

Abschlussbericht Teilprojekt 15.3

Projekttitlel: Identifizierung von interferoninduzierten Effektorproteinen mit antiviraler Aktivität gegen das Hepatitis C Virus

Projektleiter: PD Dr. rer.nat. M. Frese
Universität Heidelberg
Abt. Molekulare Virologie, Otto-Meyerhof-Zentrum
Im Neuenheimer Feld 350
69120 Heidelberg

Telefon: +49(0) 6221-564834

Fax: +49(0) 6221-564570

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

Berichtszeitraum: 01.02.2002 – 31.12.2004

I. Aufgabenstellung und Vorhabensplanung

1. Aufgabenstellung:

Persistierende Infektionen mit dem Hepatitis C virus (HCV) führen häufig zu einer chronischen Hepatitis, die im Laufe der Zeit zu einer Leberzirrhose und einem hepatozellulärem Karzinom führen kann. Trotz des weitverbreiteten und zumindest teilweise sehr erfolgreichen Einsatzes von Interferon (IFN) als Therapeutikum in der Behandlung von Patienten mit chronischer Hepatitis C, ist bis heute nicht bekannt, auf welche Weise IFN die Replikation von HCV hemmt. Alle IFN-Typen induzieren die Expression zahlreicher Proteine, der sogenannten Effektorproteine. Einige dieser Proteine besitzen antivirale Aktivität. Ein Beispiel für ein derartiges Effektorprotein ist das humane MxA-Protein, eine GTPase, die sehr effizient die Replikation bestimmter RNA-Viren blockiert.

Das vorliegende Projekt sollte die Effektorproteine identifizieren, die an der IFN-induzierten Inhibition der HCV-Replikation beteiligt sind. Ausserdem sollten die intrazellulären Signalwege analysiert werden, mit denen die verschiedenen IFN-Typen die Expression der Effektorproteine steuern.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Die Voraussetzungen für die erfolgreiche Realisierung des Projekts waren sehr günstig. Die für das Projekt erforderlichen viralen Modellsysteme (HCV-Replikons und geeignete Wirtszellen) waren schon zu Beginn des Projektes vorhanden. Ausserdem bestanden bereits Kontakte zu verschiedenen externen Partnern, mit deren Hilfe wichtige Teilvorhaben des Projektes, z.B. die Transkriptomanalyse in interferonisierten Zellen und die Herstellung von small interfering RNAs (siRNAs) unverzüglich angegangen werden konnten.

Bisher sind nur wenige Effektorproteine daraufhin untersucht worden, ob sie die Replikation von HCV hemmen können. Zwar wird in einigen Publikationen der IFN-induzierten Proteinkinase PKR eine wichtige Funktion als Resistenzfaktor bei der Pathogenese und der Therapie einer chronischen Hepatitis C zugewiesen, aber diese Arbeiten sind sehr umstritten (zusammengefasst von He & Katze, 2002, *Viral. Immunol.* 15:95-119). Eigene, frühere Publikationen des Projektleiters zeigen darüber-hinaus, dass potente antivirale Effektorproteine wie MxA nicht an der IFN-

induzierten Inhibition der HCV-Replikation beteiligt sind (Frese et al. 2001, J. Gen. Virol. 82: 723-733; Frese et al., Hepatology 35: 694-703). Zu Beginn der Projektarbeiten waren also keine zellulären Resistenzfaktoren bekannt. Der Beseitigung dieser Wissenslücke kommt aufgrund des auch hierzulande enormen Therapiebedarfs eine grosse medizinische und ökonomische Bedeutung zu. Ein besseres Verständnis der zellulären und viralen Resistenzfaktoren könnte z. B. dabei helfen, den Ausgang der langwierigen, nebenwirkungs-reichen und kostspieligen IFN-Therapien vorauszusagen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens:

Das Projekt wurde gemäss dem im Antrag beschriebenen Arbeitsplan durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden Chiparrays eingesetzt, um das Transkriptom in interferonisierten Huh7-Zellen zu analysieren.



