, die IFN- $\beta$ -Induktion dosisabhängig zu antagonisieren, wobei die Inhibition durch NS5A im Vergleich zu NS1 deutlich schwächer ausgeprägt war (Abb. IV.5-a). Beide Proteine hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression eines CMV-Promotors, gemessen im Betagalaktosidaseassay (Abb. IV.5-b), so dass von einer spezifischen Inhibition des IFN- $\beta$ -Promotors ausgegangen wird. Die Expressionslevel von NS5A waren abhängig von der transfizierten Vektormenge (Abb. IV.5-c), wobei eine Transfektion von mehr als 4  $\mu$ g Expressionsvektor auf  $10^6$  Zellen keine weitere Steigerung der Proteinexpression oder verbesserte Inhibition des Reporters bewirkte. Für weitere Untersuchungen wurden daher standardmäßig 4  $\mu$ g Expressionsvektor transfiziert.

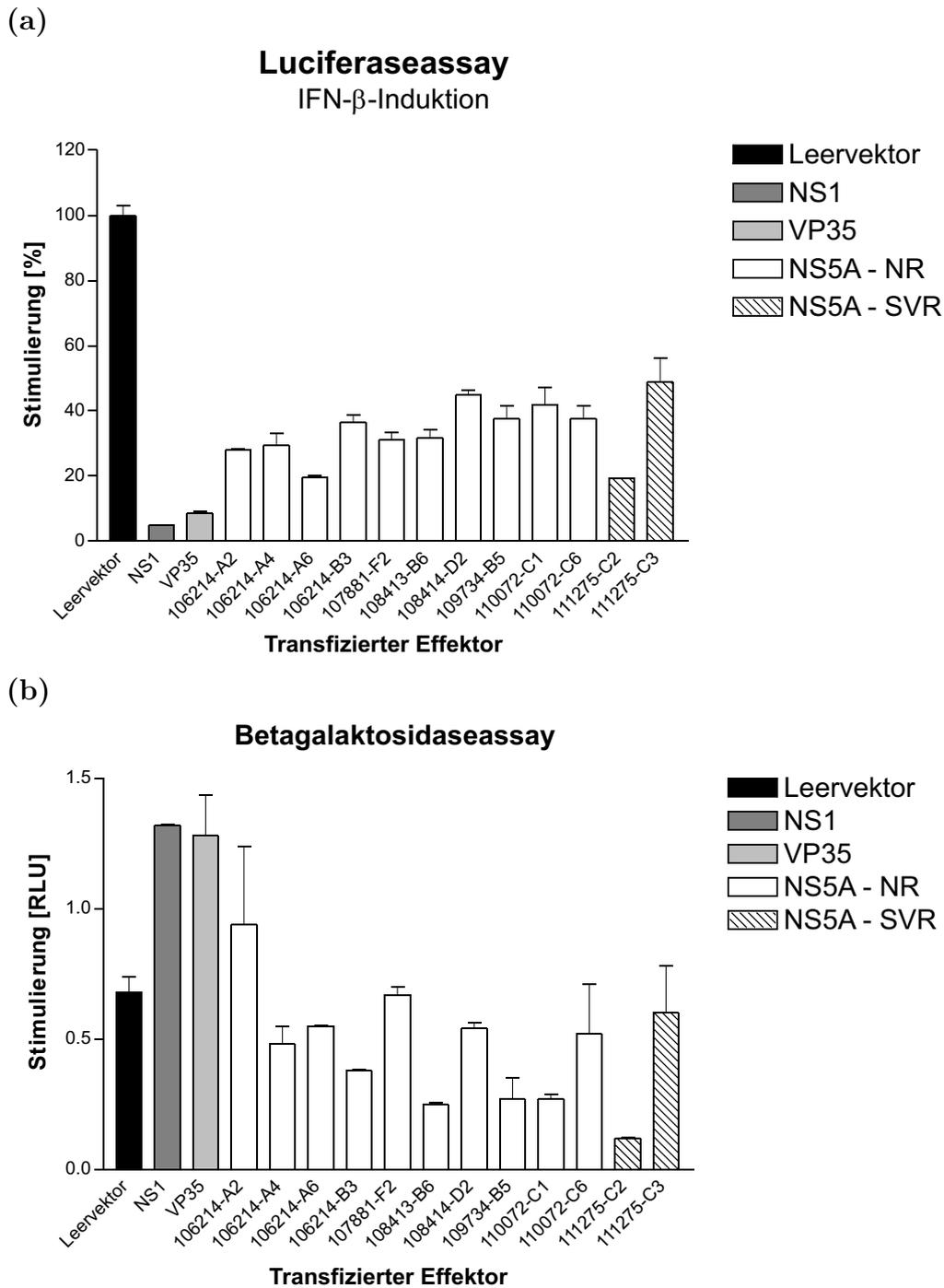
### IV.2.3 Screening verschiedener NS5A-Klone im IFN- $\beta$ -Reporterassay

Aufgrund des unterschiedlichen Therapieansprechens der HCV-Patienten stellte sich die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und einer IFN-antagonisierenden Eigenschaft der NS5A-Klone gab.

Es gibt auf funktionaler Ebene verschiedene Hinweise darauf, dass NS5A mit der PKR interagiert und die IFN- $\beta$ -Induktion stört (siehe I.6.6). Dennoch konnte bisher keine Korrelation eines funktionalen IFN-Antagonismus mit Therapieansprechen gezeigt werden.

Zur Analyse eines Einflusses von NS5A auf die IFN- $\beta$ -Induktion wurden verschiedene NS5A-Klone von Patienten mit unterschiedlichem Therapieansprechen im Reporterassay untersucht und mit bekannten Inhibitoren der IFN-Induktion, wie dem NS1-Protein aus Influenza A und dem VP35-Protein aus Ebola, verglichen (siehe Abb. IV.6).

Die Analyse von 12 unterschiedlichen NS5A-Proteinen im IFN- $\beta$ -Reporterassay zeigte, dass alle untersuchten NS5A-Klone eine Induktion des IFN- $\beta$ -Reporters prinzipiell inhibieren können. Allerdings waren die Ergebnisse uneinheitlich und reduzierten die Reporterstimulation nur auf 20–49 % im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten und stimulierten Zellen. NS1 und VP35 zeigten eine leicht erhöhte Basisexpression, wohingegen sich die Expression von NS5A eher negativ auf die allgemeine Proteinexpression auswirkte. Insbesondere der Klon 111275-C2 zeigte eine deutliche Inhibition der allgemeinen Proteinexpression, so dass die gemessene Inhibition des IFN- $\beta$ -Reporters auf eine allgemeine Inhibition der Proteinexpression zurückzuführen ist.



**Abb. IV.6: Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion durch verschiedene NS5A-Isolate.** 12 unterschiedliche NS5A-Klone isoliert aus 6 NR und 1 SVR Patienten wurden im IFN- $\beta$ -Reporterassay auf ihren Einfluss auf IFN- $\beta$ -Induktion untersucht und mit NS1 und VP35 verglichen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. IV.5 beschrieben, wobei hier ausschließlich 4  $\mu$ g des Expressionsvektors transfiziert wurden.

Interessanterweise stammte die höchste und niedrigste Inhibition des IFN- $\beta$ -Reporters aus einem Patienten. Eine Korrelation zwischen Therapieansprechen und Reporterinduktion wurde nicht beobachtet. Keines der untersuchten NS5A-Klone war in der Lage, den

IFN- $\beta$ -Reporter ähnlich stark zu inhibieren, wie die etablierten IFN- $\beta$ -Antagonisten NS1 oder VP35. Die Untersuchungen bestätigen zunächst die Beobachtungen von Basler et al., 2003, dass sich die IFN-antagonisierenden Eigenschaften von NS1 durch alternative IFN-Antagonisten *in trans* komplementieren lassen. NS1 und VP35 zeigten eine leichte Stimulation der allgemeinen Proteinexpression gemessen am Betagalaktosidase-Reporter, wohingegen die verschiedenen NS5A-Klone ein sehr heterogenes Bild unabhängig von der IFN- $\beta$ -Induktion zeigten.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass NS5A spezifisch Einfluss auf die IFN- $\beta$ -Induktion nehmen kann, wobei der Effekt im Vergleich zu NS1 bzw. VP35 weniger stark ausgeprägt ist. Alle untersuchten NS5A-Klone zeigten unterschiedlich stark ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf MDCK2-Zellen, der nicht mit dem Therapieansprechen des Patienten korrelierte. Somit unterstützen diese Untersuchungen die Hypothese, dass NS5A kein signifikanten Einfluss auf IFN- $\beta$ -Induktion ausübt.

### IV.3 Reporterassays zum Einfluss von NS5A auf Typ-1 IFN-Signaling

Kürzlich konnte in *Microarray*-Untersuchungen gezeigt werden, dass die Expression des HCV-Genoms zu einer Inhibition ISRE-induzierter Gene führen kann (Girard et al., 2002; Geiss et al., 2003). Dennoch sind der Mechanismus und die biologische Relevanz dieser Beobachtungen ungewiss.

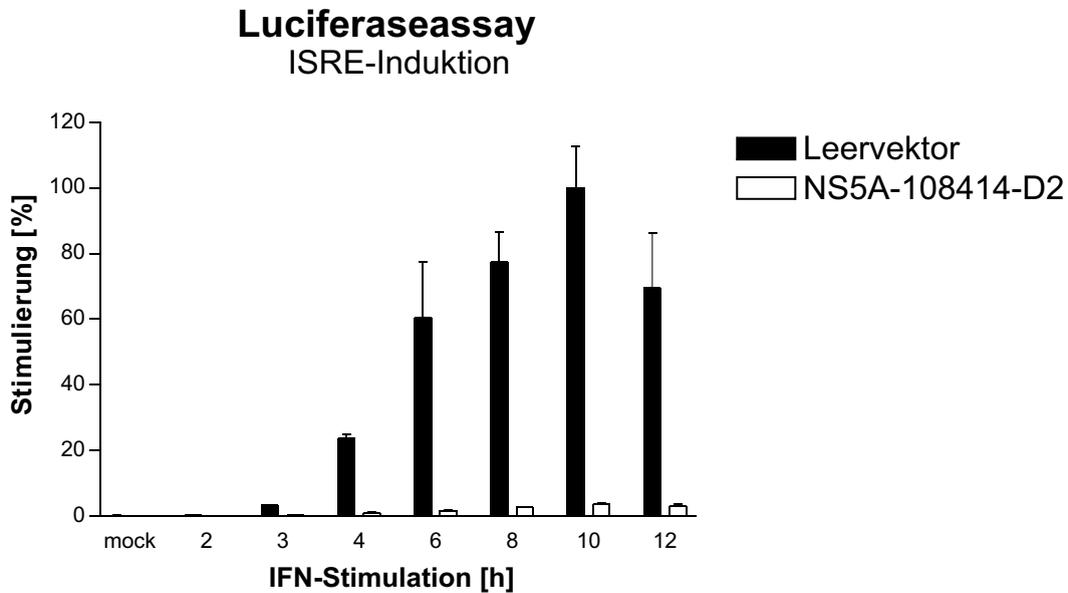
#### IV.3.1 Etablierung eines ISRE-Reporterassays

In Reporterassays wurde zunächst der Einfluss von NS5A auf die Typ-1 IFN-induzierten ISGs untersucht. Hierzu wurde ein Reporter (pISRE-Luc, Clontech) eingesetzt, der ein Luciferasegen über ein ISRE-Repeat (GAAACTGAAACT)<sub>5</sub> im Promotor induziert. Als Zellsystem für diese Untersuchungen wurde die humane endothele Nierenzelllinie 293T gewählt, da diese für andere Reporterassays bereits etabliert wurde (Benezra et al., 2003). Um einen allgemeinen Effekt auf die zelluläre Proteinexpression auszuschließen, wurde der IFN-unabhängige Reporter pCMV- $\beta$ GAL co-transfiziert. Zur Etablierung des Reporterassays zur Analyse der ISRE-abhängigen Genexpression wurde auch hier zunächst nur der NS5A-Klon 108414-D2 verwendet.

