

Abschlussbericht Teilprojekt 13.4

Projekttitlel: Virus- und wirtsspezifische Komponenten in der Interferon-induzierten Inhibition des Hepatitis C Virus Replikation

Projektleiter: Prof. Dr. med. Ralf Bartenschlager, Dr. Michael Frese
Universität Heidelberg, Hygiene-Institut, INF345, 1. OG
Abt. Molekulare Virologie, Otto-Meyerhof-Zentrum
Im Neuenheimer Feld 672
69120 Heidelberg

Telefon: +49 (0) 6221 / 564-569

Fax: +49 (0) 6221 / 564-570

E-Mail: Ralf_Bartenschlager@med.uni-heidelberg.de

Berichtszeitraum: 01.02.2005 – 31.01.2007

I. Aufgabenstellung und Vorhabensplanung

1. Aufgabenstellung

Arbeiten im Rahmen der 1. Förderperiode, die die Selektion und Charakterisierung von Interferon (IFN)-resistenten GT1b-Replikons zum Ziel hatten, wiesen darauf hin, dass es möglicherweise genotyp-spezifische Unterschiede hinsichtlich der IFN-Sensitivität auch in Zellkulturen gibt. So wurde von einer Arbeitsgruppe aus Japan beschrieben, dass ein hoch-replikatives Isolat deutlich insensitiver gegenüber der antiviralen Wirkung von IFN ist als andere bis dato bekannte Genotyp (GT) 1 Isolate. Darauf aufbauend war ein Teilziel dieses Projekts die Identifikation viraler Determinanten der IFN-Resistenz. Das zweite Teilziel bestand darin, die zellulären Effektoren und Wirkmechanismen zu charakterisieren, die für die Hemmung der HCV-Replikation unter IFN verantwortlich sind. Dieses Teilprojekt, das sich aus einem HepNet Start-up Projekt entwickelte, basierte auf einer genomweiten Analyse von IFN-induzierten Effektorgenen und deren funktionaler Analyse mittels RNAi Technologie. Die so identifizierten Effektoren sollten dann im Detail analysiert werden. Fernziel war die mögliche Korrelation zwischen Therapieansprechen bei IFN-behandelten Patienten und genetischen Polymorphismen in diesen Effektorgenen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Ausgangsbedingungen für die erfolgreiche Bearbeitung beider Teilprojekte waren auf Grund der geleisteten Vorarbeiten sehr günstig, wenn auch der Ausgang bedingt durch die sehr widersprüchlichen Daten zur IFN-Resistenz von HCV ungewiss war. Die Vorarbeiten zur Selektion von IFN-resistenten Replikons waren im Rahmen der 1. Förderperiode abgeschlossen. Erste Ergebnisse aus der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Wakita wiesen außerdem darauf hin, dass das von ihm klonierte JFH-1 Isolat deutlich weniger IFN-sensitiv ist, als alle bis dato bekannten GT1 Isolate. Die Vorarbeiten zum Nachweis von IFN-induzierten Effektorgenen mittels micro-array Analysen waren ebenfalls abgeschlossen und es konnte eine Liste potentieller Kandidatengene erstellt werden. Schließlich war auch die Methode des effizienten knock-downs in Huh-7 Zellen etabliert worden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde analog dem im Antrag dargestellten Versuchsplan durchgeführt. Dieser sah zwei komplementäre Ansätze vor, bei denen entweder die viralen oder die zellulären Determinanten der IFN-Resistenz im Vordergrund standen. Ausgangspunkt des ersten Teilprojekts waren Replikons, die aus Zellen isoliert wurden, welche einer langwierigen IFN-Selektion unterzogen wurden. Die so erhaltenen Replikons enthielten zahlreiche Mutationen, die eine klonale Analyse unmöglich machten. Deshalb wurden die jeweils vollständigen HCV-kodierenden Regionen in Ausgangskonstrukte re-kloniert und zunächst in transienten Expressionsanalysen hinsichtlich ihrer Replikationskompetenz untersucht. Diese erwies sich jedoch als zu niedrig, so dass selektionierte Replikonzelllinien etabliert wurden zwecks Untersuchung auf IFN-Sensitivität. Parallel dazu wurde das Ansprechen auf IFN bei allen sonstigen Replikonsystemen untersucht. Dabei standen uns unterschiedliche GT1b-Varianten, ein GT1a sowie ein GT2a Replikon zur Verfügung.

