

Abschlussbericht

Allgemeine Angaben

Projekttitle

Etablierung von Zellkultur- und in vitro Systemen zur Bestimmung molekularer Determinanten der Interferon-alpha Resistenz des Hepatitis C Virus

Antragsteller

Prof. Dr. rer. nat. Ralf Bartenschlager
Abteilung Molekulare Virologie
Hygiene-Institut
INF345, 1. OG
Prof. Dr. Ralf Bartenschlager
Telefon-Nr.: 06221 - 564569
Telefax-Nr.: 06221 - 564570
E-mail: Ralf_Bartenschlager@med.uni-heidelberg.de

Ausführende Stelle

Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 672
69120 Heidelberg

Projektleiter

Der Antragsteller

Dauer des Projekts

01.02.2002 – 31.01.2005

I. Aufgabenstellung und Vorhabensplanung

1. Aufgabenstellung

Das Projekt hat die Identifikation und Charakterisierung viraler Determinanten zum Ziel, die für eine Resistenz des HCV gegenüber dem Interferon-alpha (IFN- α)-induzierten antiviralen Status verantwortlich sind. Trotz widersprüchlicher Berichte in der Literatur, die für oder gegen virus-eigene, resistenz-vermittelnde Faktoren sprechen, ist klar belegt, dass die Ansprechrate von Patienten, die mit Genotyp 2 und 3 HCV-Varianten infiziert sind, deutlich besser ist als bei Patienten, deren Infektion durch Genotyp 1 und 4-Isolate bedingt ist. Diese Beobachtung spricht sehr für die Existenz viraler IFN- α Resistenzfaktoren, wobei unklar ist, um welche Faktoren es sich dabei handelt. Widersprüchliche Befunde existieren auch zu der möglichen Rolle von Core, E2 oder NS5A als Resistenzdeterminante. Klinische Studien weisen darauf hin, dass insbesondere das NS5A eine wichtige Rolle spielen könnte und es wird vermutet, dass durch die Bindung von NS5A an die Proteinkinase PKR die IFN- α induzierte Hemmung der Translation aufgehoben wird. Allerdings wurden diese Befunde in sehr artifiziellen Zellkultur- und in vitro Systemen erhoben, weshalb die in vivo Relevanz noch vollkommen unklar ist.

Aus diesem Grund sollte in dem beantragten Projekt nach viralen Determinanten einer IFN- α Resistenz gesucht und diese im Detail mit molekular- und zellbiologischen Methoden analysiert werden. Das Hauptwerkzeug hierfür waren subgenomische und genomische HCV-Replikons, die sich autonom in der humanen Leberzelllinie Huh-7 replizieren und die in hohem Maße IFN- α sensitiv sind. Durch gezielte Selektionsansätze und unter Zuhilfenahme transienter Replikationssysteme in Verbindung mit ortsspezifischer Mutagenese sollten solche Determinanten bestimmt und charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war die Etablierung von neuer HCV-Replikons, ausgehend von Virusisolaten aus Patienten mit genau untersuchter IFN- α Sensitivität oder –Resistenz sowie von Replikons, die nicht von Genotyp 1 abgeleitet sind. Schließlich sollte die Bedeutung von NS5A und PKR für die IFN- α Resistenz untersucht werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Voraussetzungen für die erfolgreiche Realisierung des Projekts waren sehr günstig. Alle erforderlichen HCV-Replikationssysteme sowie die notwendige Expertise waren vorhanden. Einschränkend ist lediglich zu vermerken, dass die Durchführung der Arbeiten in den ersten Monaten der Förderperiode dadurch limitiert war, dass der Antragsteller an die Universität Heidelberg berufen wurde und zunächst die neue Abteilung ‚Molekulare Virologie‘ aufbauen musste. Diese Aufbauarbeit war jedoch im Sommer 2002 weitgehend abgeschlossen, so dass die Arbeiten zu diesem Projekt zügig aufgenommen werden konnten.