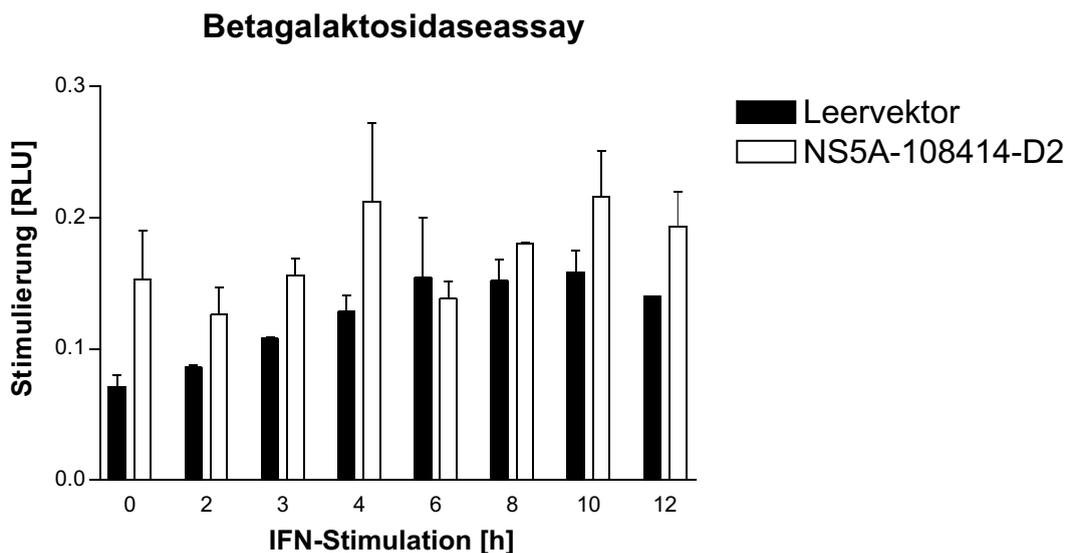
#### IV.3.2 Kinetik der IFN- $\beta$ -Stimulation im ISRE-Reporterassay auf 293T-Zellen

Zunächst wurde die optimale Dauer der IFN- $\beta$ -Stimulation bestimmt und untersucht inwieweit NS5A Einfluss auf diesen Prozess nimmt (siehe Abb. IV.7).

(a)



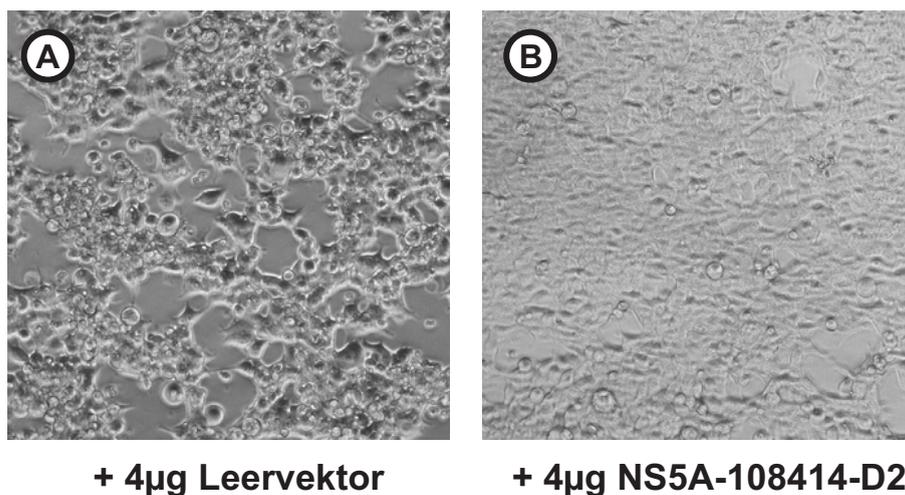
(b)



**Abb. IV.7: Kinetik der Inhibition ISRE-stimulierter Gene durch NS5A.** Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  293T-Zellen transient mit 100 ng pISRE-Luc, 250 ng pCMV- $\beta$ -GAL und 4  $\mu$ g pCAGGS-NS5A im Doppelansatz transfiziert und 24 h nach Transfektion 1 bis 12 h mit 500 IU humanem IFN- $\beta$  stimuliert. Anschließend wurden die Zellen 24 h bis 32 h nach Transfektion in 2 h Abständen bzw. 32 h bis 36 h nach Transfektion in 1 h Abständen mit IFN stimuliert und 36 h nach Transfektion gemeinsam geerntet. Im Luciferaseassay wurde die Stimulierung des ISRE-Reporters gemessen und bezogen auf den transfizierten Leervektor prozentual dargestellt (a). Die Expression des pCMV- $\beta$ -GAL Reporters in den Lysaten wurde im Betagalaktosidaseassay gemessen (b).

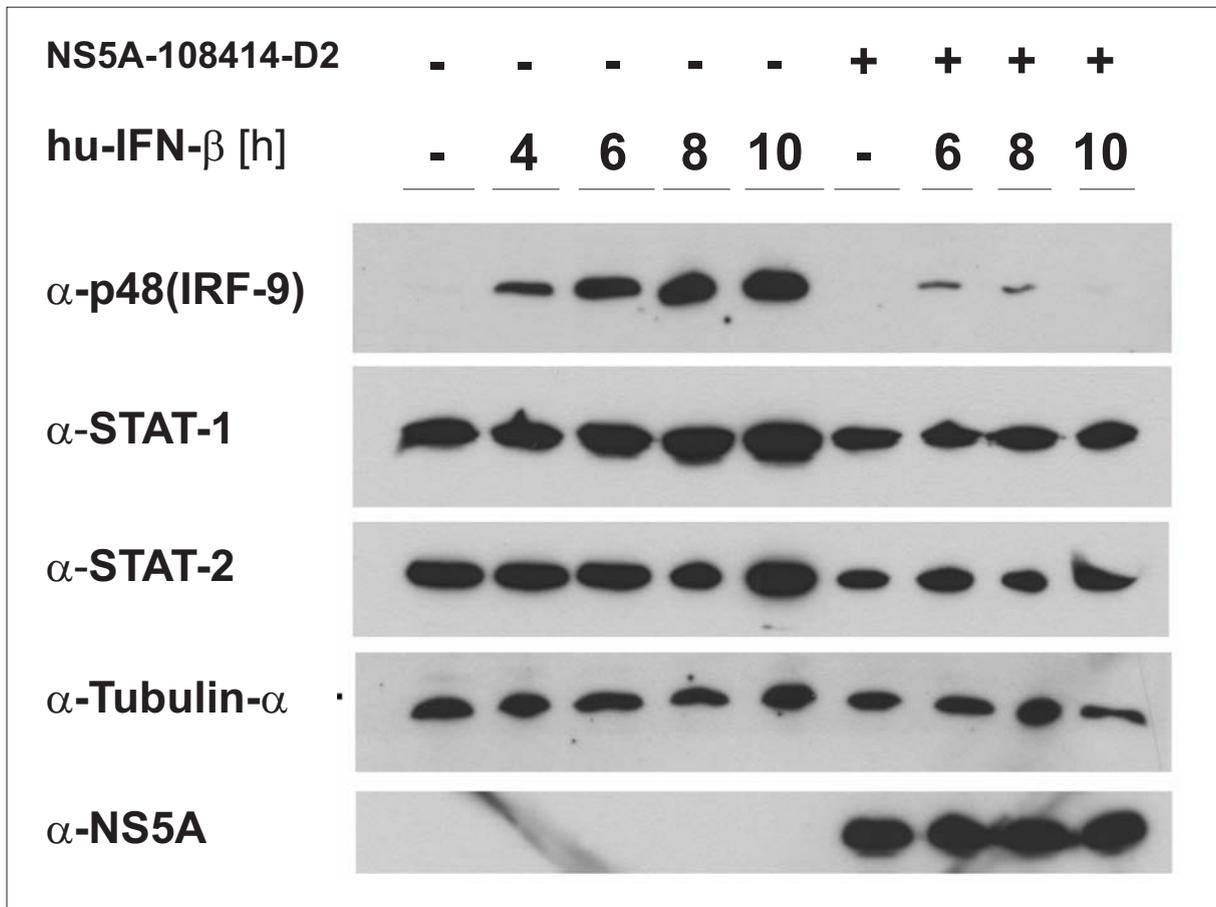
Die Kinetik der IFN- $\beta$ -Stimulation zeigte, dass die Reporterstimulation 3 h nach Transfektion einsetzt, stetig zunimmt und nach etwa 10 h die maximale Stimulation erreicht hat. NS5A 108414-D2 war in der Lage, die Stimulation des ISRE-Reporters signifikant

zu inhibieren, obgleich keine vollständige Inhibition erreicht wurde. Die Betagalaktosidase Expression auf NS5A-exprimierenden Zellen war im Vergleich zum Leervektor leicht erhöht. Es zeigte sich hier kein spezifischer Effekt auf die allgemeine Proteinexpression, gemessen an der Betagalaktosidaseinduktion, so dass hier von einer spezifischen Inhibition des ISRE-Reporters durch NS5A ausgegangen wird. In diesem Modell wurde eine maximale Induktion nach 10 h und eine Abnahme der Induktion nach 12 h beobachtet. Zellen sterben nach andauernder IFN-Behandlung. 24 h nach Stimulation wurde bei 293T-Zellen ein deutlicher CPE (zytotoxischer Effekt) beobachtet. Interessanterweise waren NS5A-exprimierende 293T-Zellen deutlich resistenter gegenüber andauernder IFN-Behandlung über 24 h, was auch makroskopisch sichtbar ist (siehe Abb. IV.8).



