

## ***Abschlussbericht Teilprojekt 10.1.4***

**Projekttitlel:** Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Immun- und Therapieantwort mit Fokus auf der Interaktion von Toll-ähnlichen Rezeptoren bei chronischer Hepatitis C

**Projektleiter:** Prof. Dr. med. Eckart. Schreier  
Robert Koch-Institut  
Nordufer 20  
13353 Berlin

**Telefon:** +49 (0) 30 / 18754-2379

**Fax:** +49 (0) 30 / 18754-2617

**E-Mail:** schreiere@rki.de

**Berichtszeitraum:** 01.02.2005 – 31.01.2007

In diesem Projekt wurde untersucht, inwieweit genetische Polymorphismen (single nuclear polymorphisms, SNPs) im Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion stehen bzw. den Ausgang der antiviralen Therapie bestimmen.

Erkenntnisse zu den Auswirkungen von genetischen Wirtsfaktoren bei Schlüsselproteinen der HCV-Infektion sollten zur Diagnose, Prognose und individuellen Therapie beitragen.

Neben den Co-Rezeptoren CD81 und SR-B1 wird dem LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptor (LDLR) eine essentielle Rolle beim Viruseintritt in die Zelle zugeschrieben. Da LDLR verschiedene regulative und immunmodulatorische Eigenschaften aufweist, stellt LDLR ein Schlüsselprotein der HCV-Infektion dar.

Aufgrund des Zusammenspiels verschiedener toll-like Rezeptoren (TLR) mit der HCV-Erkrankung und ihrer essentiellen Funktion in der angeborenen Immunantwort stellen TLR eine wichtige Komponente antiviraler Wirtsfaktoren dar.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Charakterisierung von genetischen Polymorphismen im HCV Co-Rezeptor LDLR und im Immunregulator TLR-7 gesetzt.

### **1. Voraussetzungen**

Grundlage der Untersuchungen waren aus Blutproben isolierte genomische DNAs eines gut charakterisierten Patientenkollektivs, die Rahmen von klinischen Studien von Prof. Dr. Dr. Berg an Universitätsklinikum der Charité gewonnen wurden (schriftliche Aufklärung und Einverständniserklärung lag vor), sowie Proben aus einem Kollektiv gesunder Freiwilliger. Das Kollektiv gesunder Probanden wurde von Frau Dr. Oh am Institut für Mikrobiologie aufgebaut und betreut.

Alle im Rahmen der klinischen Studien erhobenen relevanten klinischen Daten wurden in einem umfangreichen Datenbanksystem erfasst. An einer Erweiterung beider Kollektive wird auch über dieses Projekt hinaus stetig gearbeitet.

### **2. Planung und Ablauf**

Untersuchungen zu genetischen Wirtsfaktoren wurde auf verschiedenen Ebenen durchgeführt. Zunächst wurden PCR-Systeme etabliert, um in den entsprechenden Patientenkollektiven das Auftreten der Polymorphismen im LDLR bzw. TLR darzustellen. Neben der Analyse bekannter Polymorphismen wurde durch Sequenzierung ebenso nach neuen Polymorphismen gesucht. Zur Identifizierung relevanter Polymorphismen wurden Datenbanken mit klinischen und genetischen Daten erstellt. Anhand statistischer Analysen wurden Polymorphismen im LDLR und TLR-7 gefunden, die im Zusammenhang mit Infektion und Therapie stehen. Somit wurde der Fokus weiterer Untersuchungen insbesondere auf diese Gene gelegt. LDLR wurde bezüglich Exon-8 (1171-G/A), Exon-10 (1506-G/A, rs5930) und 3'UTR (2728-G/A, rs14158) genotypisiert. Für TLR-7 wurden insgesamt 5 verschiedene SNPs identifiziert. Eine Variante (c.1-120T>G) wurde gehäuft bei männlichen Patienten mit wenig bis keiner Fibrose oder Entzündungserscheinungen gefunden. Weiterer Fokus wurde auf die funktionale Charakterisierung dieses Polymorphismus' gelegt.

