

V

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HCV-NS5A auf das IFN-System untersucht. Die primäre Absicht bestand darin, den molekularen Mechanismus, der einer Therapieresistenz bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zu Grunde liegt, aufzuklären. Vielen HCV-Proteinen wird mittlerweile ein Einfluss auf Komponenten der angeborenen Immunität zugeschrieben. Mangels eines Zellkultursystems zur *in vitro*-Replikation bzw. eines effizienten Tiermodells gibt es hierzu eine Vielzahl unterschiedlicher und teils widersprüchlicher Beobachtungen (siehe I.13). Die Basis dieser Arbeit lieferte ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv, welches im Rahmen von klinischen Studien von unserem Kooperationspartner an der Charité, PD. Dr. T. Berg, betreut wird. Somit können funktionale Daten auch einem charakterisierten klinischen Bild zugeordnet werden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es viele Indizien, die darauf hindeuteten, dass HCV zumindest einen funktionalen IFN-Antagonisten besitzt, dieser konnte jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. E2 und NS5A wurden aufgrund ihrer Interaktion mit der PKR als putative Kandidaten gehandelt. Insbesondere NS5A war von besonderem Interesse, da hier ein Therapieansprechen mit Mutationshäufigkeiten in einer Region korrelierte, die entsprechend als ISDR bezeichnet wurde. Schließlich wurde die virale Protease NS3/4A von Foy et al., 2003 als Antagonist der IFN- β -Induktion charakterisiert, ohne dass hier eine Verbindung zum Therapieansprechen oder Krankheitsverlauf bei chronischen HCV-Patienten hergestellt werden konnte. Basierend auf den bisher bekannten Literaturdaten wurde der Fokus dieser Arbeit auf das NS5A gelegt.

Die Arbeit gliedert sich in vier Bereiche, auf die im Einzelnen eingegangen wird: Untersuchungen zum Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion und Signaling im Reporterassay, Untersuchungen zum molekularen *target*, Mutagenesestudien zur Identifizierung einer funktionellen Domäne und Analysen zur biologischen Relevanz einer Inhibition des IFN-Systems durch NS5A.

V.1 Einfluss von NS5A auf IFN-Induktion

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener klonaler NS5A-Proteine auf IFN-Induktion und IFN-induziertes Signaling im Reporterassay untersucht. In Bezug auf die Induktion bestätigten sich die bereits beschriebenen Beobachtungen (siehe I.13), dass NS5A hierauf Einfluss nehmen kann. Die Ergebnisse zeigen ein sehr heterogenes Bild, da die verschiedenen Isolate nur eine mäßige bis keine Inhibition aufwiesen. Andere charakterisierte IFN-Antagonisten, wie das NS1-Protein von Influenza A oder das VP35-Protein von Ebola, zeigen unter gleichen Versuchsbedingungen eine deutlich stärkere Inhibition und stellen somit eine biologische Relevanz dieser Inhibition in Frage. Es wird vermutet, dass dieses zu einem nicht unerheblichen Teil auf einem synergistischen *Feedback* der Signaltransduktionswege im IFN-System beruht. Insbesondere IRF-7 stellt hier ein mögliches Bindeglied zwischen den beiden Signalwegen dar.

Die Reporterassays zur IFN-Induktion wurden, im Gegensatz zum IFN-*Signaling*, auf caninen Zellen durchgeführt, da diese permissiv für eine Infektion mit der IFN-sensitiven Rekombinante des Influenza A Virus A/PR8/34 „delNS1“ waren. Das NS1 stellt in diesem System den natürlichen IFN-Antagonisten dar und kann funktional durch das VP35-Protein, also einem IFN-Antagonisten eines anderen Virus, ersetzt werden. Versuche, dieses System auf für HCV natürlicheren Huh7-Zellen zu portieren, scheiterten zum einen an einer niedrigen Transfektionseffizienz mit Lipofectamin 2000, zum anderen an einer zu geringen Permissivität der Zellen für das delNS1-Virus.

Mechanismen der IFN-Antagonisation sind oft sehr spezifisch und eng an die Interaktion mit dem Wirt geknüpft. So haben z.B. das humane und murine Zytomegalievirus unterschiedliche Strategien entwickelt, IFN zu antagonisieren, die differente molekulare *Targets* inhibieren und somit nur speziesspezifisch wirken (siehe I.12). Folglich kann man nicht davon ausgehen, dass, obgleich NS1 und VP35 im caninen System funktionieren, dies auch für das NS5A-Protein zutrifft.