**Abb. IV.8: NS5A verhindert zytotoxischen Effekt bei andauernder IFN- $\beta$  Behandlung.** 293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion für 24 h mit 500IU huIFN- $\beta$  behandelt. Zellen, in die nur der Leervektor transfiziert wurde, zeigten einen deutlichen CPE (A), Zellen, die mit pCAGGS-NS5A-108414-D2 transfiziert wurden, zeigten keine Anzeichen einer Zellschädigung (B).

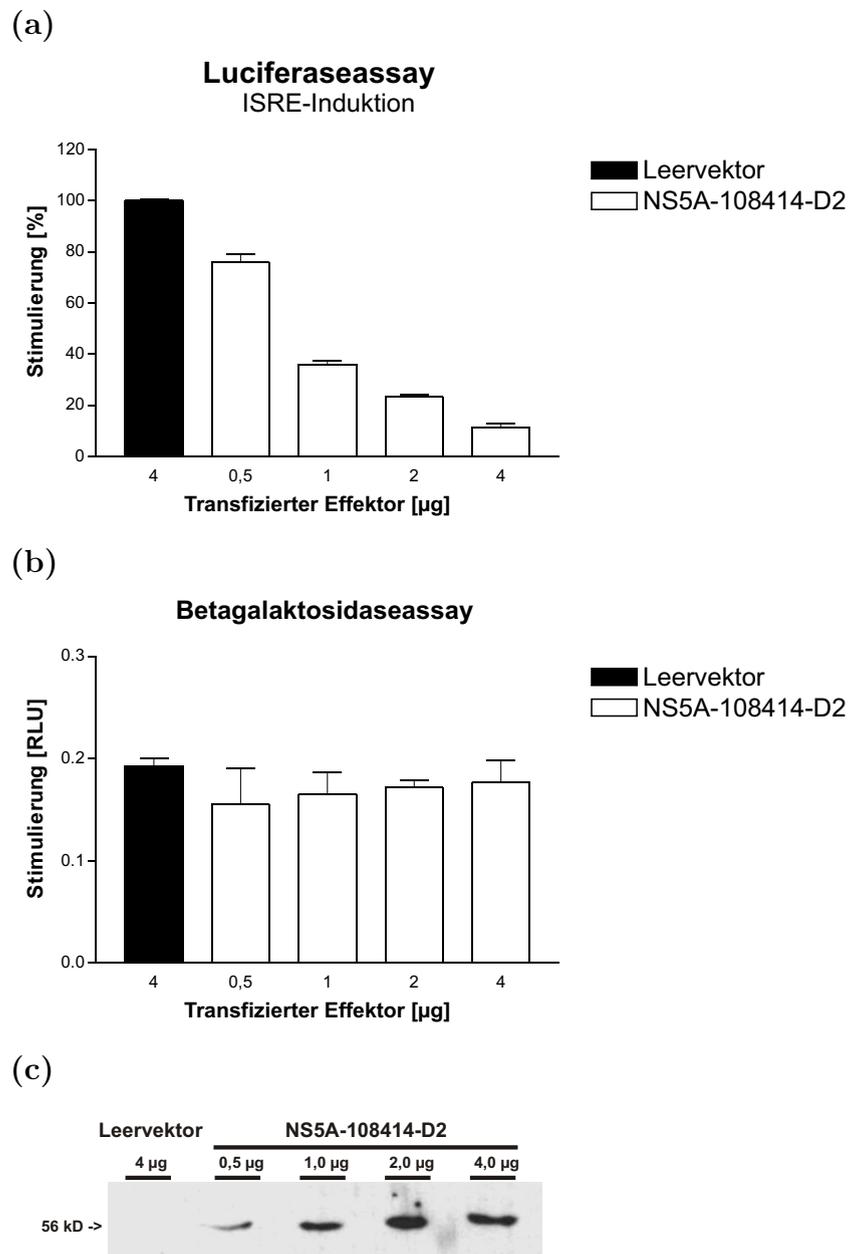
Eine Analyse der Komponenten des Transkriptionsfaktors ISGF3 aus den selben Kinetikproben (siehe Abb. IV.9) zeigte, dass unter IFN-Induktion die Expression von STAT-1 leicht und von STAT-2 marginal zunimmt. Unter NS5A Expression war keine Zunahme der konstitutiven Expression der beiden STATs zu erkennen und die Expressionslevel erscheinen insgesamt niedriger. Das zelluläre  $\alpha$ -Tubulin zeigte keine differentielle Expression. Für das p48 wurde jedoch eine IFN-abhängige Induktion beobachtet, die durch NS5A signifikant inhibiert wurde. p48 konnte nur in IFN-stimulierten Zellen im Westernblot nachgewiesen werden. Da eine Abnahme der p48-Expression sowohl Ursache, als auch Wirkung der NS5A-abhängigen Inhibition ISRE-abhängiger Gene sein kann, wurden hierzu Co-Transfektionen p48 und NS5A durchgeführt (siehe IV.3.5).



**Abb. IV.9: Einfluss von NS5A auf die Komponenten des Transkriptionsfaktors ISGF3.** ISGs, die den Transkriptionsfaktor ISGF3 bilden, wurden in den Lysaten der Kinetikproben (Abb. IV.7) im Westernblot mit Antikörpern gegen p48(IRF-9), STAT-1, STAT-2 detektiert. Als Referenzprotein wurde das konstitutiv exprimierte  $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen. Die Expression von NS5A wurde mit dem mAK anti-HCV-NS5A (IBT) detektiert.

### IV.3.3 Titration von NS5A im ISRE-Reporterassay

Eine Optimum der ISRE-Stimulation wurde 8–10 h nach Stimulation gemessen. Expression von NS5A führte zu jedem Zeitpunkt zu einer Inhibition der Induktion ISRE-abhängiger Gene. Im folgenden wurde die Inhibition mit dem Klon 108414-D2 titriert. Dazu wurden 0,5 bis 4  $\mu$ g NS5A-Expressionsplasmid in 293T-Zellen transfiziert, mit IFN- $\beta$  stimuliert (siehe Abb. IV.10).



**Abb. IV.10: Titration von NS5A im ISRE-Reporterassay auf 293T-Zellen.** Es wurde der Einfluss von NS5A auf die Stimulation ISGs durch IFN- $\beta$  untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  293T-Zellen transient mit 100 ng pISRE-Luc, 250 ng pCMV- $\beta$ -GAL und 0,5 - 4  $\mu$ g pCAGGS-NS5A im Doppelansatz transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 500 IU humanem IFN- $\beta$  stimuliert und nach 8 h geerntet. Im Luciferaseassay wurde die Stimulierung der IFN- $\beta$ -Promotors gemessen und bezogen auf den transfizierten Leervektor prozentual dargestellt (a). Die Expression des pCMV- $\beta$ -GAL Reporters in den Lysaten wurde im Betagalaktosidaseassay gemessen (b).

Durch Titration von NS5A im ISRE-Reporterassay konnte ein dosisabhängiger Effekt auf die ISRE-Inhibition bestätigt werden. Im Vergleich war die Betagalaktosidaseexpression über den CMV-Promotor konstant.

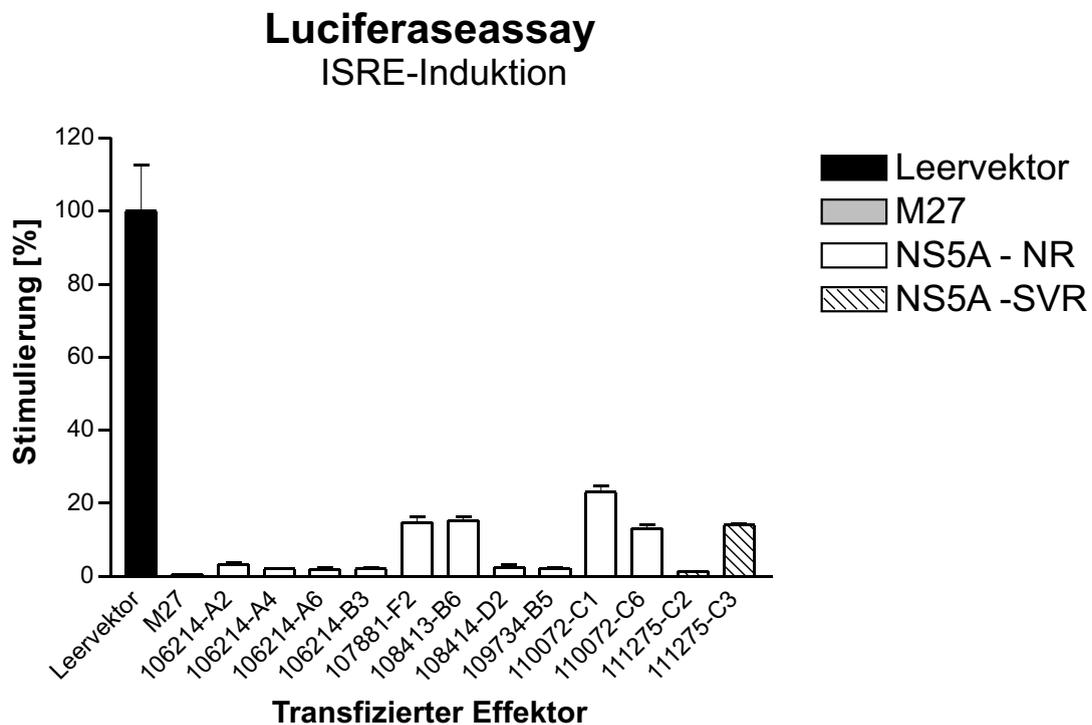
#### IV.3.4 Screening verschiedener NS5A-Klone im ISRE-Reporterassay

Analog zu den Untersuchungen zur IFN- $\beta$ -Stimulation wurden verschiedene NS5A-Proteine von NR- und SVR-Isolaten untersucht, wobei das M27-Protein von mCMV als Referenzprotein eingesetzt wurde. Für das M27 wurde bereits beschrieben, dass es IFN-Signaling durch Abbau des STAT-2 Transkriptionsfaktors (Zimmermann et al., 2005; Khan et al., 2004) inhibieren kann (siehe Abb. IV.11).