Im zweiten Projektteil war vorgesehen, die zellulären Effektoren zu identifizieren, die für die IFN-induzierte Hemmung der HCV-Replikation verantwortlich sind. Wie im Versuchsplan beschrieben haben wir eine ‚Hitliste‘ möglicher Effektorgene etabliert und mittels systematischen knock-downs analysiert. Allerdings erwies sich die Etablierung dieses Suchtests als deutlich schwieriger und langwieriger als geplant, so dass das Projekt nicht abgeschlossen werden konnte. Die Arbeiten werden jedoch im Rahmen einer anderen Förderung weitergeführt und waren dafür richtungweisend.

Ausgehend von der Beobachtung einer amerikanischen Arbeitsgruppe, dass die HCV NS3-Protease eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Induktion der IFN-Antwort spielt (Foy et al., Science 2003), haben wir im Rahmen einer Kooperation mit den Arbeitsgruppen von J. Tschopp und D. Moradpour in Lausanne Untersuchungen zum Wirkmechanismus dieser

Hemmung durchgeführt. Dabei konnten sehr wichtige und neue Einsichten in das Wechselspiel zwischen HCV und der Induktion der IFN-Antwort gewonnen werden. Diese Ergebnisse gaben dem ersten Teilprojekt eine neue Richtung.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zahlreiche klinische Studien belegen epidemiologisch, dass Infektionen mit GT2 und GT3 deutlich besser auf die IFN-Therapie ansprechen als Infektionen insbesondere mit GT1. Diese Daten weisen auf virale Determinanten der IFN-Resistenz hin. Es war jedoch unklar, ob es solche Determinanten gibt und welche molekularen Mechanismen der IFN-Resistenz zu Grunde liegen. Wir hatten zu Beginn der Arbeiten Replikons der GT1a und 1b etabliert und gezeigt, dass diese zumindest unter transienten Bedingungen auf IFN ansprechen. Allerdings war unklar, wie die Ansprechrate eines GT2 oder GT3 Replikons unter diesen Bedingungen ist, d.h. es fehlte eine Referenz. In Kooperation mit Dr. Wakita von der Universität in Tokyo konnten wir zunächst ein subgenomisches Replikonsystem im Labor etablieren und später auch ein Infektionssystem (Wakita, Pietschmann et al., Nature Medicine, 2005). Dieses System sollte als Referenz dienen.

So unklar wie die Determinanten der IFN-Resistenz waren auch die Effektoren der IFN-induzierten Hemmung der HCV Replikation. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass HCV-Replikons in Huh-7 und anderen Zelllinien auf IFN ansprechen; es war jedoch nicht bekannt, welche molekularen Mechanismen der Hemmung zu Grunde lagen. Es existierten jedoch erste Berichte, bei denen mittels micro-array Analysen solche Gene identifiziert wurden, deren Expression unter der Kontrolle von Typ1 und Typ2-IFN steht. Auch wir hatten entsprechende micro-array Analysen begonnen, um eine Liste möglicher Effektorgene zu erstellen.