Es wurden Reportersysteme etabliert, um den Einfluss von Polymorphismen auf die Zytokinantwort zu charakterisieren. Dazu wurden PBMCs von gesunden Probanden mit isogenischem TLR-7 bzw. TLR-8 isoliert und mit entsprechenden Agonisten stimuliert. Für TLR-7 kamen die Nukleosidanaloga Imiquimod und Isatoribin zum Einsatz, für TLR-8 wurde vorwiegend Resiquimod verwendet. Als read-out Systeme kamen vorwiegend TNF-alpha, IL-6 und IL-10 zum Einsatz.

### **3. Wissenschaftlicher Hintergrund**

In den letzten Jahren wurde zunehmend der Einfluss von Veränderungen im menschlichen Erbgut auf Entstehung und Ausprägung von Erkrankungen erkannt [21]. So gelang es, Gene und Mutationen zu identifizieren, die zur Entstehung bestimmter familiärer Lebererkrankungen führen. Es finden sich zunehmend Hinweise, dass auch bei primär nicht

genetisch bedingten Lebererkrankungen (viral, autoimmun, metabolisch, toxisch, maligne) die genetische Disposition eines Individuums eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung, Ausprägung und Therapieansprechen hat.

Der klinische Verlauf einer Hepatitis C-Infektion wird maßgeblich durch die Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts bestimmt. Genetische Faktoren, die die Immunantwort bei HCV beeinflussen, wurden für IL-10, IL-12B, RANTES, MxA und CTLA4 beschrieben.

Das TLR-System ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität. Werden dem TLR-System bestimmte konservierte Erregermuster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan (PG) oder Nukleinsäure (dsRNA, ssRNA, nicht-methylierte CpG DNA) präsentiert, kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Signal-Transduktions-Kaskaden. Hierdurch werden Mediatoren des angeborenen Immunsystems induziert, vornehmlich inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interferon, TNF-alpha und Interleukin. TLRs sind vorwiegend extrazelluläre Membranproteine, nur die erst kürzlich entdeckten und eng verwandten TLR-7 und TLR-8 sind ausschließlich intrazellulär im Endosom lokalisiert [5, 9, 13]. Insbesondere TLR-7 und TLR-8 liegen hintereinander auf dem X-Chromosom und erkennen beide einzelsträngige Nukleinsäuren. Allen TLRs gemein ist die Signalling-vermittelnde Toll-IL-1-Rezeptor Domäne (TIR) und eine Leuzin-reiche Wiederholungs- Domäne (leucine-rich repeat - LRR). Werden dem TLR-System bestimmte PAMPs präsentiert, kommt es zur Signaltransduktion.

Die Analyse von TLR Nukleotidpolymorphismen hat gezeigt, dass ihnen eine Schlüsselrolle im Verlauf von verschiedenen Infektions- und entzündlichen Erkrankungen zukommt [7, 11, 14, 17].

Im Zusammenhang mit HCV wurden zunächst zwei Interaktionen mit dem TLR-System beschrieben [2, 6]. Duesberg und Kollegen haben synthetische Lipopeptide aus T-Zell-Epitopen des Capsid-Proteins (Core) zur Stimulation von TLR-2 und -4 eingesetzt und konnten zeigen, dass die synthetischen Core-Epitope (lipified, not free-peptide) TLR-2 in 293 und TLR-4 in Ba/F3 Zellen den NF $\kappa$ B-Luc Reporter induzieren. Breiman und Kollegen konnten zeigen, dass die NS3/4A vermittelte Inhibition der IRF-3 Phosphorylierung und die damit verbundene Inhibition der Typ-I IFN-Induktion oberhalb der IKK $\alpha$  und TBK-1 liegt. NS3/4A inhibiert Typ-I IFN-Induktion sowohl über die TLR-3, -4, -7/8 und -9, als auch TLR unabhängig über RIG-1. RIG-1 ist eine Helicase mit so genannten Caspase Recruitment Domänen (CARDs). RIG interagiert mit Virus und legt die „versteckten“ CARDs frei und induziert damit Typ-I Interferon. Überexpression von IKK $\alpha$  konnte Typ-I IFN widerherstellen, überexpression von RIG-1 nicht.