FIG. 1. Transkriptomanalyse zur Identifizierung potentieller IFN-induzierter Effektorgene.

Dazu wurden Zellen mit und ohne HCV-Replikons eingesetzt. Um klonale Effekte weitestgehend auszuschliessen, wurden in diesen Experimenten immer mehrere Zellklone parallel untersucht. Mit Hilfe der so gewonnenen Daten wurde in einem zweiten Schritt eine cDNA-Sammlung aus potentiellen Effektorgensequenzen zusammengestellt, in der nicht nur bekannte Effektorgene wie MxA, OAS und PKR vertreten sind, sondern auch Gene, die weniger gut oder bisher noch gar nicht charakterisiert wurden. Die Sammlung enthält ausserdem cDNAs von Genen mit einer wichtigen Funktion in den verschiedenen IFN-Signalwegen (z.B Gene von IFN-Rezeptoruntereinheiten, rezeptorassoziierte Kinasen oder latent exprimierte Transkriptionsfaktoren wie STAT1 und STAT2). Die cDNAs wurden im Rahmen eines Kooperationsvertrages vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin (RZPD) zu einem reduzierten Preis zur Verfügung gestellt. In einem dritten Schritt wurde diese cDNA-Sammlung benutzt, um mit Hilfe der Endoribonuklease III aus Escherichia coli sogenannte esiRNAs herzustellen (Fig. 2).

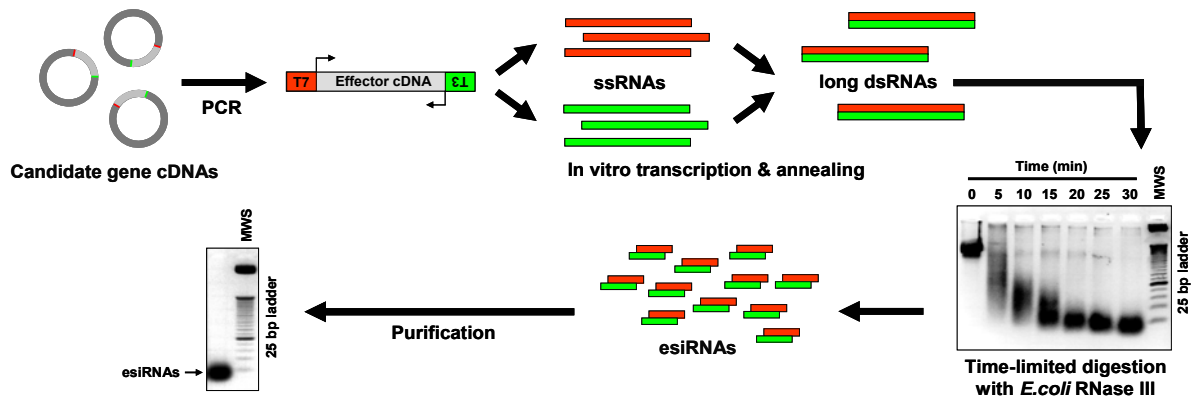


FIG. 2. Produktion von effektorspezifischen esiRNAs.

Die esiRNAs wurden zunächst, wie ursprünglich geplant, im Labor von Dr. F. Buchholz am Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik in Dresden hergestellt. Später wurde das gesamte technische Wissen nach Heidelberg transferiert, wo ab 2004 alle esiRNAs für dieses Projekt produziert wurden.

In einem vierten Schritt wurden die esiRNAs in Huh7-Zellen mit HCV-Replikons transfiziert, um gezielt die Expression einzelner Komponenten des IFN-Systems zu unterdrücken (gene silencing). Für diese Experimente wurde ein subgenomisches HCV-Replikon verwendet, das neben den für die HCV-Replikation notwendigen viralen Nichtstrukturproteinen und einem Selektionsmarker das Luciferase-gen des Leuchtkäfers *Photinus vulgaris* kodiert (Fig. 4). Mit Hilfe dieses Reportergens konnten die Auswirkungen der Interferonisierung und der esiRNA-Transfektionen auf die virale Replikation präzise quantifiziert werden (Fig. 4).