Diese Daten zeigen das Verhalten von NS5A in einem etablierten Modell zur Analyse der Inhibition der IFN- β Induktion. Obgleich eine positive Inhibition in diesem Modell einen guten Hinweis auf eine biologisch relevante IFN-Antagonisierung gibt, kann ein negatives Ergebnis diese für sich nicht ausschließen.

Da der Effekt von NS5A auf IFN-Signaling viel stärker ausgeprägt war, wurde der Fokus weiterer Untersuchungen auf diesen Signalweg gesetzt.

V.2 Einfluss von NS5A auf IFN-Signaling

Eine Inhibition des IFN-Signaling durch NS5A konnte reproduzierbar in verschiedenen Nachweissystemen gezeigt werden. In Reporterassays konnte zunächst gezeigt werden, dass NS5A funktional in der Lage ist, den antiviralen Effekt von Typ-1 IFN zu inhibieren. Es wurde ein titrierbarer und spezifischer Effekt in verschiedenen humanen Zelllinien

gezeigt und konnte durch Deletion funktionaler Domänen im NS5A aufgehoben werden.

Westernblot-Untersuchungen der Kinetikproben zeigten zunächst, dass das p48 ein mögliches *Target* der Inhibition sein könnte. Da p48 selbst ein ISG darstellt, konnte in ersten Untersuchungen nicht zwischen Ursache oder Wirkung unterschieden werden. Die Expression von STAT-1 und STAT-2 war in IFN-stimulierten und NS5A-transfizierten Zellen etwas geringer, als in Zellen ohne NS5A.

Durch Überexpression von p48 konnte der antagonistische Effekt aller untersuchten NS5As (inkl. der Genotypen 1a, 1b und 3) wieder rückgängig gemacht werden. Es wurde ein allgemeiner Anstieg der ISRE-induzierten Genexpression beobachtet. Da p48 selbst ein ISRE-induziertes Gen darstellt, wird durch die konstitutive Expression das positive *Feedback* auf die Kaskade vorweggenommen. Unter gleichen Versuchsbedingungen war das M27-Protein weiterhin in der Lage, IFN-Signaling zu inhibieren, so dass die Überexpression von p48 nicht zu einem allgemeinen positiven Effekt geführt hat, sondern eine spezifische Inhibition durch NS5A vorliegt. Somit kann man postulieren, dass das molekulare *target* der Inhibition des IFN-Signaling durch NS5A das p48-Protein darstellt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 14 differente NS5A-Proteine funktional untersucht, von denen alle IFN-Signaling inhibieren konnten. Interessanterweise war dies sowohl unabhängig vom viralen Genotyp, als auch vom Therapiestatus des Patienten. Diese Ergebnisse stehen den Beobachtungen, dass der Therapieerfolg mit dem viralen Genotyp assoziiert ist, zunächst entgegen, so dass anzunehmen ist, dass weitere Faktoren, insbesondere Wirtsfaktoren, hierfür verantwortlich sind. Natürlich können auch virale Faktoren zu einer Modifikation von NS5A führen, die die IFN-antagonisierenden Eigenschaften von NS5A beeinträchtigen. Dies könnte insbesondere beim HCV-Replikon eine Rolle spielen, da sich dieses bisher prinzipiell IFN-sensitiv verhält. Um *in vitro*-Replikation von HCV-RNA zu ermöglichen, wurden in das Replikon adaptive Mutationen eingeführt, vorwiegend im NS5A und insbesondere an Phosphorylierungsstellen. Da die Phosphorylierung von NS5A bei der Regulation von RNA-Replikation eine Rolle spielt, könnte auch dies bei der IFN-Antagonisierung relevant sein. Der Phosphorylierungsstatus von NS5A in den transfizierten 293T oder Huh7-Zellen entspricht nur teilweise den nativen Bedingungen. Exogen exprimiertes NS5A liegt als phosphoryliertes 56 kD grosses Protein vor. Virales NS5A wird *in cis* durch NS3/4A vom Polyprotein gespalten und das basalphosphorylierte NS5A (p56) wird teilweise durch einen Komplex aus NS3/4A/4B hyperphosphoryliert (p58).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen den kürzlich publizierten Beobachtungen von Aus dem Siepen et al., 2005 entgegen. Die Autoren postulieren hier, dass das NS5A-Protein nicht zur Resistenz von HCV gegen IFN- α im Zellkultursystem beiträgt. In dieser Arbeit wurden, analog zu dem eigenen Ansatz, verschiedene NS5As von Patienten mit unterschiedlichem Therapieansprechen verglichen. Es wurde ausschließlich das Replikonmodell verwendet und IFN-Sensitivität über RNA-Replikation mittels quantitativer *Real-Time-PCR* charakterisiert. Eine NS5A-Proteinexpression konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Die Titrationsexperimente in dieser Arbeit haben gezeigt, dass bei geringeren NS5A-Mengen die Kapazität, IFN-Signaling zu inhibieren, stark abnimmt, so dass eine Diskrepanz dieser Ergebnisse auf unterschiedlichen Expressionsverhältnissen beruhen könnte. Auch können Modifikationen am NS5A insbesondere durch das HCV-Replikon nicht ausgeschlossen werden.