Ein direkter therapeutischer Nutzen für die HCV-Therapie konnte kürzlich für den TLR-7 Agonisten Isatoribin gezeigt werden [10]. Des Weiteren zeigen verschiedene aktuelle Untersuchungen, dass TLR bei chronischen Hepatitis Patienten differentiell exprimiert werden [8, 12]. Taylor und Kollegen haben gezeigt, dass TLR-7 bei therapieresistenten Patienten (non-responder, NR) herunterreguliert ist [22].

Immer mehr Daten zur Virus-Wirts Interaktion, insbesondere der Rezeptorbindung, ermöglichen eine gezielte Suche nach Polymorphismen, die signifikant auf Infektion bzw. Therapie wirken. Der Eintritt von HCV in die Wirtszelle benötigt verschiedene Co-Rezeptoren, insbesondere CD81 und SR-B1 [1, 4, 18, 19, 24]. Da HCV-RNA Level mit LDLR-Expression korrelieren [3, 15], das virale Hüllprotein E2 direkt mit LDLR und HCV-Partikel mit Lipoproteinen interagieren [23], stellt LDLR einen wichtigen Wirtsfaktor und damit ein putatives Ziel von Therapeutischen Ansätzen dar.

#### **4. Zusammenarbeit**

Dr. Djin-Ye Oh – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene Campus Charité Mitte

Prof. Dr. Ralf Schumann – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene Campus Charité Mitte

Prof. Dr. Thomas Berg – Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Universitätsklinikum Charité, Berlin

## II Ergebnisse

### 1. Erzielte Ergebnisse

Im Rahmen von therapeutischen Studien wurden von unserem HepNet Kooperationspartner Prof. Dr. Berg DNA von HCV-Patienten asserviert und klinische Daten in einer Datenbank zusammengefasst. Mittels Real-Time PCR wurden Polymorphismen im LDLR im Exon 8, Exon 10 und in der 3'UTR bei 1350 Individuen untersucht. Dies beinhaltete 174 Individuen mit spontaner Ausheilung, 660 chronische Patienten und 516 gesunde Kontrollen, die Charakterisierung dieser Polymorphismen wurden am RKI durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu chronischen HCV1 Patienten und gesunden Kontrollen, eine selbst-limitierende HCV Genotyp-1 (HCV1) Infektion assoziiert ist mit einem Austausch G>A im Exon 8 und Heterozygotie von 1506-G im Exon 10. Interessanterweise hatten, in Bezug auf chronische HCV1 Infektion, homozygote Träger 2728-G Allels in der 3'-UTR ein hoch signifikantes Risiko nicht auf Therapie anzusprechen (NR). Das galt insbesondere, wenn noch keine schwere Leberschädigung vorlag. Daher könnte das 3'-UTR Allel einen wichtigen therapeutischer Marker für virale NR darstellen.

Für die Untersuchungen zum TLR7-Polymorphismus wurde der Leserahmen und die Promotorregion bei 104 Individuen sequenziert. Hierbei wurden 5 Polymorphismen gefunden, 3 bekannte c.32A>T (rs 179008) 32%, c.1035G>A (rs 5743780) 2% und c.2403G>A (rs 864058) 8%, sowie zwei neue Polymorphismen c.1-346T>A, <1% und c.1-120T>G, 6%. Von den identifizierten Polymorphismen war einer nicht synonym und drei hatten eine Frequenz über 5%. Mittels Schmelzkurven Analysen wurden insgesamt 807 HCV Patienten auf die Polymorphismen c.1-120T>G, c.32A>T und c.2403G>A untersucht, diese Daten wurden an der Charité in der Gruppe von Prof. Dr. Berg durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere der neu entdeckte Polymorphismus c.1-120T>G im TLR7-Promotorbereich bei Männer vor Fibrose und Entzündung schützt [20].