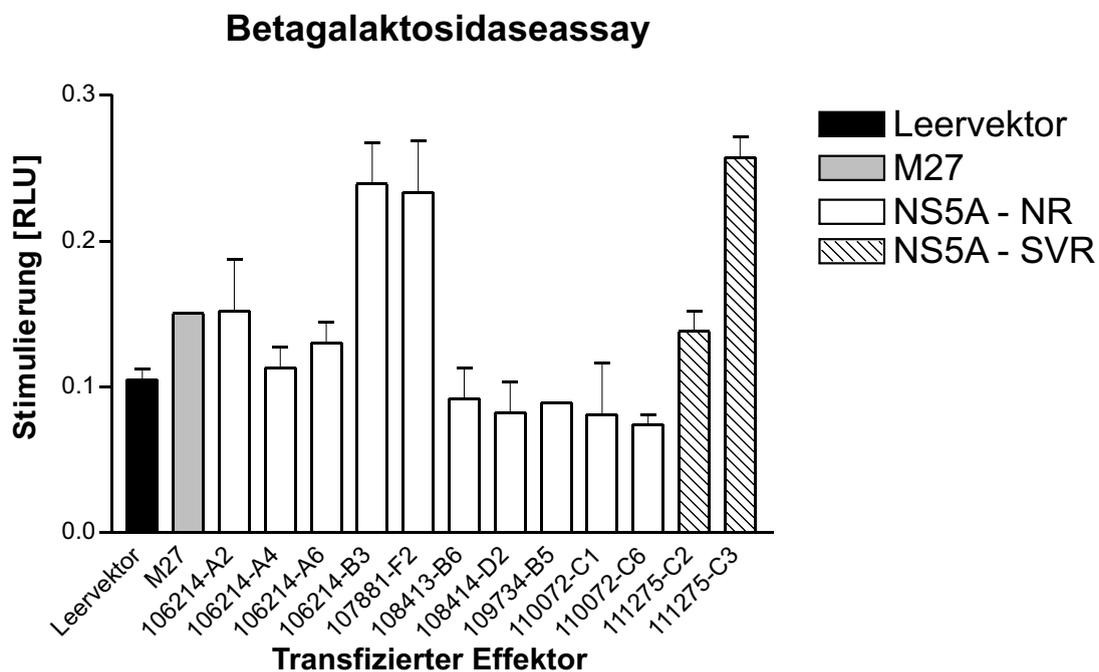
Alle 12 untersuchten NS5A-Klone des Genotyps 1a/b waren in der Lage, IFN-Signaling zu antagonisieren. Die Inhibition durch NS5A war hierbei vergleichbar mit der des M27-Proteins, welches die Reporterstimulation im Vergleich zum Leervektor auf 0,5 % reduzierte. Die verschiedenen NS5A-Klone reagierten unterschiedlich zwischen 1,3–23 % im Schnitt mit etwa 8 % Reporterstimulation und somit deutlich effizienter, als eine Inhibition des IFN- $\beta$ -Promotors.

Eine Korrelation zum Therapieansprechen der entsprechenden Patienten wurde auch hier nicht beobachtet, da NS5A-Varianten von Patienten mit NR und auch SVR die ISRE-abhängige Genexpression inhibierten.

(a)



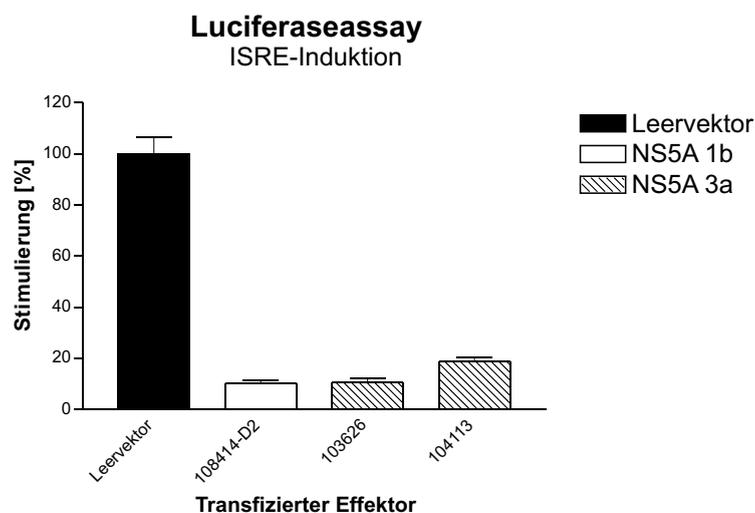
(b)

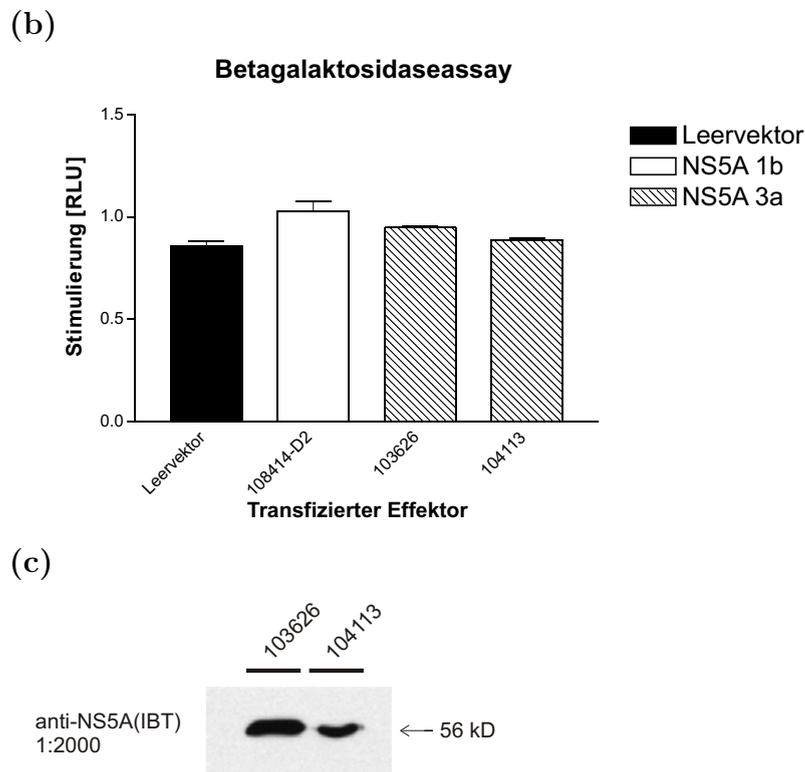


**Abb. IV.11: Inhibition der ISRE-Induktion durch verschiedene NS5A-Isolate.** Der Einfluss von 12 unterschiedlichen NS5A-Klone auf die Induktion ISGs, wurden analog zum IFN- $\beta$ - im ISRE-Reporterassay untersucht und mit dem M27-Protein, verglichen. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben (Abb. IV.10), wobei hier konstant 4  $\mu$ g des Expressionsvektors transfiziert wurden.

Da alle untersuchten NS5A-Klone des Genotyps 1a/b die ISRE-abhängige Genexpression inhibierten, wurden auch Isolate des Genotyps 3 im ISRE-Reporterassay untersucht (siehe Abb. IV.12).

(a)





**Abb. IV.12: Inhibition der ISRE-Induktion durch NS5A des Genotyps 3.** Es wurde der Einfluss von zwei NS5A-Klonen aus Genotyp 3a Patienten, je einem mit NR (103626) und einem mit SVR (104113), auf ISRE-abhängige Genexpression untersucht und mit NS5A-1b verglichen (a). Der Einfluss auf den CMV-Promotor wurde im Betagalaktosidaseassay untersucht (b). Die Expression von NS5A-103626 und -104113 wurde im Westernblot kontrolliert.

Der Genotyp 3 ist hier von besonderem Interesse, da hier über 80 % der Patienten auf die Kombinationstherapie ansprechen und die Sequenzhomologie per Definition unter 80 % zum Genotyp 1 liegt.

Es konnte gezeigt werden, dass beide NS5A-Klone des Genotyps 3a die ISRE-Induktion inhibieren können. Ein Einfluss auf die CMV gesteuerte Expression des Betagalaktosidase-Reporters wurde auch hier nicht beobachtet.

Somit waren insgesamt 14 verschiedene NS5A-Klone der Genotypen 1a, 1b und 3a aus Patienten mit NR und SVR in der Lage, IFN-Signaling im Reporterassay zu antagonisieren.

### IV.3.5 Co-Expression von p48 im ISRE-Reporterassay

Die Reporterassays zum Einfluss von NS5A auf Typ 1 IFN-Signaling haben gezeigt, dass NS5A ISRE-induzierte Genexpression inhibieren kann und dass hierbei die p48-Expression inhibiert wird (siehe Abb. IV.9). Somit stellte sich die Frage, ob die ISRE-Inhibition durch einen Abbau von p48 ausgelöst wird, oder ob p48 als ISG bedingt durch ISRE-Inhibition gar nicht erst induziert wird, insbesondere da p48-Expression im Gegensatz zu STAT-1/2

in nicht induzierten Zellen nicht nachweisbar war. Dieser Frage wurde im Folgenden in p48 Co-Transfektionsexperimenten nachgegangen.

### **Klonierung von p48 aus 293T-Zellen**

Zunächst wurde aus 293T-Zellen RNA isoliert und mit dem Primer p48(rev) p48-cDNA umgeschrieben. Über die Primer p48(for/rev) wurde das komplette Gen amplifiziert und über TA-Klonierung (Invitrogen) in pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-His inseriert. Die p48-cDNA wurde sequenziert (siehe A.2.4) und die Expression des 48 kD Proteins in 293T-Zellen im Westernblot bestätigt.

### **Einfluss von p48 auf die Inhibition ISRE-abhängiger Gene durch NS5A**

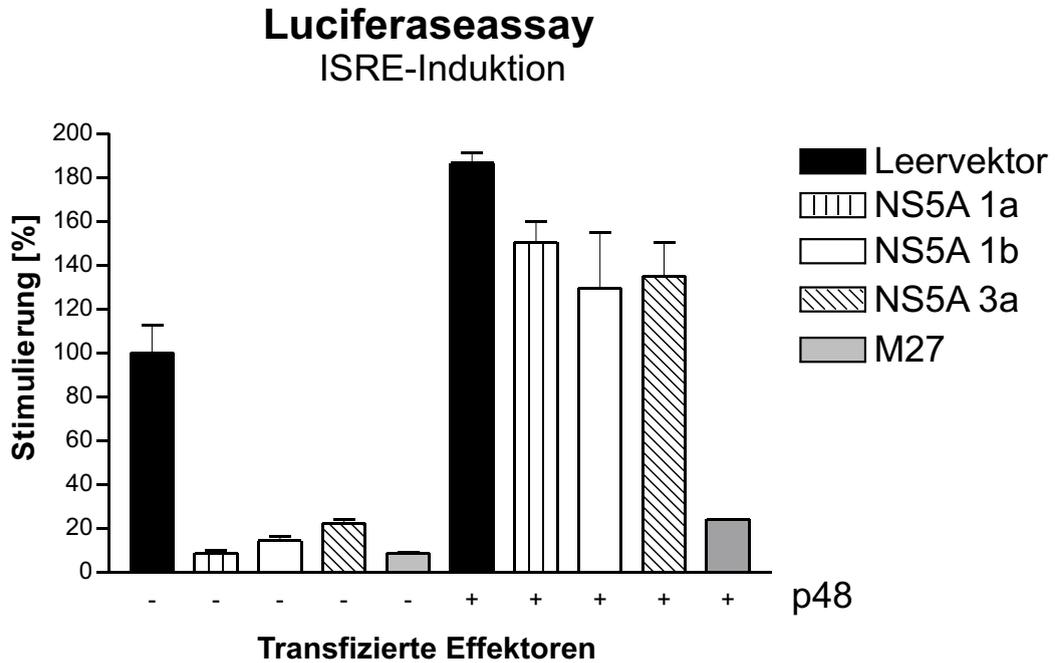
Im ISRE-Reporterassay wurde untersucht, inwieweit eine ISRE-unabhängige Überexpression von p48 die Inhibition ISRE-abhängiger Gene beeinflusst. Hierbei wurde der Einfluss von NS5A wieder mit dem M27 aus mCMV verglichen, da dieses über STAT-2 Degradierung, also unabhängig von p48, ISRE inhibiert (Abb. IV.13).