Ein Einfluss von NS5A auf IFN-Signaling wurde bereits im *Microarray* beschrieben (siehe I.13) und wird durch diese Untersuchungen bestätigt. Geiss et al., 2003 konnten zeigen, dass das HCV-Replikon, trotz hoher Mengen an dsRNA, fast keine ISG induziert. Dies steht sicherlich im Zusammenhang mit der Inhibition der IFN- β -Induktion durch HCV-NS3. Geiss et al., 2003 konnten zeigen, dass das NS5A für sich allein in der Lage ist, IFN-Signaling zu inhibieren, das komplette HCV-Replikon hingegen nur sehr eingeschränkt. Dies wird durch die eigenen Ergebnisse, so wie durch die Ergebnisse von Aus dem Siepen et al., 2005, unterstützt.

Für diese Diskrepanz können verschiedene Faktoren, insbesondere der Grad der NS5A-Expression, zellspezifische Faktoren und die Präsenz anderer HCV-Proteine verantwortlich sein. Zusätzlich könnte es, durch die hohe Fehlerrate der viralen RdRp, zu Mutationen im Replikon kommen, welche die Replikationseffizienz und auch IFN-Antagonismus beeinflussen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Inhibition des IFN-Signalings, die funktionelle Domäne und eine biologische Relevanz der *in vitro*-Daten untersucht.

V.3 NS5A inhibiert die Promotorbindung von ISGF3

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus wurden zunächst Promotorbindungsstudien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass NS5A direkt die Bindung des Transkriptionskomplexes ISGF3 an ISRE unterbinden kann. Hierbei zeigte sich zum einen, dass NS5A nicht selbst an ISRE bindet oder ein anderes Gen induziert, welches ISRE direkt bindet, und zum anderen, dass deutlich weniger ISGF3 vorhanden ist. Interessant ist die Kinetik, da die Bindung des Transkriptionsfaktors nicht sofort inhibiert wurde, sondern erst 4–6 h nach Stimulation mit IFN. Somit muss ein ISG an der NS5A-vermittelten Inhibition der Promotorbindung beteiligt sein. Auch im Luciferaseassay wurde eine ähnliche Kinetik beobachtet, wobei hier auch die messbare Expression der Luciferase ein verzögernder Faktor sein könnte. M27, welches STAT-2 degradiert, inhibiert den Promotor sofort.

Zusätzlich zu der Bindung von ISGF3 an ISRE, konnte 4 h nach Stimulation mit IFN, eine weitere Komponente identifiziert werden, die ISRE binden kann und im Vergleich zu ISGF3 deutlich kleiner ist. Im Westernblot konnte dieses Protein mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um IRF-1 handeln könnte, da eine Bindung von IRF-1 an ISRE beschrieben ist. IRF-1

wird nicht konstitutiv exprimiert und es hat eine kurze Halbwertszeit. Somit würde die Kinetik von IRF-1 zu der im EMSA identifizierten und durch NS5A inhibierten Komponente passen. Eine Inhibition von IRF-1 durch NS5A wurde von Pflugheber et al., 2002 bereits beobachtet. IRF-1 wird insbesondere durch Typ-2-IFN induziert. Da auch diese Bindung durch NS5A unterbunden wird, wäre dies ein Indiz für ein Zusammenspiel der beiden Kaskaden, welches auch von Zimmermann et al., 2005 beobachtet wurde. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, um diesen Faktor eindeutig zu identifizieren.