Im Laufe der Arbeiten an diesem Projekt wurden mehrere Studien veröffentlicht, in denen insbesondere die Proteinkinase PKR als IFN-induzierter Inhibitor der HCV Replikation beschrieben wurde. Diese Berichte waren und sind jedoch sehr widersprüchlich, ebenso die Rolle der ISDR in NS5A. Im Rahmen der 1. Förderperiode konnten wir dann auch zeigen, dass die PKR keine Rolle für die IFN-abhängige Hemmung der HCV-Replikation spielt. Schließlich wurden in vereinzelt Publikationen alternative Wege der Hemmung des IFN-Systems durch das HCV beschrieben, wie etwa die Blockage der Jak-Stat vermittelten Signaltransduktion, wobei ausschließlich Überexpressionssysteme eingesetzt wurden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Laufe dieses Projekts wurden zahlreiche zum Teil sehr intensive Kooperationen etabliert oder vertieft, die für den Erfolg der Arbeiten von ganz entscheidender Bedeutung waren. Hier sind ganz besonders die im HepNet organisierten Arbeitsgruppen von Prof. Roggendorf und Prof. Zeuzem aus dem HepNet zu nennen. Im Rahmen dieser Kooperationen wurden Replikons des AD78 Isolats etabliert und zahlreiche Versuche zur Etablierung von GT3 Replikons durchgeführt. Ganz wesentliche internationale Kooperationen wurden mit 2 Arbeitsgruppen aufgebaut. Zum einen mit Dr. Wakita an der Universität in Tokyo, wo es gelang, das erste Zellkultursystem zu etablieren, das die Produktion infektiöser HCV Partikel im Labor erlaubte. Zum anderen mit Dr. Moradpour und Dr. Tschopp, beide in Lausanne, wo wir erstmalig zeigen konnten, dass die HCV NS3-Protease durch proteolytische Spaltung eines essentiellen Signaltransduktors die Induktion von Typ1 IFN hemmt. Weitere Kooperationen außerhalb des HepNet Projekts wurden mit Dr. Negro von der Universität in Genf, Dr. Bukh vom NIH in Bethesda/USA (jetzt Kopenhagen) und Dr. Schalm von der Erasmus Universität in Rotterdam etabliert.

II. Ergebnis und Verwertung

1. Erzielte Ergebnisse

Ausgehend von einer Kollektion IFN-resistenter Replikonzellklone haben wir zunächst die darin enthaltenen HCV-RNAs rekloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei konnten jedoch keine Mutationen identifiziert werden, die eindeutig einer IFN-Resistenz

zuzuordnen waren. Die Replikationskompetenz dieser RNAs war in transienten Ansätzen nicht ausreichend hoch, so dass wir erneut selektionierbare Replikoklone etablieren mussten. Die anschließend durchgeführten IC50-Bestimmungen zeigten jedoch, dass diese HCV-RNAs keine IFN-Resistenz vermittelnden Mutationen enthielten. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass auch GT1a Replikons eine vergleichbare IFN-Sensitivität besitzen. Aufbauend auf den initialen Berichten aus dem Labor von Dr. Wakita haben wir parallel zu diesen Analysen untersucht, ob das hoch-replikative GT2a Isolat JFH-1 eine andere Ansprechrate auf IFN-alpha hat. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die IC50 deutlich höher ist, was allerdings auf die erhöhte Replikationskompetenz zurückzuführen war. In genauen Titrationsversuchen zeigte sich, dass die IC50 pro HCV RNA quasi identisch ist mit der IC50 anderer HCV-Isolate (GT1a und 1b). Dasselbe galt auch, wenn wir Huh-7 Zellen mit JFH-1 abgeleiteten Viren infizierten.

Um Effekte der verwendeten Zelllinie auszuschließen (bis dato wurden immer nur Huh-7 Zellen verwendet), haben wir Replikons in anderen Zelllinien etabliert (M. Windisch, 2007). Dazu gehörten HuH6, HepG2, WRL-68, Hela und murine Hepatozyten. In allen Systemen war die HCV-Replikation jedoch gleichermaßen hemmbar mit IFN-alpha, so dass wir auch von dieser Seite her keine Hinweise auf eine virale Determinante der IFN-Resistenz hatten.