Zu Beginn der Arbeiten war über virale Determinanten der IFN- α Resistenz nur sehr wenig bekannt. Auf Grund des enormen Therapiebedarfs sowie der Limitationen der aktuell verfügbaren Kombinationstherapie war und ist eine genaue Kenntnis möglicher Faktoren der Therapieresistenz absolut essentiell. Deren Kenntnis eröffnet neue Perspektiven zur Verbesserung der Ansprechraten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde gem. dem im Antrag beschriebenen Arbeitsplan durchgeführt, wobei drei komplementäre Versuchsansätze verfolgt wurden. Der erste beruhte auf der Herstellung IFN- α resistenter Replikons mit Hilfe einer IFN- α /G418 Doppelselektion. Replikons in den so erhaltenen doppelt-resistenten Zellklonen wurden mit Hilfe der long-distance RT-PCR amplifiziert, kloniert und die Nukleotidsequenz bestimmt. Auf diese Weise konnten Mutationen gefunden werden, die innerhalb einer Replikonpopulation eines selektionierten Zellklons konserviert waren. Sie sollten in transienten Replikationstests hinsichtlich ihrer

möglichen IFN-a Resistenz untersucht werden. Parallel dazu wurden die mittels Doppelselektion erhaltenen Replikons in naive Huh-7 Zellen re-transfiziert und nur mit G418 in Abwesenheit von INF-a selektioniert. Auf diese Weise sollte eine zell-vermittelte IFN-a Resistenz umgangen werden. Die Replikons in diesen Zellklonen sollten hinsichtlich ihrer IFN-a Sensitivität untersucht werden.

Der zweite Versuchsansatz zielte auf die Etablierung von Nicht-Genotyp 1b Replikons ab. Bis vor kurzem konnten nur Replikons in Zellkulturen vermehrt werden, die von Genotyp 1b-Viren abgeleitet waren. In quasi allen Fällen war jedoch die in vivo IFN-a Sensitivität der jeweiligen Ausgangsviren nicht bekannt, so dass eine Korrelation der Zellkulturbefunde mit der in vivo Situation nicht möglich war. Deshalb sollten Replikons von solchen HCV-Isolaten und –Genotypen hergestellt werden, die aus Proben von Patienten mit einer genau beschriebenen Krankheits- und Therapiegeschichte stammen.