Die Inhibition der ISGF3-Bindung an die ISRE-Sonde war weder nach 4 noch nach 8 h absolut, was sicherlich auch mit der transienten Transfektion zusammenhängt. Bei den Reporterassays ist die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen, die einen Reporter aufgenommen haben, auch den Effektor transfiziert exprimieren, vergleichsweise hoch. Insbesondere da das Effektorplasmid im 40-fachen Überschuss zum Reporterplasmid transfiziert wurde. Zellen, die nur den Reporter beinhalten und bei IFN-Stimulation ein falsches positives Signal geben, haben somit keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Reporterassays. Anders sieht es bei den Untersuchungen im Gelshiftassay aus. Zum einen wurden Huh7-Zellen verwendet, welche für sich eine geringere Transfektionseffizienz aufwiesen als 293T-Zellen und zum anderen werden alle Zellen gemessen, also auch nicht-transfizierte. Insgesamt zeigen diese Daten, dass NS5A in Huh7-Zellen in der Lage ist, die Bindung des Typ-1-IFN stimulierten Transkriptionsfaktors «ISGF3» and ISRE zu unterbinden.

V.4 Mutagenesestudien

Zur Untersuchung einer funktionellen Domäne wurden Mutagenesestudien durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die bekannten funktionellen Domänen ISDR, PKR-Bindedomäne und V3 deletiert. Die von Song und Kollegen beschriebenen apoptoseabhängigen N-terminalen Deletionsmutanten wurden unter IFN-Stimulation nicht beobachtet und daher auch nicht funktional untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass C-terminal trunkiertes NS5A «ohne ISDR» ebenso in der Lage ist, IFN-*Signaling* zu inhibieren, wie das komplette Protein. Hieraus ergibt sich, dass weder die ISDR, PKR-Bindung oder V3 in Bezug auf IFN-*Signaling* eine funktionale Relevanz aufweisen. Die funktionelle Domäne für die Inhibition des IFN-Signalings wurde somit zunächst auf die N-terminalen 288 Aminosäuren gemappt. Die damit verbundenen Deletionen der basalen Phosphorylierungsstellen hatte keinen Einfluss auf die IFN-Inhibition. Die Deletionsmutante 1–238 besitzt jedoch alle drei Serine zur Hyperphosphorylierung. Untersuchungen zum Einfluss der Hyperphosphorylierung auf die Inhibition des IFN-Signalings könnte neue Einsichten zur Therapieresistenz offen legen. Weitere Deletionsmutanten sowie spezifische Punktmutationen an den Hyperphosphorylierungsstellen sind essentiell, um die funktionale Domäne weiter zu charakterisieren. Zu den verbleibenden bekannten funktionalen Regionen gehören der Membrananker, das Zink-Bindemotiv, die NS4-Interaktionsdomäne und die Hyperphosphorylierungsstellen.

V.5 Biologische Relevanz

Reporterassays stellen für sich nur ein Modell dar und sind abhängig von einer Reihe bekannter sowie unbekannter Faktoren, die ein Ergebnis maßgeblich beeinflussen können. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Zellen, sowie ein direkter Nachweis der Inhibition der ISGF3 Bindung an ISRE unterstreichen die im Reporterassay gezeigten Beobachtungen. Dennoch wurde auch nach einem System gesucht einen biologisch relevanten Effekt zu messen.

Da es zum Zeitpunkt dieser Arbeit neben dem HCV-Replikon, welches IFN-sensitiv ist, kein effizientes Zellkultursystem zur Virusvermehrung gab und das HCV-Replikon nur durch adaptive Mutationen im NS5A replizierte, konnte eine biologische Relevanz des IFN-Antagonisten NS5A nicht im HCV-System selbst nachgewiesen werden. Daher wurde auf das Influenza A-Virus als Surrogatmarker zurückgegriffen. Hierzu wurde der Einfluss von NS5A auf eine IFN-sensitive Rekombinante des Influenza A-Virus „delNS1“ untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass NS5A virales Wachstum von delNS1 auf IFN-kompetenten Zellen *in trans* wieder herstellen kann. NS5A war somit in der Lage, die IFN-antagonistischen Eigenschaften von NS1 funktional zu komplementieren. Basler und Kollegen konnten zeigen, dass das VP35 von Ebola hierzu ebenfalls in der Lage ist (Basler et al., 2003). NS1 und VP35 sind beides Antagonisten der IFN-Induktion. Die Komplementierung durch NS5A zeigt, dass eine Inhibition der IFN-Induktion auch durch eine Inhibition des IFN-Signalings funktional ersetzt werden kann. Ein *rescue* von Viruswachstum auf IFN-stimulierten Zellen durch NS5A ist bisher nur für die RNA-Viren EMCV und VSV beschrieben.