Eine unerwartete Wendung in den geplanten Arbeiten ergab sich mit der Entschlüsselung der Signaltransduktionskaskade, die zur IFN-beta Synthese führt. Mittels in silico Analysen hat die Arbeitsgruppe von Dr. J. Tschopp an der Universität in Lausanne einen Proteinfaktor identifiziert, genannt Cardif, der das Aktivierungssignal von RIG-I, dem intrazellulären RNA-Sensor auf den Kinasekomplex überträgt, der für die Phosphorylierung von IRF-3 notwendig ist. Letzterer ist ein zytoplasmatischer und latenter Transkriptionsfaktor, der nach Phosphorylierung dimerisiert, in den Zellkern transportiert wird und dort u.a. die Synthese von IFN-beta induziert. Ausgehend von einem Bericht aus der Arbeitsgruppe von M. Gale, dass die NS3-Protease des HCV die Induktion der IFN-beta Synthese blockiert (Foy et al., Science, 2003), bestand die Vermutung, dass Cardif vielleicht das Angriffsziel für die NS3-Protease ist. Diese Vermutung konnten wir tatsächlich mit Hilfe des HCV-Infektionssystems bestätigen. So konnten wir zeigen, dass die NS3-Protease Cardif quasi quantitativ in infizierten Huh-7 Zellen an einer Konsensuschnittstelle für die Protease spaltet, was zu einer Ablösung von Cardif von der äußeren mitochondrialen Membran und einer völligen Blockade der Signaltransduktionskaskade führt. Dieses Ergebnis, das kurze Zeit nach unserer Erstveröffentlichung von anderen Gruppen bestätigt wurde, lieferte eine Erklärung für die molekularen Mechanismen die der HCV-vermittelten Hemmung der Induktion der IFN-Expression in der Frühphase der Infektion. Obwohl damit ein möglicher Mechanismus gefunden wurde, wie HCV hoch-effizient eine persistente Infektion etabliert, blieb unklar, warum das Virus so selten oder nur ungenügend auf die IFN-alpha Therapie anspricht.

Im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen zur Rolle von Cardif und dessen Spaltung durch die NS3-Protease für die IFN-Antwort sowie die Permissivität der Wirtszelle konnten wir zeigen, dass das Virus den RIG-I Signalweg sehr effizient kontrolliert. Ausgehend von der Beobachtung, dass ein spezieller Subklon von Huh-7, genannt Huh7.5 eine Punktmutation im RIG-I Gen trägt, die zu dessen Inaktivierung führt, haben wir mittels retroviraler Transduktion ein Reihe von Zelllinien hergestellt, in denen dieser Weg durch konstitutive Expression eines intakten RIG-I Allels wieder hergestellt wurde. Des Weiteren haben wir Zelllinien etabliert, die auch die NS3-Protease, konstitutiv aktives sowie nicht von der NS3-Protease spaltbares Cardif exprimieren. Mit Hilfe dieser Zelllinien konnten wir zeigen, dass die Wiederherstellung des RIG-I Systems die HCV-Replikation und Infektion nicht beeinträchtigt. In weiterführenden Experimenten haben wir dann eine Arbeitshypothese entwickelt, der zufolge das HCV die Induktion des IFN-Systems hemmt oder vermeidet. Erstens, die HCV-RNA ist ein sehr schwacher Induktor, d.h. nach der Infektion wird das freigesetzte RNA Genom nur schlecht von RIG-I erkannt. Zweitens, auf Grund der hoch-effizienten Translation des HCV-Genoms (ca. 5.000 Polyproteinmoleküle werden pro Genom exprimiert) kommt es zu einer schnellen Akkumulation der Protease und damit zu einem potenten Block des RIG-I Wegs. Drittens, das virale Polyprotein (insbesondere das NS4B) induziert einen speziellen Replikationskomplex im Zytoplasma der infizierten Zellen, bei dem die virale RNA vermutlich innerhalb von Membranvesikeln repliziert wird. Damit ist

insbesondere die virale Doppelstrang-RNA, ein potenter Induktor von RIG-I, diesem RNA-Sensor nicht zugänglich. Alle 3 Faktoren können in der Summe erklären, warum das Virus zumindest in der Frühphase der Infektion nicht von der angeborenen Immunantwort eliminiert wird. Es ist jedoch zu betonen, dass diese Effekte keinen oder nur einen geringen Einfluss auf den IFN-induzierten antiviralen Status haben.