Hierzu wurde p48 mit verschiedenen NS5As co-transfiziert und der Einfluss auf IFN-*Signaling* im Reporterassay gemessen. Repräsentativ für den Genotyp-1a wurde der Klon NS5A-111275-C2 verwendet, NS5A-108414-D2 für Genotyp-1b und NS5A-104113 für Genotyp-3a.

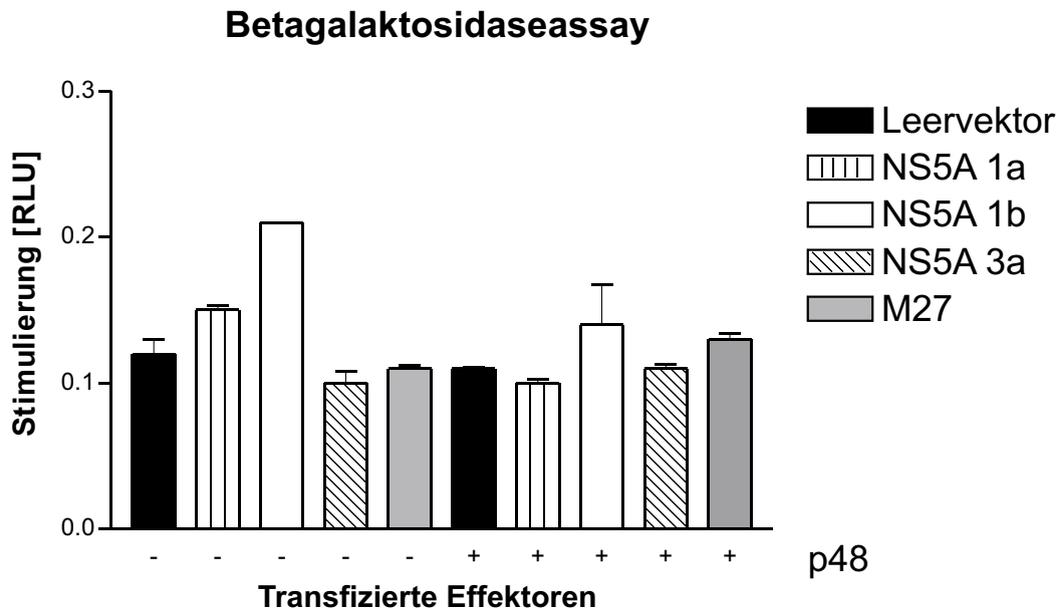
Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IFN-*Signalings* durch NS5A bei gleichzeitiger ISRE-unabhängiger Expression von p48 aufgehoben wird, wobei die Inhibition durch M27 nur geringfügig wiederhergestellt werden konnte. Insgesamt wurde eine erhöhte Reporterstimulation unter p48-Expression festgestellt. Dies steht sicherlich im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass p48 in nicht-stimulierten Zellen zu sehr geringen Anteilen exprimiert wird (siehe Abb. IV.9). Eine konstitutive Expression von p48 führt hierbei zu einer schnelleren Produktion von ISGF3 und somit zu einer verbesserten Antwort auf IFN-Stimulation. Ein zytopathischer Effekt bedingt durch eine konstitutive Expression von p48 konnte in diesem Zeitfenster nicht beobachtet werden.

Da das M27-Protein weiterhin in der Lage war IFN-*Signaling* zu inhibieren, ist von einem spezifischen Effekt des NS5A auf p48 auszugehen. Somit stellt p48 ein molekulares *Target* zur Inhibition des IFN-*Signalings* durch NS5A dar.

(a)



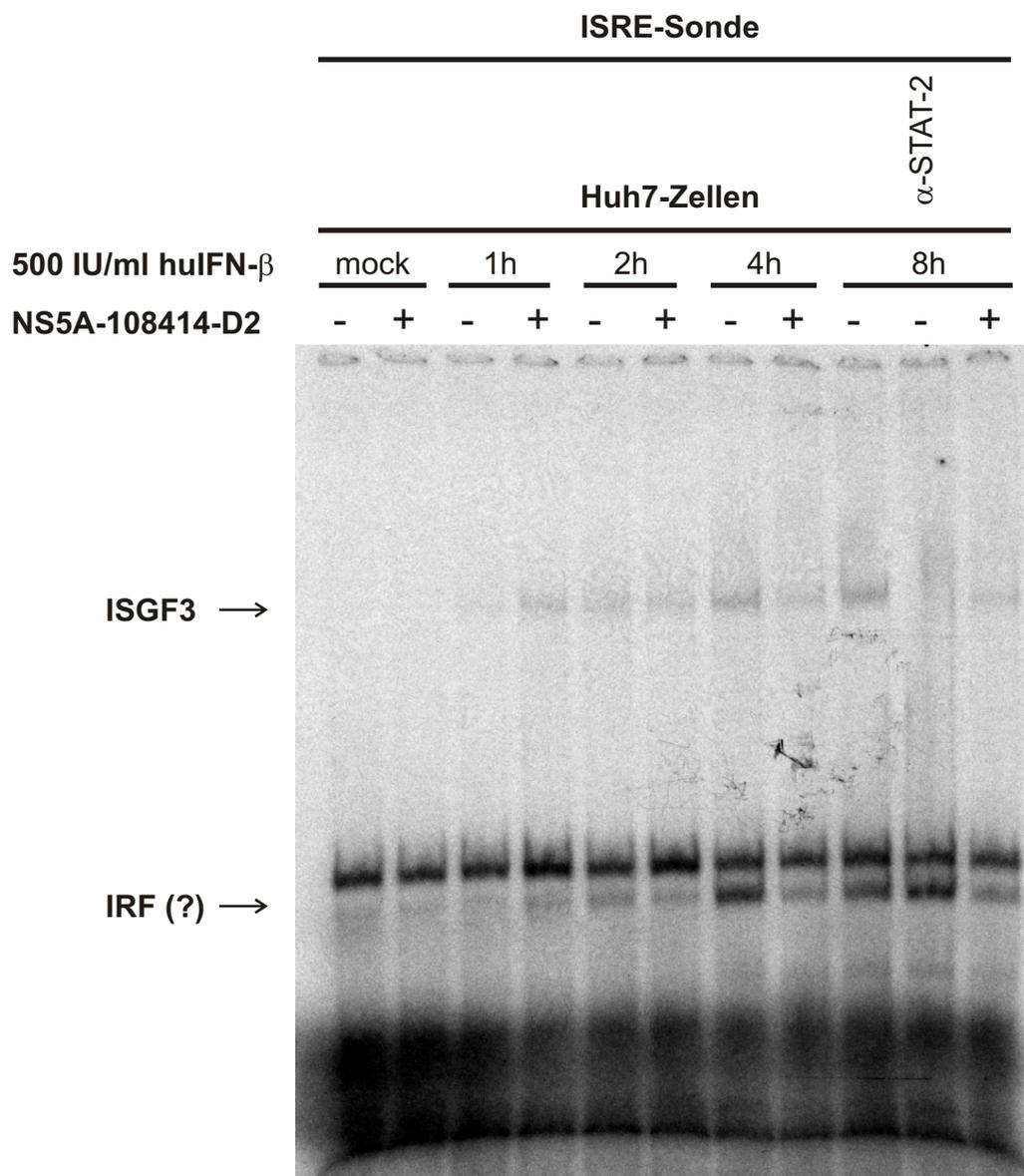
(b)



**Abb. IV.13: Co-Expression von p48 im ISRE-Reporterassay.** Für das ISRE-Reporterassay wurden 293T-Zellen mit je 200 ng pISRE-Luc und pCMV- $\beta$ -GAL transfiziert, sowie 1,8  $\mu$ g Effektor (NS5A bzw. M27) und 1,8  $\mu$ g pcDNA-p48 bzw. Leervektor. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 8 h mit 500 IU huIFN- $\beta$  stimuliert. Die ISRE-Induktion wurde im Luciferaseassay gemessen (a), die allgemeine Expression im Betagalaktosidaseassay (b).

#### IV.4 Gelshiftassay zur Untersuchung zum Einfluss von NS5A auf die ISRE-Bindung von ISGF3

Die bisherigen Daten zeigen, dass NS5A IFN-Signaling im Reporterassay inhibieren kann. Im folgenden wurde die Bindung des Transkriptionsfaktors ISGF3 and eine ISRE-Sonde im Gelshiftassay untersucht. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit dem Expressionsvektor für NS5A 108414-D2 bzw. Leervektor transient transfiziert und nach 48 h für 1–8 h mit huIFN- $\beta$  stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die ISGF3-Bindung an ISRE in Huh7-Zellen,



**Abb. IV.14: NS5A inhibiert die Bindung von ISGF3 an ISRE.** Huh7-Zellen wurden transient mit NS5A bzw. Leervektor transfiziert und mit huIFN $\beta$  stimuliert. Die Zelllysate wurden im EMSA mit einer radioaktiv markierten ISRE-Sonde untersucht. ISGF3 wurde durch einen Supershift mit einem STAT-2-spezifischen Antikörper bestätigt.

die mit Leervektor transfiziert wurden, zeitabhängig zunimmt. Unter NS5A-Expression wurde diese Bindung 1 h nach Stimulation zunächst noch unterstützt, nach 2 h wurde kein Unterschied zwischen Leervektor und NS5A beobachtet. Nach 4–8 h hingegen war NS5A in der Lage, die Promotorbindung deutlich zu inhibieren. Neben ISGF3 wurde ein zweiter nicht charakterisierter, IFN-abhängiger Faktor detektiert, der ebenfalls ISRE binden kann. Hierbei wird vermutet dass es sich um ein IRF handeln könnte, da neben ISGF3 auch andere IRFs ISRE binden könne. Insbesondere IRF-1 zählt zu den später induzierten ISGs und kann ISRE binden (siehe I.9.1).