Diese Untersuchungen zeigen erstmalig, dass NS5A in der Lage ist, den Influenza A IFN-Antagonisten NS1 funktional zu ersetzen.

V.6 IFN-Antagonismus und die Konsequenzen für die antivirale Therapie

Die IFN- β -Induktion ist zwar eine essentielle Komponente des angeborenen Immunsystems, wird aber durch die exogene Gabe von IFN während der Therapie teilweise umgangen. Obwohl die Komponenten der IFN-Induktion und des IFN-*Signalings* eng miteinander verknüpft sind und synergistisch wirken, reicht ein IFN-Antagonismus im Induktionspathway nicht aus, IFN-*Signaling* zu inhibieren. Dies zeigt sich insbesondere beim HCV-Replikon, welches durch das NS3/4A die IFN-Induktion unterdrückt und trotzdem sensitiv auf exogenes IFN reagiert. Wichtig ist, dass Therapieresistenz nicht gleichzusetzen ist mit IFN-Antagonismus. Durch die Kombinationstherapie bezieht sich die Therapieresistenz sowohl auf den Effekt des IFN, als auch auf dessen Synergismus mit Ribavirin. SVR-Patienten, die mit einer Kombinationstherapie behandelt wurden, könnten also durchaus

ein Virus mit einem IFN-resistenten Phänotyp tragen.

Für viele Viren ist ein Zusammenhang zwischen Pathogenese und IFN-Antagonismus gezeigt worden, so dass im Ansatz dieser Arbeit vermutet wurde, dass es einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen IFN-Antagonismus und Therapieansprechen geben könnte. Aufgrund der vielen verschiedenen Mechanismen IFN zu antagonisieren, die für HCV beschrieben sind, ist wohl kein Effekt für sich alleine für das Therapieversagen verantwortlich, sondern ein synergistisches Zusammenspiel vieler Mechanismen.

Dies steht wiederum im Widerspruch zur ISDR-Hypothese, die das NS5A als Faktor für die Therapieresistenz postuliert. Obgleich eine statistische Signifikanz im Zusammenhang mit der Anzahl von Mutationen in der ISDR eindeutig gezeigt wurde (Pascu et al., 2004), ist ein funktionaler Zusammenhang zum Therapieansprechen fraglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch ein trunkiertes NS5A ohne ISDR funktional in der Lage ist, IFN-Signaling zu antagonisieren.

Ebenso wichtig ist sicherlich der genetische und immunologische Hintergrund eines Patienten. *Follow-up*-Untersuchungen von Patientinnen, die im Rahmen der Rhesusprophylaxe mit HCV-kontaminierten anti-D Chargen infiziert wurden, haben gezeigt, dass trotz gleicher Infektionsquelle sehr unterschiedliche Therapie- und Krankheitsverläufe möglich sind (Wiese et al., 2000). Somit hat sich die ursprüngliche Annahme, dass vom Therapiestatus eines Patienten ausgehend ein Protein besser oder schlechter IFN antagonisieren kann, nicht bestätigt. Das System ist zu komplex, als dass sich hierzu eine einfache „ja-nein“-Antwort generieren ließe.

Für HCV ist bekannt, dass das Therapieansprechen stark vom viralen Genotyp abhängt, insbesondere der Genotyp 3 spricht deutlich besser auf die IFN-Therapie an, so dass die Ursache hierfür auf Virusseite vermutet wurde. Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigen, dass die antagonistische Wirkung von NS5A unabhängig vom Therapieansprechen des Patienten sein kann, da alle untersuchten Volle-Länge-NS5A-Klone in der Lage waren, IFN-Signaling zu inhibieren. Dies wurde z.B. auch von Polyak et al., 1999 in *trans-rescue* Experimenten beim VSV beobachtet. Allerdings gibt es auch hierzu Gegenbeispiele, so dass auch andere Faktoren, maßgeblich an der Therapieantwort beteiligt sein müssen. Es ist bekannt, dass Polymorphismen in immunmodulatorischen Genen, sowie bei putativen Rezeptorkandidaten Einfluss auf Therapie und Krankheitsverlauf ausüben (Suzuki et al., 2004; Oleksyk et al., 2005; Knapp et al., 2003; Houldsworth et al., 2005; Mueller et al., 2004). Da das Virus höchst variabel ist, widerspräche es aber der natürlichen Selektion, wenn sich eine IFN-resistente Quasispezies im Zuge der IFN-Therapie nicht durchsetzen würde.