Im dritten Versuchsansatz beschäftigten wir uns mit der Frage, welche Rolle die ISDR in NS5A und die mögliche Interaktion mit PKR hinsichtlich der IFN-a Resistenz hat. Diese Frage sollte mit Hilfe einer Mutationsanalyse sowie RNAi-vermitteltem knock-down der PKR-Expression untersucht werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Mehrere klinische Studien weisen darauf hin, dass der Erfolg einer Therapie mit Ifn-a und Ribavirin wesentlich vom HCV-Genotyp, mit dem ein Patient infiziert ist, bestimmt wird. Des weiteren wurde in einigen Untersuchungen eine Korrelation zwischen dem Therapieerfolg und einer spezifischen Sequenz im NS5A, der sogenannten 'interferon sensitivity determining region' (ISDR) gefunden. Damit in Übereinstimmung steht die Beobachtung, daß NS5A mit der Proteinkinase PKR, einem der zellulären Haupteffektoren der INF-a-vermittelten Translationshemmung interagiert und deren Aktivität blockiert. Die PKR-NS5A Interaktionsdomäne überlappt mit der ISDR und Mutationen in dieser Region, die in erfolgreich therapierten Patienten zu finden sind ('responder') können zu einem Verlust der Interaktion zumindest in vitro führen. Diese Daten weisen zwar übereinstimmend auf eine zentrale Rolle von NS5A als Hauptdeterminante für die Ifn-a Resistenz hin, es gibt jedoch zahlreiche klinische Studien, in denen keine Korrelation zwischen der ISDR und dem Therapieerfolg gefunden wurde. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass HCV scheinbar auch auf einem NS5A-unabhängigen Weg die Ifn-a Antwort hemmen kann. Das Hauptwerkzeug für alle drei Teilprojekte war das HCV-Replikonsystem, das inzwischen zum ‚Goldstandard‘ in der HCV-Forschung wurde. Dieses System wurde in unserem Labor entwickelt und war deshalb sehr gut etabliert. Darüber hinaus wurden während der Laufzeit dieses Projekts zahlreiche Verbesserungen erzielt, die für die Durchführung der Arbeiten von sehr großem Nutzen waren. Dazu zählen genomische Replikons (selektionierbare HCV-Genome) sowie selektionierbare Replikons mit einem Reporter-gen. Letztere wurden auch eingesetzt, um die Menge an biologisch aktivem IFN-a in Seren von chronischen Hepatitis C Patienten unter Therapie zu bestimmen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Untersuchungen erforderten eine intensive Zusammenarbeit mit mehreren Arbeitsgruppen innerhalb und außerhalb des HepNet. Hier sind in erster Linie zu nennen die Arbeitsgruppen von Prof. Zeuzem (Herstellung von Replikons, die nicht dem Genotyp 1 entsprechen), Prof. Roggendorf und Dr. Viazov (Rolle von NS5A für die IFN-a Resistenz und Identifikation von IFN-a induzierten Effektorgenen), Dr. Berg (Faktoren der IFN-a Resistenz in Patienten), Prof. Trautwein (HBV-HCV Ko-infektion) aus dem HepNet. Darüber hinaus wurden Kooperationen mit Arbeitsgruppen ausserhalb des HepNet etabliert, insbesondere mit Dr. Buchholz vom MPI in Dresden, Dr. Negro von der Universität in Genf, Dr. Bukh vom NIH in Bethesda/USA, Dr. Schalm/Dr. J.

Vrolijk von der Erasmus Universität in Rotterdam und Dr. Wakita von der Universität in Tokyo.

II. Ergebnis und Verwertung

1. Erzielte Ergebnisse

Mit dem Ziel der Identifikation viraler Determinanten der IFN- α Resistenz sowie der Rolle von NS5A und PKR bei der IFN- α vermittelten Hemmung der HCV Replikation wurden drei experimentelle Strategien verfolgt. Die erste bestand in der Herstellung IFN- α resistenter HCV-Replikons mit Hilfe eines Selektionsansatzes. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Ansätze eines Zellklons, in dem eine HCV-RNA mit hoher Effizienz stabil replizierte, einer Doppelsektion mit G418 und IFN- α unterzogen. Dabei wurden Parallelansätze angelegt, bei denen die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von G418 und IFN- α entweder dauerhaft, d.h. während der gesamten Zellpassagen, oder mit Kurzzeitpulsen (0,5 – 2 Tage) behandelt wurden. Nach ca. 3 Monaten Kultivierung entstanden einzelne Zellklone, von denen insgesamt 18 passagiert und expandiert werden konnten. Bestimmungen der IC₅₀ zeigten, dass bei den meisten so erhaltenen Zellklonen die HCV-RNAs weniger sensitiv auf IFN- α ansprachen. Um zu unterscheiden, ob diese scheinbare Resistenz auf Änderungen der Wirtszelle oder auf Mutationen in der viralen Replikonsequenz zurückzuführen ist, wurde die Gesamt-RNA aus den jeweiligen Zellklonen isoliert und mittels Transfektion in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Nach einer Selektion mit G418 (ohne IFN- α) konnten nach mehreren Monaten wiederum einzelne Zellklone hergestellt werden. Die Bestimmung der IC₅₀ zeigte, dass von den insgesamt 12 Zellklonen nur bei einem (IFN-6) eine deutliche Reduktion der IFN- α Sensitivität zu erkennen war (ca. 25 U/ml vs. 1 – 2,5 U/ml bei ‚naiven‘ Replikonzellen). Dieses Ergebnis belegte, dass entweder die IFN- α vermittelnden Mutationen einen deutlichen Nachteil für die Replikons hatten und deshalb während der Zellpassage der Replikons revertierten oder aber, dass die vermeintliche Resistenz auf Änderungen der Wirtszelle (z.B. verringerte Expression des IFN- α Rezeptors) zurückzuführen war. Um mögliche, resistenz-vermittelnde Mutationen im Replikon des Zellklons IFN-6 zu identifizieren, wurde die virale RNA mittels RT-PCR amplifiziert und die Nukleotidsequenz bestimmt. Auf Grund der Vielzahl der gefundenen Mutationen konnten diese jedoch keinem spezifischen Phänotyp zugeordnet werden. Deshalb wurde die HCV-kodierende Region in das Ausgangsreplikon inseriert und hinsichtlich RNA-Replikation und IFN- α Sensitivität in einem transienten Replikationstest untersucht. Allerdings war die Replikation so gering, dass keine eindeutigen Aussagen getroffen werden konnten. Aus diesem Grund wurde parallel ein analoges Replikon, das eine G418-Selektion erlaubt hergestellt. Die entsprechenden Zellklone befinden sich zur Zeit noch unter Selektion, so dass über den Phänotyp noch keine Aussage getroffen werden kann.