Eine mögliche Erklärung, wie das HCV der IFN-Antwort entkommen könnte, ergab sich aus Versuchen, die wir am Ende der Förderphase dieses Projekts begonnen haben und die im Rahmen einer alternativen Förderung fortgesetzt werden sollen. Zu diesem Zweck haben wir ein Zellkultursystem entwickelt, das die Differenzierung von Huh-7 Zellen erlaubt. Diese differenzierten Zellen können mit HCV infiziert werden, haben jedoch einige wesentliche Vorteile gegenüber dem bisher verwendeten System. Erstens, die HCV-Replikation und Virusproduktion ist unabhängig vom Proliferationsstatus der Zelle, d.h. unabhängig von der Konfluenz. Zweitens, die Zellkulturen können über mehrere Wochen gehalten werden, ohne dass eine Zellpassage notwendig wird. Drittens, die differenzierten Zellen sprechen auf IFN an. In Pilotversuchen konnten wir zeigen, dass unter diesen Bedingungen die HCV-Replikation und -virusproduktion IFN-sensitiv ist, dass aber unter IFN die Virusreplikation lediglich reduziert, das Virus aber nicht völlig eliminiert wird. Die ersten Ergebnisse sind erstaunlich, da die Hemmungskurven in diesen Zellkulturen sehr denjenigen ähneln, die in Patienten beobachtet werden (eine initiale ca. 100-fache Hemmung der Virusreplikation mit anschließender Stagnation). Daraus lässt sich vermuten, dass das IFN-System per se vielleicht nicht in der Lage ist, hoch-replikative Isolate zu eliminieren und dass die IFN-Antwort möglicherweise in hohem Maße von der Fitness eines Virusisolats abhängt. Diese Fragen wollen wir im Rahmen einer anderen Förderung fortführen.

Im zweiten Teilprojekt haben wir die Frage untersucht, welche IFN-induzierten zellulären Effektoren für die Hemmung der HCV-Replikation verantwortlich sind. Ausgehend von einer Liste potentieller Effektorgene, die wir mittels vergleichender micro-array Analysen sowie aus publizierten Daten erstellt haben, mussten wir zunächst einen adäquaten Suchtest etablieren. Unter allen evaluierten Strategien erwies sich der gezielte knock-down mittels siRNA als der beste. Unter Ausnutzung hoch-sensitiver Reporter-gen-Replikons und durch serielle Behandlung der Zellen mittels siRNAs konnten wir ein Testformat etablieren, das die Bestimmung potentieller Effektorgene erlaubte. Hauptproblem dabei war jedoch die hohe Variabilität, die eine statistische Analyse extrem erschwerte. Nach langwieriger Optimierungsarbeit ist es dennoch gelungen, einen adäquaten Suchtest zu etablieren, der jedoch innerhalb des Förderzeitraums dieses Projekts nicht abgeschlossen werden konnte.

Parallel dazu haben wir untersucht, ob einige der offensichtlichen IFN-induzierten Effektoren für die Hemmung der HCV Replikation verantwortlich sind. Dabei haben wir uns auf MxA, PKR und ADAR konzentriert. Allerdings ergab sich trotz intensiver Analyse für keinen dieser Effektoren einen Hinweis auf eine Beteiligung an der IFN-induzierten Hemmung der HCV-Replikation. Vor kurzem wurde jedoch berichtet, dass diese Hemmung durch IFN-induzierte miRNAs vermittelt wird (Pedersen et al., Nature, 2007). Diese Befunde werfen ein völlig neues Licht auf den Wirkmechanismus von IFN und eröffnen neue Ansätze, diesen Aspekt zu untersuchen.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit

Im Rahmen dieses Projekts haben wir trotz intensiver Bemühungen keine Hinweise auf eine virus-kodierte IFN-Resistenz erhalten. Die neuen Ergebnisse, die im Rahmen dieses Projekts aus Zeitgründen jedoch nicht bearbeitet werden können, weisen allerdings darauf hin, dass IFN-Resistenz möglicherweise mit viraler Replikationskapazität korreliert (fitness). Das muss jedoch in weitergehenden Studien untersucht werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen deshalb leider keinen verwertbaren Nutzen erkennen.

3. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Wie weiter oben schon erwähnt wurde vor ca. 2 Wochen eine Arbeit veröffentlicht, in der die Hemmung der HCV-Replikation durch IFN-induzierte miRNAs beschrieben wird (Pedersen et al., 2007). Erstaunlich dabei ist, dass die Hemmung auf 2 unterschiedlichen, aber IFN-abhängigen Mechanismen beruht: Die Induktion von mindestens 5 antiviralen miRNAs und

die Repression der Expression von miRNA-122, die für die effiziente HCV-Replikation benötigt wird (Joplin et al., Science, 2005). Es ist bisher unverstanden, warum das menschliche Genom miRNAs kodiert, die explizit gegen das HCV gerichtet sind, obwohl dieses Virus als evolutionär sehr ‚jung‘ betrachtet wird. Weitere Untersuchungen müssen deshalb klären, ob es sich hierbei tatsächlich um HCV-selektive miRNAs handelt oder ob die Anzahl an IFN-induzierten miRNAs so hoch ist, dass einige davon quasi rein statistisch auch Komplementaritäten im Bereich der seed-Sequenz zum HCV-Genom haben.

4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Folgende Artikel wurden im Rahmen des HepNet-Projekts veröffentlicht:

Peer reviewed Journale

1. Windisch, M., M. Frese, A. Kaul, M. Trippler, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. 2005. Dissecting the Interferon-Induced Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by Using a Novel Host Cell Line. *Journal of Virology*, 79:13778-13793.
2. Soderholm J, G. Ahlen, A. Kaul, L. Frelin, M. Alheim, C. Barnfield, P. Liljestrom, O. Weiland, D. Milich, R. Bartenschlager, and M. Sallberg. 2005. Relation between viral fitness and immune escape within the hepatitis C virus protease. *Gut*, 55:266-274.
3. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager and J. Tschopp. 2005. Cardif is a novel adaptor protein in RIG-I-mediated antiviral responses targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437:1167-1172.
4. Binder, M., G. Kochs, R. Bartenschlager and V. Lohmann. 2007. Hepatitis C Virus Replication is Independent of IRF-3 due to Passive and Active Evasion of (from) RIG-I Signaling. *Hepatology*, im Druck.

Übersichtsartikel und Buchbeiträge

1. Bartenschlager, R. 2005. The hepatitis C virus replicon system: From subgenomic RNAs to infectious virus production. In: R. Schinazi (ed.), *Framing the knowledge of hepatitis viruses*, pp. 155-182.
2. Bartenschlager, R., and S. Sparacio. 2005. In vitro replication models of HCV. In: H. Thomas, A. Zuckermann, S. Lemon (eds.), *Viral Hepatitis*, 3rd edition, pp. 496-510.
3. McHutchison, J.G., Bartenschlager, R., Patel, K., Pawlotsky, J.M. 2006. The face of future hepatitis C antiviral drug development: Recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice. *Journal of Hepatology*, 44:411-421.
4. Bartenschlager, R., G. Long and D. Moradpour. 2008. Chronic Hepatitis C: Portrait of a Silent Epidemic and the Etiologic Agent. In: Protzer, U. and O. Weber (eds). *Birkhäuser*, im Druck.

Doktorarbeiten

Windisch, M. 2007. Etablierung und Charakterisierung von Hepatitis C Virus – Replikonzelllinien. Dissertation, Universität Heidelberg.