Auch diese Bindung wird durch NS5A zeitgleich inhibiert. Weiterhin traten keine NS5A-assoziierten Bindungen auf, so dass weder NS5A, noch ein NS5A-induziertes Protein den Promotor binden und ISGF3 kompetitieren kann.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Befunde im Reporterassay, sowohl in Bezug auf die Inhibition des IFN-Signalings, als auch auf dessen Kinetik.

## IV.5 Untersuchung von NS5A-Deletionsmutanten

Zur Analyse eines putativen Motivs, welches für die Inhibition der IFN-vermittelten Signaltransduktion verantwortlich ist, wurden Mutanten von NS5A generiert, denen die in der Literatur beschriebenen Domänen ISDR, PKR-Bindedomäne und V3 deletiert wurden.

### IV.5.1 Design und Klonierung der NS5A-Deletionsmutanten

Als Ausgangsisolat diente NS5A-108414-D2 an dem vier sukzessive C-terminale Deletionen und zwei N-terminale Deletionen durchgeführt wurden. Eine schematische Übersicht der generierten Mutanten ist in Abb. IV.15 dargestellt. Die entsprechenden Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pCAGGS kloniert. Eine Übersicht der generierten Fragmente und das errechnete Molekulargewicht ist in Tab. IV.3 dargestellt. Die Expression der Deletionsmutanten wurde mit verschiedenen NS5A-spezifischen Antikörpern bestätigt (siehe Abb. IV.16).

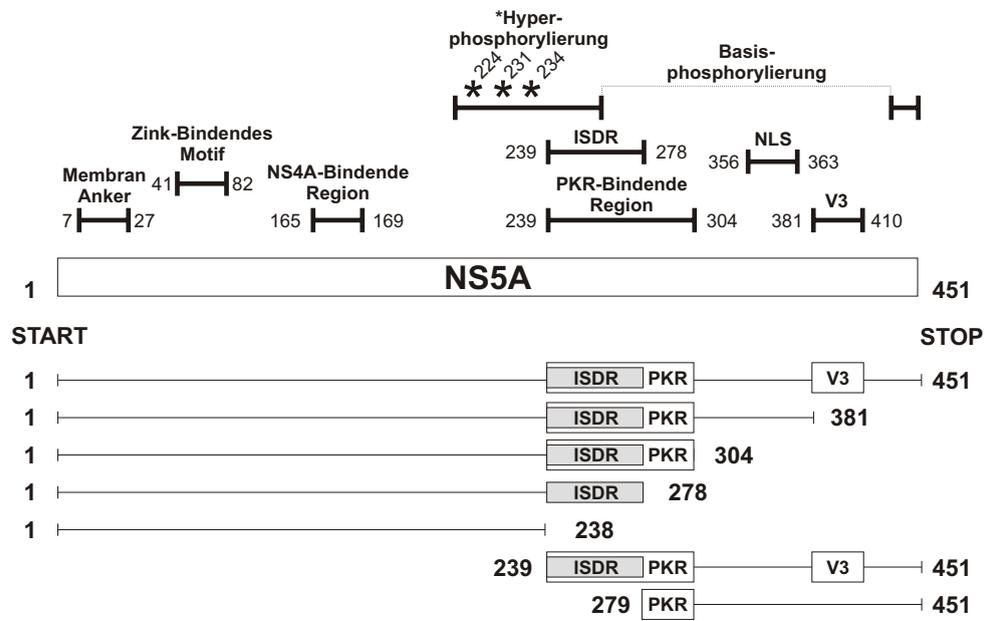
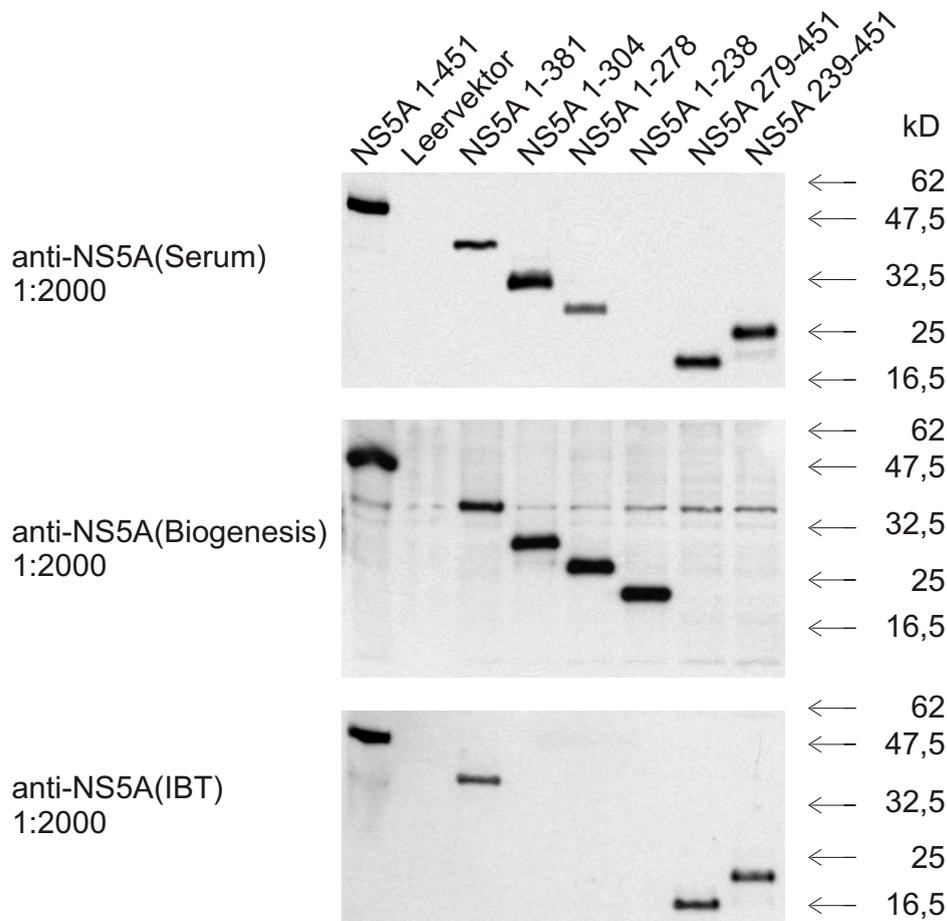


Abb. IV.15: Schematische Darstellung der NS5A Deletionsmutanten.

Tab. IV.3: Primer zur Klonierung von NS5A Deletionsmutanten

NS5A	Primer		Länge	Mol. Gewicht
	sense	antisense		
1-451	HCV-190	HCV-191	1353 nt	56 kD
1-381	HCV-190	HCV-214	1143 nt	42 kD*
1-304	HCV-190	HCV-224	912 nt	33 kD*
1-278	HCV-190	HCV-225	834 nt	31 kD*
1-238	HCV-190	HCV-215	714 nt	26 kD*
239-451	HCV-226	HCV-191	636 nt	23 kD*
279-451	HCV-227	HCV-191	516 nt	19 kD*

\* theoretisches Mol. Gewicht basierend auf der Aminosäuresequenz



**Abb. IV.16: Westernblot der NS5A-Deletionsmutanten.**  $1 \times 10^6$  293T-Zellen wurden mit  $4 \mu\text{g}$  Expressionsvektor transfiziert und die Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Lysispuffer resuspendiert. Die Proteine wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Immunnachweis erfolgte mit den angegebenen Antikörpern. Für das Serum waren N-terminalen Reste 1–238 nicht zugänglich, der Biogenesis Antikörper bindet zwischen den Aminosäuren 1–238 und der IBT-Antikörper zwischen 304–381.

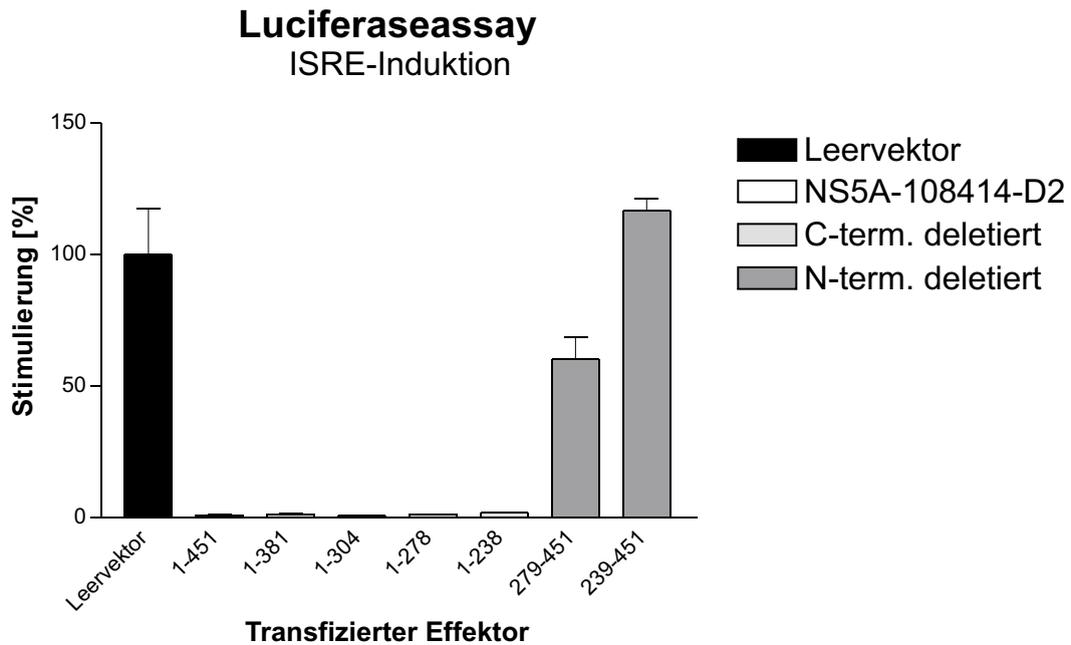
#### IV.5.2 Screening von NS5A-Deletionsmutanten im ISRE-Reporterassay

Analog zum kompletten NS5A wurden die verschiedenen NS5A-Deletionsmutanten im ISRE-Reporterassay untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle C-terminal deletierten NS5A-Proteine in der Lage waren, *IFN-Signaling* zu inhibieren, die beiden N-terminalen Deletionsmutanten hingegen nicht. Insbesondere zeigten die Mutante 239–451 keine und die Mutante 279–451 nur eine geringe ISRE-Inhibition. Die beiden N-terminalen Mutanten wiesen eine leichte Induktion der allgemeinen Proteinexpression auf, analog zur Differenz der ISRE-Inhibition.