Der zweite Versuchsansatz zielte auf die Etablierung von HCV-Replikons ab, die sich von erwiesenermaßen IFN- α sensitiven bzw. IFN- α resistenten HCV-Isolaten ableiten. In enger Kooperation mit Dr. Sarrazin aus dem HepNet wurden mehrere Replikons hergestellt, in die die kodierende Region von NS3 bis NS5B von HCV-Konsensusgenomen des Genotyps 3 inseriert wurden. Trotz zahlreicher Bemühungen war es jedoch nicht möglich, diese RNAs in Huh-7 Zellen zu vermehren. Auch das Einführen unterschiedlichster Kombinationen hoch-adaptiver Mutationen in NS3, NS4B und NS5A führte nicht zum Erfolg. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Roggendorf und Dr. Viazov versucht, ein funktionales Replikon herzustellen, das sich vom HCV-Isolat AD-78 ableiten. Dieses Genotyp 1b-Isolat entspricht einem viralen Konsensusgenom, das aus einer Patientin isoliert wurde, die mit einem kontaminierten anti-D Immunglobulinpräparat infiziert wurde. Zwar gelang es mehrere chimäre Replikons herzustellen, die Teile des AD-78 Virus enthielten, es war jedoch nicht möglich, längere Sequenzen dieses Isolats in einer funktionalen Replikon-RNA zu kombinieren.

Erfolgreich verliefen die Arbeiten zur Herstellung eines Genotyp 1a Replikons. Durch Insertion zweier adaptiver Mutationen war es möglich, ein von H77 abgeleitetes

subgenomisches Replikon herzustellen. Allerdings war auch dieses in hohem Maße IFN- α sensitiv (IC₅₀ ca. 1 – 2,5 U/ml). Die Tatsache, dass dies bei mehreren Zellklonen der Fall war spricht gegen einen klonalen Effekt und weist darauf hin, dass auch das H77-Isolat in Zellkulturen IFN- α sensitiv ist.

Vor kurzem gelang es der Arbeitsgruppe von Dr. Wakita in Tokyo aus der Leber eines Patienten mit fulminanter Hepatitis ein HCV-Genom des Genotyp 2a zu isolieren, das mit hoher Effizienz und ohne Notwendigkeit für adaptive Mutationen in Huh-7 Zellen repliziert. In Kooperation mit Dr. Wakita haben wir subgenomische Replikons dieses Isolats, genannt JFH-1 hergestellt und hinsichtlich der IFN- α Sensitivität untersucht. Es zeigte sich, dass dieses Replikon eine mit Genotyp 1b und 1a Replikons vergleichbare IC₅₀ hatte. Darüber hinaus gelang es uns in Kooperation mit Dr. Wakita ein Zellkultursystem herzustellen, das die Produktion rekombinanter Hepatitis C Viren erlaubt. Diese sind infektiös für Huh-7 Zellen, wobei die Infektion mit Antikörpern gegen CD81 neutralisiert werden kann, was für einen spezifischen Aufnahmeprozess spricht. Dieser Befund wird durch die Beobachtung untermauert, dass Seren von chronisch infizierten Patienten die Infektion ebenfalls zumindest partiell neutralisieren. Mit Hilfe dieses neuen Zellkultursystems haben wir außerdem die Hemmwirkung von IFN- α untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch die Replikation des JFH1-Virus in hohem Maße durch IFN- α gehemmt wird.