Um weiteren Aufschluss über die Relevanz des Austausches c.1-120T>G auf TLR7 zu erhalten wurden funktionale Assays etabliert, um den Einfluss des nicht-codierenden SNPs auf die antivirale Zytokinantwort zu zeigen. Hierzu wurde zunächst in einem Kollektiv von 98 gesunden Probanden das Auftreten von c.1-120T>G bestimmt, dabei wurden 2 hemizygoten Männer und 9 heterozygote Frauen identifiziert. Beide hemizygoten Männer waren Wildtyp für die anderen TLR-7 und TLR-8 Polymorphismen. Zur Untersuchung der funktionalen Relevanz des c.1-120T>G SNPs, wurden PBMCs von beiden gesunden männlichen Probanden isoliert und mit den TLR-7 spezifischen Liganden Imiquimod und Isatoribin, sowie einem TLR-4 spezifischen Liganden (LPS) stimuliert. Nach Stimulation von TLR-7 mit Imiquimod und Isatoribin wurde eine erhöhte IL-6 Ausschüttung bei den hemizygoten G-Allelträgern beobachtet, wobei nach LPS-Stimulation keine Unterschiede beobachtet wurden. Daher wird angenommen, dass der Effekt des TLR-7 SNP c.1-120T>G in Verbindung mit höherer IL-6 Ausschüttung bei hemizygoten Männern mit einem Schutz vor Fibrose und Entzündung assoziiert ist.

### 2. Verwertbarkeit

Aufgrund der Relevanz der LDLR Polymorphismen, insbesondere der 3'-UTR, auf das Therapieansprechen bei HCV1-Infektion eignen sich diese Polymorphismen als genetische Marker für Therapieansprechen. Da gezeigt wurde, dass intrazelluläre HCV-RNA Titer mit dem Expressionlevel des LDLR assoziiert sind [15], birgt die Regulation von LDLR die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte.

Diese Untersuchungen unterstreichen den Einfluss von genetischen Wirtsfaktoren auf das angeborene Immunsystem. Verschiedene Daten zeigen einen Einfluss von TLR-7 auf die

HCV-Erkrankung und Therapie. Die Stimulation von TLR-7 führte zu einer direkten Reduktion von HCV-RNA im Serum, was in direktem Zusammenhang mit einer IFN-alpha Response gezeigt wurde [10]. Dennoch wurde kürzlich ein IFN-alpha unabhängiger Weg der antiviralen Immunantwort gegen HCV gezeigt [12]. Diese Daten unterstützen, dass es neben der IFN-Antwort andere relevante Strategien zur Bekämpfung von HCV gibt und die Ausschüttung von IL-6 nach TLR-7 Stimulation einen signifikanten Einfluss auf Fibrose und Entzündung der Leber hat.

### **Eigene Veröffentlichungen**

Tobias Mueller, Andreas Mas-Marques, Christoph Sarrazin, Manfred Wiese, Juliane Halang, Heiko Witt, Golo Ahlenstiel, Ulrich Spengler, Uwe Gobel, Bertram Wiedenmann, Eckart Schreier, Thomas Berg  
J.of Hepatology 41, 652-658 (2004)

Schott E, Witt H, Neumann K, *Taube S*, Oh D-Y, *Schreier E*, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halang J, Weich V, Wiedenmann B, Berg T (2007) A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. J. Hepatology , 47, 208-211, (2007)

Andreas Mas Marques, Tobias Mueller, Justus Welke, Stefan Taube, Christoph Sarrazin, Manfred Wiese, Juliane Halang, Heiko Witt, Golo Ahlenstiel, Ulrich Spengler, Uwe Goebel, Eckart Schott, Viola Weich, Hermann E. Wasmuth, Frank Lammert, Thomas Berg, Eckart Schreier