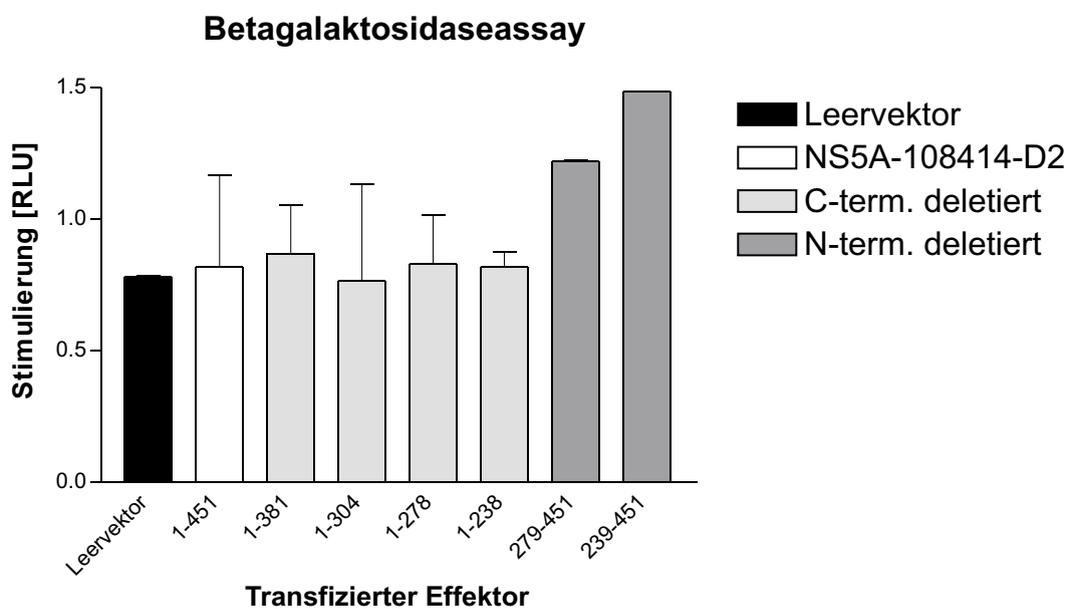
Somit liegt die für die Inhibition ISRE-abhängiger Gene verantwortliche Domäne in den N-terminalen 288 Aminosäuren des NS5A. Mögliche Strukturveränderungen die durch die Deletion des C-Terminus bedingt sind hatten somit keinen Einfluss. Insbesondere sind weder die ISDR, die PKR-Bindedomäne, noch V3 für die Inhibition ISRE-abhängiger

Genexpression verantwortlich. Der N-terminal deletiertes NS5A wies eine leichte Induktion der allgemeinen Proteinexpression auf, die C-terminal deletierten NS5A-Klone hatten hierauf keinen Einfluss.

(a)



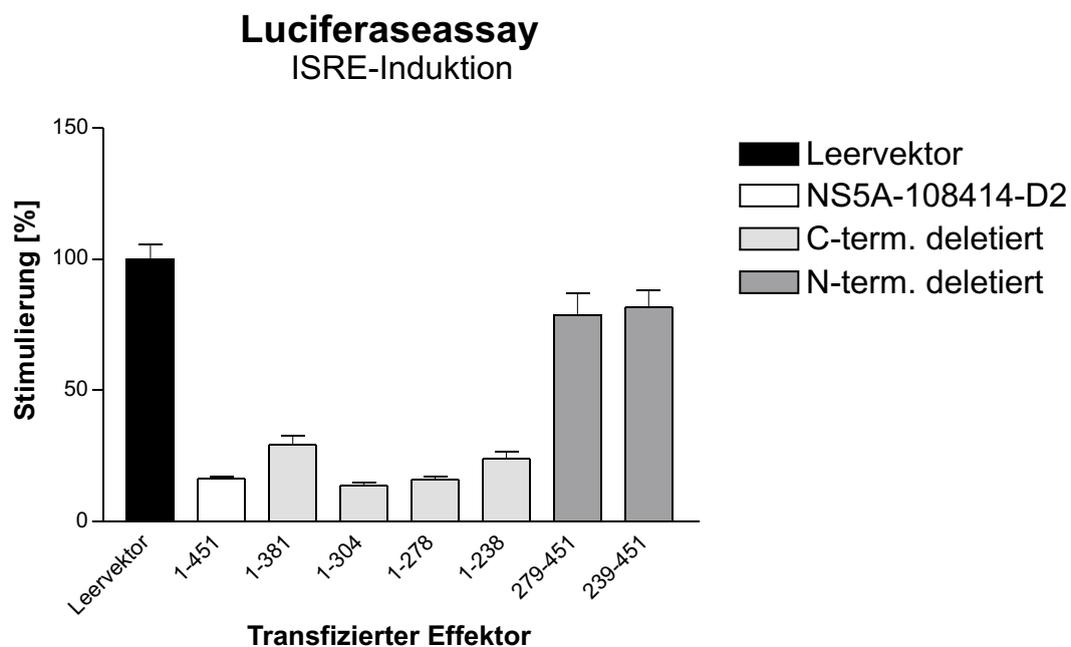
(b)

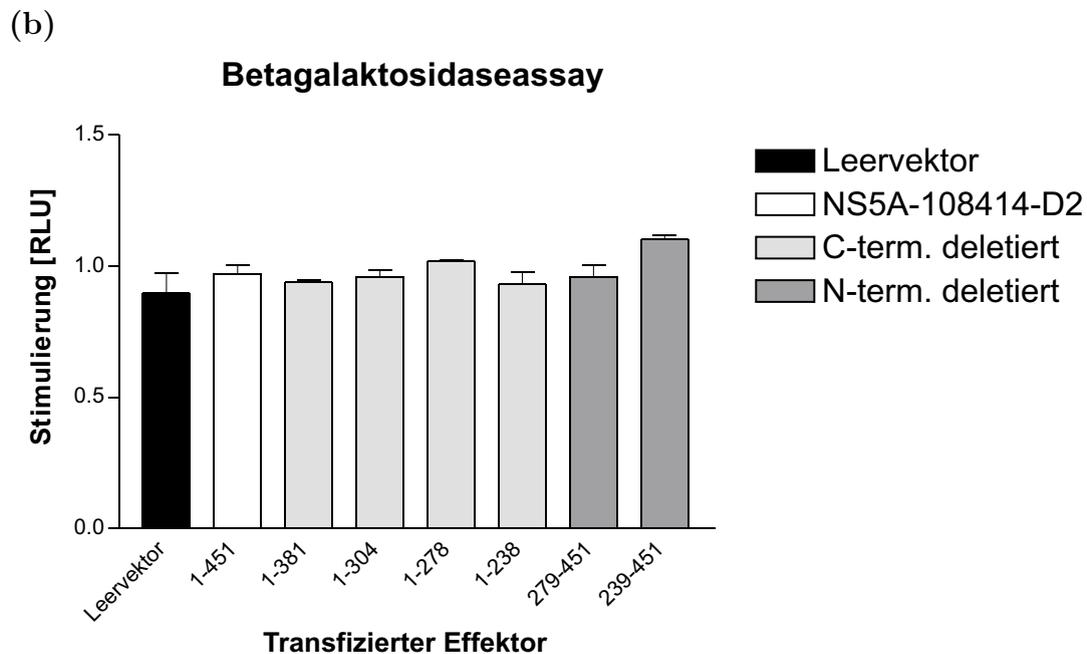


**Abb. IV.17: Inhibition huIFN- $\beta$  abhängigen ISRE-Induktion durch verschiedene NS5A-Deletionsmutanten.** Der Einfluss von 6 verschiedene NS5A-Deletionsmutanten auf die ISRE-Induktion wurden untersucht und mit dem kompletten NS5A-Protein verglichen. Zu Einsatz kamen vier C-terminal deletierte NS5A-Proteine (1-381, 1-304, 1-278, 1-238) und zwei N-terminal deletierte NS5A-Proteine (279-451, 239-451). Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben (Abb. IV.10). Stimuliert wurde mit 500 IU huIFN- $\beta$ .

Die Ergebnisse konnten ebenfalls für das zur IFN-Therapie eingesetzte huIFN- $\alpha$  bestätigt werden. Da beide Typ-1 IFNs den gemeinsamen Rezeptor gleich Effizient binden, ist hier auch kein Unterschied zwischen IFN- $\alpha$ - oder IFN- $\beta$ -Induktion zu erwarten gewesen (Abb. IV.18).

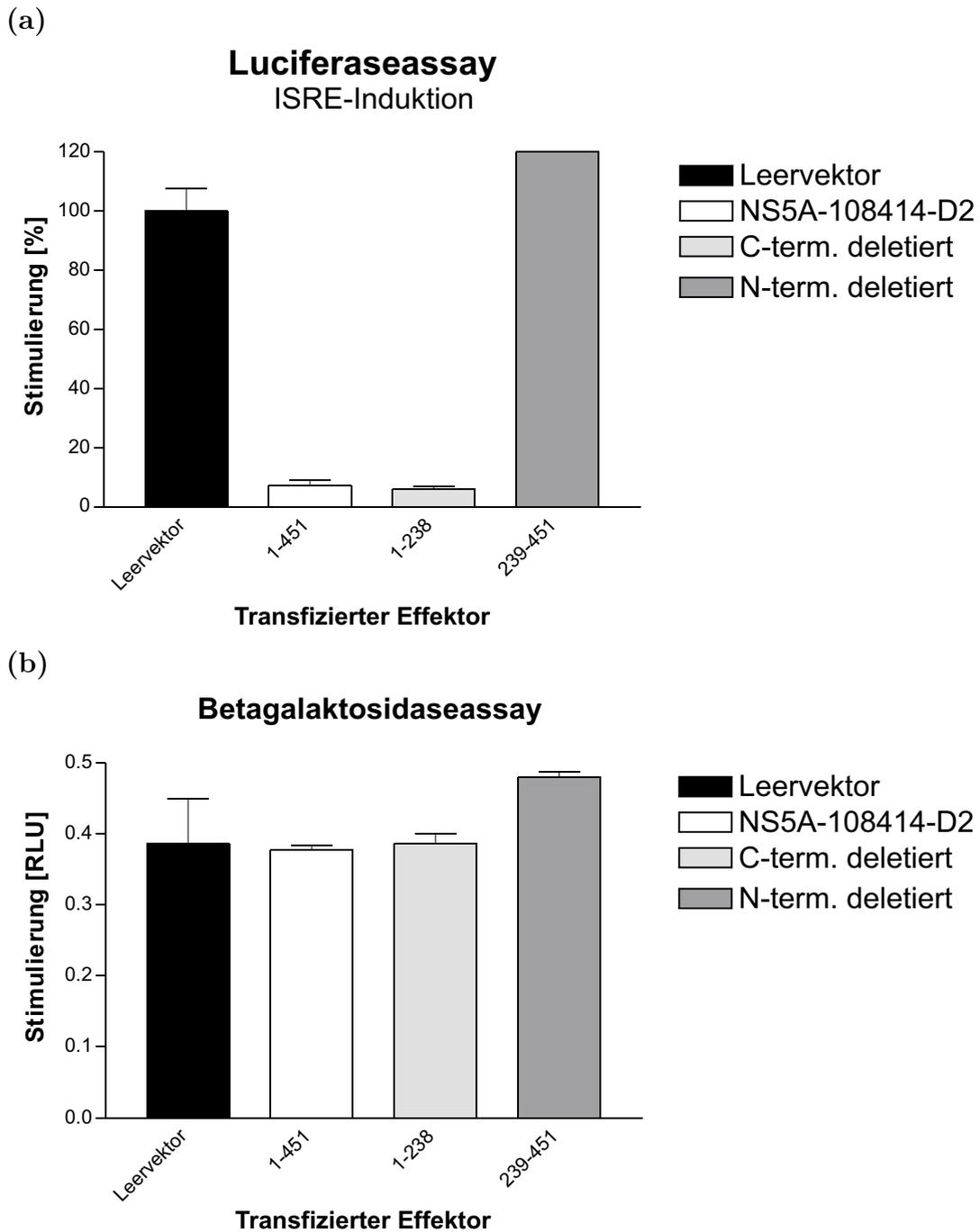
(a)





**Abb. IV.18: Inhibition der huIFN- $\alpha$  abhängigen ISRE-Induktion in 293T-Zellen.** Die Durchführung erfolgte wie zu Abb. IV.17 beschrieben, wobei hier mit 500 IU huIFN- $\alpha$  stimuliert wurde.