Eine häufig gestellte Frage war, ob die in Huh-7 Zellen erhobenen Befunde ein zellspezifisches Phänomen darstellen oder generell zumindest für humane Leberzellen gelten. Die Beantwortung dieser Frage wurde dadurch erschwert, dass HCV Replikons bis vor kurzem nur in Huh-7 Zellen vermehrt werden konnten. Wir haben deshalb in einem breit angelegten screening zahlreiche Zelllinien hinsichtlich ihrer HCV-Permissivität untersucht. Dabei gelang es uns, HCV Replikons in der humanen Leberzelllinie HuH6 zu vermehren. Analog zu Replikon-Zellklonen von Huh-7 Zellen konnten wir beobachten, dass Genotyp 1b- und 2a-abgeleitete Replikons auch in dieser Zelllinie durch IFN- α mit einer IC₅₀ von ca. 2,5 U/ml gehemmt werden. Interessanterweise werden aber Replikons nur in Huh-7 Zellen durch IFN- γ gehemmt während dies in HuH6-Zellen nicht der Fall ist. Obwohl noch weitere Bestätigungstests notwendig sind würde dies die Möglichkeit eröffnen, mit Hilfe vergleichender Analysen gezielt nach den Effektoren zu suchen, die für die IFN- γ vermittelte Hemmung von HCV-Replikons verantwortlich sind.

Der dritte Versuchsansatz dieses Projekts beschäftigte sich mit der Frage, welche Rolle NS5A und PKR für die IFN- α Resistenz von HCV spielt. Wie eingangs beschrieben gibt es zu dieser Frage zahlreiche widersprüchliche Befunde, die nur teilweise mit den gewählten Versuchsansätzen bzw. untersuchten Patientenkollektiven erklärt werden können. Wir haben deshalb HCV-Replikons mit unterschiedlichen ISDR-Sequenzen hergestellt und die Auswirkungen dieser Mutationen auf die IFN- α Sensitivität untersucht. Allerdings war in keinem Fall eine signifikante Änderung der EC₅₀ bzw. EC₉₀ festzustellen, was darauf hinweist, dass die ISDR im Replikonsystem keine Rolle spielt oder dass die IFN- α Resistenz im wesentlichen auf zelluläre Determinanten zurückzuführen ist.

Parallel zu diesen Untersuchungen haben wir mit Hilfe von RNAi-vermitteltem knock-down Huh-7 Zellklone hergestellt, in denen die Expression der PKR deutlich reduziert ist. Sollte PKR tatsächlich an der Hemmung von HCV beteiligt sein wäre zu erwarten, dass die HCV RNA-Replikation in diesen Zellen deutlich weniger sensitiv auf IFN- α reagiert als in Kontrollzellen mit hoher PKR-Expression. Die Ergebnisse belegen jedoch sehr deutlich, dass es zu keinem ‚rescue‘ der HCV-Replikation in diesen Zellen kommt, was gegen eine Rolle der PKR bei der IFN- α vermittelten Hemmung der HCV-Replikation spricht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit allen oben beschriebenen Versuchsansätzen keine Hinweise auf die Existenz von viralen Determinanten der IFN- α Resistenz gefunden werden konnten.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit

Trotz intensiver Bemühungen war es nicht möglich, eindeutige Virusdeterminanten der IFN- α Resistenz zu ermitteln. Es ist unklar, ob dies an dem gewählten Versuchssystem (Replikons)