V.7 HCV und das IFN-System

Von den HCV-Proteinen, die Einfluss auf die angeborene initiale Immunantwort nehmen, wurde bisher nur für HCV-Core und HCV-NS5A ein Effekt auf den IFN-Signaling *Pathway* beschrieben. Lin et al., 2005 konnten kürzlich zeigen, dass HCV-Core IFN-Signaling durch proteasomalen Abbau von STAT-1 inhibieren kann. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass NS5A neben dem bisher beschriebenen Einfluss auf IFN-Induktion, vor allem die Induktion ISRE-abhängiger Gene inhibiert. Hierbei wurde das p48 als putatives *target* identifiziert. Eine Übersicht des erweiterten Modells zum Einfluss von HCV auf das humane IFN-System ist in Abb. V.1 dargestellt.

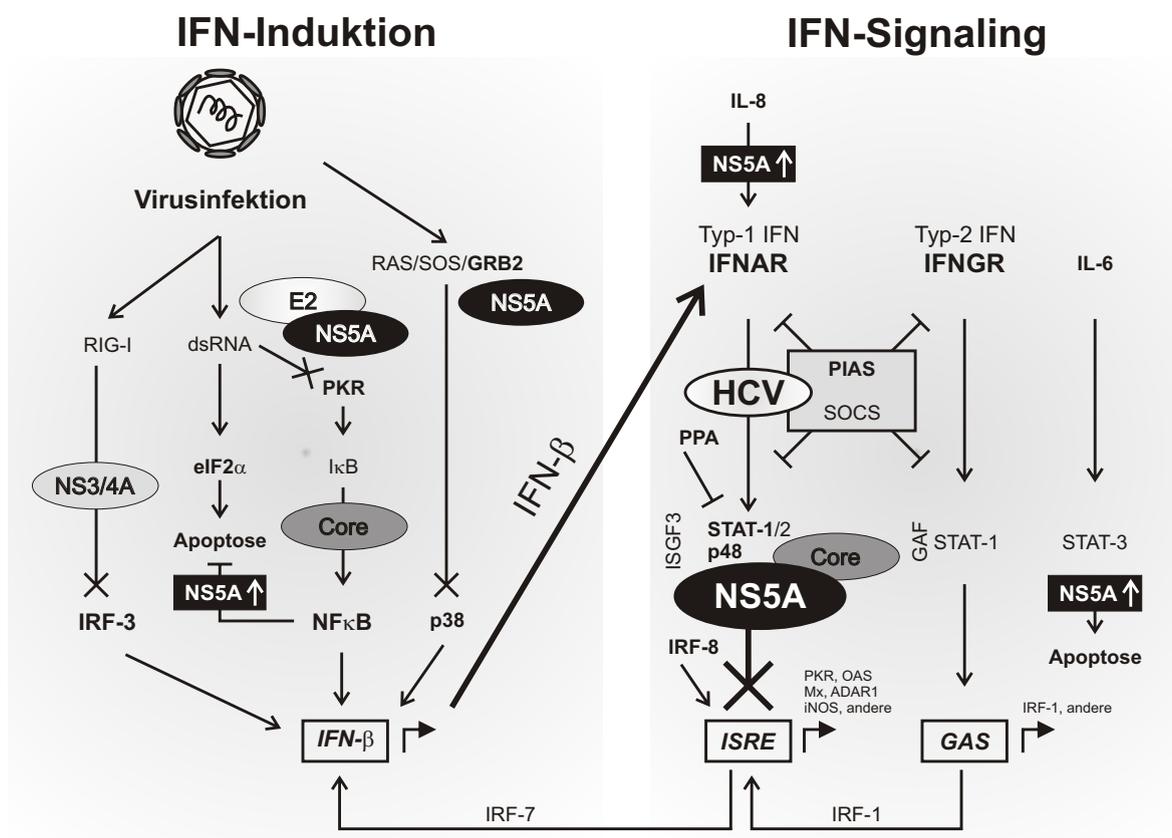


Abb. V.1: Schaubild zum Einfluss von HCV-Proteinen auf das IFN-System. Der putative Einfluss der HCV-Proteine Core, E2, NS3/4A und NS5A ist schematisch dargestellt.