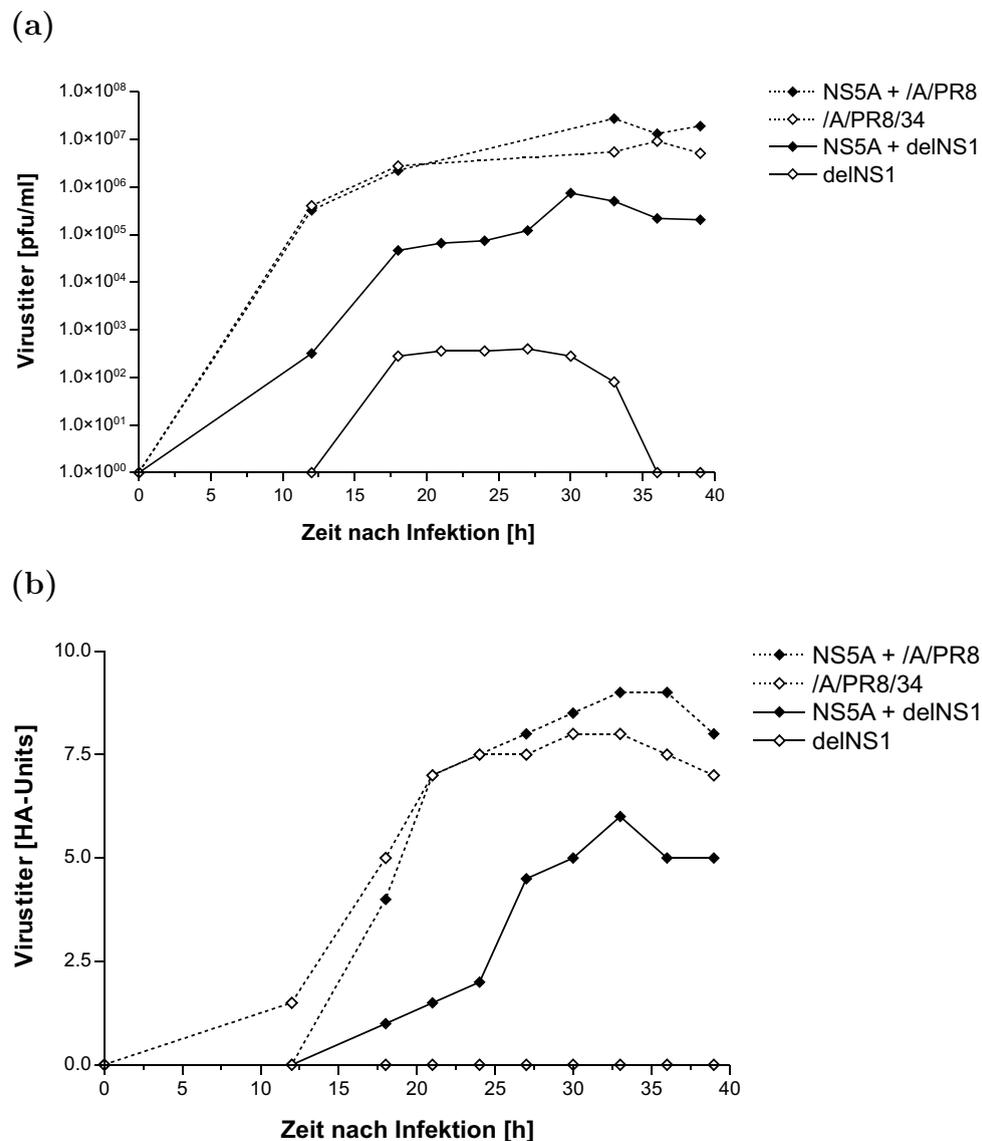
Um einen zelltypabhängigen Effekt auszuschließen wurden die Mutanten 1–238 und 239–451 auch in HEK-293 und der Leberkarzinomzelle Huh7 untersucht. Die zur Transfection von Huh7 notwendige Transfektionseffizienz konnte mit den bisher verwendeten Standardprotokollen für Lipofectamin 2000 nicht erreicht werden, so dass die Transfektion alternativ mit FuGENE 6 (Roche) durchgeführt wurde. Die Transfektionseffizienz wurde an der Anzahl grün-fluoreszierender Zellen nach pEGFP-N1-Transfektion gemessen und lag bei ca. 70 %. Das komplette NS5A-Protein und die Deletionsmutante NS5A 1–238 waren auch in HEK-293 und Huh7-Zellen (Abb. IV.19-a) in der Lage, IFN-*Signaling* auf den ISRE-Reporter zu unterbinden.



**Abb. IV.19: Inhibition der huIFN- $\beta$  abhängigen ISRE-Induktion in Huh7-Zellen.** Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  Huh7-Zellen transient mit 100 ng pISRE-Luc, 100 ng pCMV- $\beta$ -GAL und  $0,8 \mu\text{g}$  pCAGGS-NS5A im Doppelansatz transfiziert und 48 h nach Transfektion für 8 h mit 500 IU humanem IFN- $\beta$  stimuliert. Analog zum 293T-Assay wurde die Stimulierung des ISRE-Reporters im Luciferaseassay (a) und die Stimulierung des pCMV-Reporters im Betagalaktosidaseassay gemessen (b).

## IV.6 NS5A stellt virales Wachstum von delNS1 wieder her

Zur Analyse einer biologischen Relevanz der Inhibition des IFN-*Signalings* wurde das IFN-sensitive, rekombinante Influenza-Virus „delNS1“ als Surrogatmarker für virales Wachstum eingesetzt. MDCK2-Zellen, die NS5A stabil exprimieren und die Spenderzelle wurden mit delNS1 und dem isogene Wildtyp-Virus bei niedriger MOI ( $10^{-3}$ ) infiziert.



**Abb. IV.20: Rescue einer IFN-sensitiven Virus Replikation durch NS5A.** MDCK2-Zellen, die NS5A konstitutiv exprimieren und die isogene Spenderzelle, wurden für 45 min mit Influenza A/PR8/34 bzw. delNS1 bei MOI  $10^{-3}$  infiziert. Anschließend wurde virales Wachstum über 40 h gemessen. Der HA-Titer wurde während der Wachstumskurve bestimmt (a), der Titer infektiöser Partikel wurde im Plaqueassay nach Abschluss der Wachstumskurve bestimmt (b).

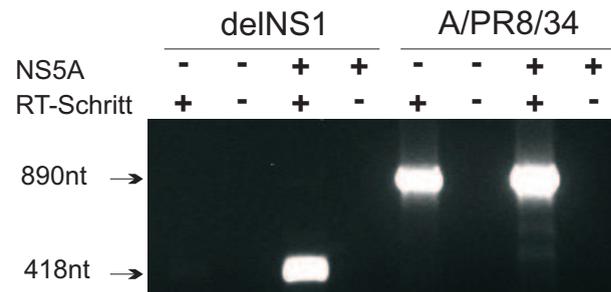
Virus Replikation wurde in einer Wachstumskurve über einen Zeitraum von 40 h gemessen. Hierfür wurde nach 12 h Infektion alle 3 h der HA-Titer während der Infektion und der Plaquetiter nach Abschluss des Experiments aus den eingefrorenen Überständen bestimmt (siehe Abb. IV.20).

Hierbei zeigte sich, dass delNS1-Wachstum auf NS5A-exprimierenden MDCK2-Zellen signifikant wieder hergestellt werden konnte.

30 h nach Infektion hatte das delNS1-Virus auf NS5A-exprimierenden Zellen einen Titer von  $7,4 \times 10^5$  infektiösen Partikeln pro ml, wohingegen auf der Referenzzelle ein maximaler Titer von  $2,8 \times 10^2$  pfu/ml erreicht wurde. Der Wildtyp zeigte keinen Unterschied auf NS5A-exprimierenden Zellen und wies im Wachstumsplateau einen Titer um  $10^7$  pfu/ml auf. Somit war NS5A in der Lage, virales Wachstum um 3 LOG Stufen wiederherzustellen und blieb damit nur eine LOG Stufe unter dem Wildtyp. Ab 30 h p.i. nahm der Titer aufgrund des CPEs, sowohl beim Wildtyp-Virus und bei der Rekombinante ab. Um eine Kontamination mit dem Wildtyp-Virus auszuschließen, wurde das NS-Segment vom Wildtyp und der Rekombinante 30 h p.i. amplifiziert (siehe Abb. IV.21).

Für die Wildtyp-Virus infizierten MDCK2 und MDCK2-NS5A Zellen wurde nur jeweils das das 890 nt grosse NS-Segment amplifiziert. Auf der delNS1 infizierten MDCK2-NS5A Zelle wurde ausschließlich das auf 418 nt verkürzte NS-Segment detektiert. Auf MDCK2 ohne NS5A konnte kein NS-Segment amplifiziert werden, da der Virustiter unter der Nachweisgrenze der RT-PCR lag. Somit ist der Titer von  $7,4 \times 10^5$  pfu/ml auf delNS1 zurückzuführen.

Rescue von Wachstum IFN-sensitiver Viren wurde bereits für EMCV und VSV beschrieben. Diese Untersuchungen zeigen erstmals ein *rescue* eines IFN-sensitiven Influenza-Virus. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da das Wildtyp Influenza-Virus IFN auf Induktionsebene inhibiert. Somit ist NS5A in der Lage die IFN-antagonisierenden Eigenschaften von NS1 *in trans* zu komplementieren.



**Abb. IV.21: RT-PCR des NS-Segmentes.** Aus den Proben der Wachstumskurve wurde 30 h p.i. das NS-Segment mit den spezifischen Primern NSvRNA-5'/3' amplifiziert.