*Low density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection, J. of Hepatology, submitted*

Oh D.-Y., *Taube S.*, Kücherer C., Neumann K., Jessen H., Eckert J.K., Oh N., *Schreier E.*, Hamann L., Pruss A., Poggensee G., Hamouda O., and Schumann R.R. *A Frequent Functional Toll-like Receptor 8 Variant is Associated with Restriction of HIV Disease Progression*, PNAS, submitted

*Taube S.*, Mas Marques A., Berg T., *Schreier E.* The Hepatitis C Virus NS5A Protein Inhibits Interferon Induced Signalling Independent of the ISDR, in preparation

Insgesamt konnten die Untersuchungen zu genetischen Wirtsfaktoren bei viraler Hepatitis erfolgreich abgeschlossen werden. Die genetischen Datenbanken stehen für andere Fragestellungen zur Verfügung und werden weiter betreut.

### **III Literatur**

1. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A, Cosset FL (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. J Biol Chem 278: 41624-30
2. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF (2005) Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. J Virol 79: 3969-78
3. Carriere M, Rosenberg AR, Conti F, Chouzenoux S, Terris B, Sogni P, Soubrane O, Calmus Y, Podevin P (2006) Low density lipoprotein receptor transcripts correlates with liver hepatitis C virus RNA in patients with alcohol consumption. J Viral Hepat 13: 633-42

4. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7270-4
5. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-31
6. Duesberg U, von dem Bussche A, Kirschning C, Miyake K, Sauerbruch T, Spengler U (2002) Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol Lett* 84: 89-95
7. Hamann L, Glaeser C, Hamprecht A, Gross M, Gomma A, Schumann RR (2006) Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 364: 303-7
8. He Q, Graham CS, Mangoni ED, Koziel MJ (2006) Differential expression of toll-like receptor mRNA in treatment non-responders and sustained virologic responders at baseline in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int* 26: 1100-10
9. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-9
10. Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, Steffy KR, Bauman LA, Kerr BM, Averett DR (2005) Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 42: 724-31
11. Karoly E, Fekete A, Banki NF, Szebeni B, Vannay A, Szabo AJ, Tulassay T, Reusz GS (2007) Heat shock protein 72 (HSPA1B) Gene Polymorphism and toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res* 61: 371-4
12. Lee J, Wu CC, Lee KJ, Chuang TH, Katakura K, Liu YT, Chan M, Tawatao R, Chung M, Shen C, Cottam HB, Lai MM, Raz E, Carson DA (2006) Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1828-33
13. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5598-603
14. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schroder NW, Bienzle U, Schumann RR (2006) Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 177-82
15. Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, Barbaras R, Graber P, Ghera P, Smolarsky M, Funaro A, Malavasi F, Larrey D, Coste J, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P (2007) The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 46: 411-9
16. Mueller T, Mas-Marques A, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, Spengler U, Goebel U, Wiedenmann B, Schreier E, Berg T (2004) Influence of interleukin 12B (IL12B) polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 41: 652-8
17. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, Maggi FM, Catapano AL (2005) Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med* 258: 21-7
18. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-41
19. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21: 5017-25
20. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh D-Y, Schreier E, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halangk J, Weich V, Wiedenmann B, Berg T (in press) A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J. Hepatol*

21. Simmonds P (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J Gen Virol* 85: 3173-88
22. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L, Schaley J, Sanda C, Stephens MJ, McClintick JN, Edenberg HJ, Li L, Tavis JE, Howell C, Belle SH (2007) Changes in gene expression during peginterferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C distinguish responders from non responders to antiviral therapy. *J Virol*
23. Thomssen R, Bonk S, Thiele A (1993) Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182: 329-34
24. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice CM, McKeating JA (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* 78: 1448-55