V.8 Ausblick und Perspektiven

Es konnte gezeigt werden, dass NS5A unabhängig vom viralen Genotyp und Therapieansprechen des Patienten, in der Lage ist, ISRE-vermittelte Genexpression *in vitro* zu inhibieren. Der Nachweis eines direkten Einfluss von NS5A auf die Expression spezifischer antiviraler Gene muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um einen Zusammenhang der IFN-Antagonisierung und Therapieansprechen zu verstehen.

Untersuchungen zur IFN- β -Induktion, zeigten in dem verwendeten Modellsystem keine signifikant und reproduzierbare Inhibition. Hier müssen verschiedene Nachweissysteme etabliert werden, um ggf. auch ein negatives Ergebnis eindeutig belegen zu können. Untersuchungen zum Einfluss von NS5A auf die Stimulation mit IFN plus Ribavirin wären hier auch interessante Ansätze.

In Zellkultur wurde die Bindung von ISGF3 an ISRE ab 4 h nach IFN-Stimulation durch NS5A inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass dies mit einer Abnahme von p48 bei konstanter STAT-Expression korreliert. In co-Transfektionsexperimenten wurde gezeigt, dass Überexpression von p48 die Inhibition durch NS5A spezifisch wiederherstellen kann. Welcher spezifische Mechanismus der Inhibition von p48 zugrunde liegt ist noch nicht bekannt.

Die funktionelle Domäne der Inhibition des IFN-Signalings wurde auf die N-terminalen 288 Aminosäuren kartiert; somit ist keine der mit IFN-Antagonisierung assoziierten Domänen im NS5A (ISDR, PKR-Bindung oder V3) hierfür essentiell. Eine weitere Eingrenzung der funktionalen Domäne, insbesondere hinsichtlich der Phosphorylierungsstellen, könnte Aufschluss über den spezifischen Mechanismus der Inhibition von p48 liefern.

Die biologische Relevanz der Inhibition durch NS5A wurde mit delNS1, einer IFN-sensitiven Rekombinante des Influenza A-Virus, bestätigt. Da für Influenza ein Reverses-Genetik-System existiert, rekombinante Viren herzustellen, wäre ein Influenza-Virus, welches anstelle des eigenen NS1-Proteins NS5A exprimiert, ein exzellentes Modell, um NS5A als IFN-Antagonisten weiter zu untersuchen.

Das Verständnis, wie HCV eine IFN-induzierte antivirale Immunantwort umgehen kann, eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten. Die Identifizierung von genetischen Markern, über die sich ein Krankheitsverlauf oder Therapieansprechen vorhersagen lässt, ist ein wichtiges Ziel in der HCV-Forschung, da dieses die Grundlage individueller Therapiestrategien bei der chronischen Hepatitis C darstellt. Im Ansatz wurde die ISDR als ein solcher Marker identifiziert, stellt aber kein absolutes Maß dar. Die eigenen Daten zeigen, ebenso wie die vorgestellten Literaturdaten, dass kein einzelner Mechanismus so stark dominiert, dass sich anhand dessen verlässliche Prognosen zum Verlauf oder Therapie einer chronischen Hepatitis C erstellen ließen, insbesondere da hier multiple Mechanismen sowohl beim Virus, als auch beim Wirt beteiligt sind.

Bedingt dadurch, dass ein *in vitro*-System zur Vermehrung von HCV erst jetzt in greifbare Nähe rückt und der Goldstandard zur Untersuchung von HCV-Replikation, das HCV-Replikon, nicht die bei Patienten beobachtete IFN-Resistenz aufweist, stellen auch

diese Untersuchungen ein Modell zur IFN-Antagonisierung von HCV dar. Dies wird sich erst ändern, wenn man in der Lage ist, Virus aus dem Patienten in Zellkultur anzuzüchten. Die kürzlich beschriebene Etablierung eines infektiösen Klons stellt einen wesentlichen Schritt in diese Richtung dar. Viele der in dieser Arbeit vorgestellten Methoden sind dann auch im Infektionsmodell durchführbar.