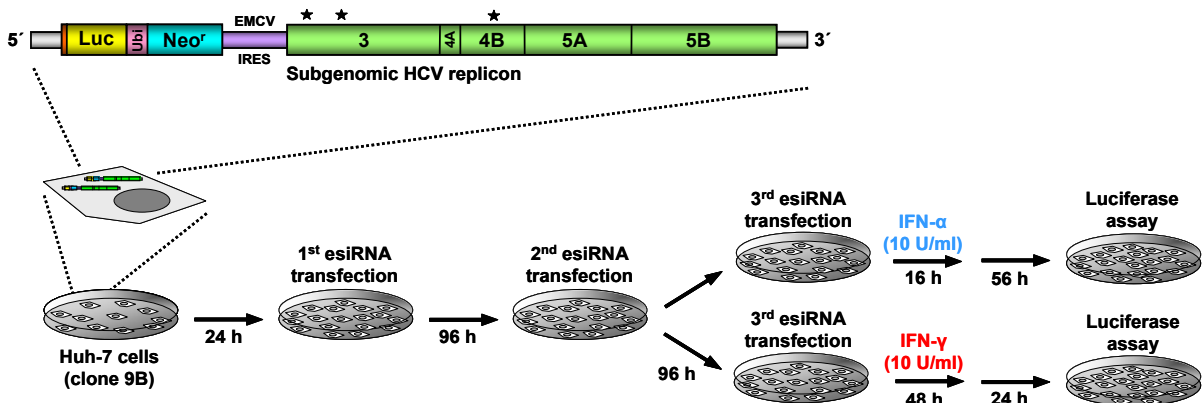


FIG. 4. Suchtest für Effektorgene mit antiviraler Aktivität gegen HCV.

In nicht transfizierten Kontrollzellen führte eine Behandlung mit 10 U/ml IFN-α bzw. IFN-γ zu einer starken Hemmung der HCV-Replikation und damit zu einem

Rückgang der Reporteraktivität um mehrere Zehnerpotenzen. Bei einem silencing von essentiellen Bestandteilen des IFN-Signalweges oder von beteiligten Effektorproteinen sollte sich so die HCV-Replikation in der Anwesenheit von IFN rekonstituieren lassen. Tatsächlich konnten wir nach der Transfektion von einigen esiRNAs eine solche Rekonstitution beobachten (siehe Teil II dieses Berichts).

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde:

Mehrere klinische Studien weisen darauf hin, dass der Erfolg einer Therapie mit IFN- α und Ribavirin stark vom Genotyp, mit dem ein Patient infiziert ist, bestimmt wird. So haben Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 wesentlich schlechtere Aussichten das Virus unter der Therapie zu eliminieren, als Patienten mit den Genotypen 2 oder 3. Allerdings gibt es auch bei den besten heute verfügbaren Therapien immer wieder Patienten, die selbst die relativ IFN-empfindlichen Genotypen 2 und 3 nicht eliminieren können. Eine mögliche Erklärung ist die Existenz von Wirtsfaktoren, die zusätzlich zu den viralen Resistenzfaktoren die Pathogenese und den Therapieerfolg einer Hepatitis C beeinflussen können. Allerdings konnten bis heute keine genetische Marker identifiziert werden, die es den behandelnden Ärzten erlauben würden, die Erfolgsaussichten einer IFN-Therapie in Patienten mit einer Hepatitis C zuverlässig vorherzusagen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Untersuchungen erforderten eine intensive Zusammen-arbeit mit mehreren Arbeitsgruppen innerhalb und ausserhalb des HepNet. Diese sind im Einzelnen die Arbeitsgruppen von Prof. M. Roggendorf und Prof. G. Gerken an der Universität Essen (Trans-kriptomanalysen) und die Arbeitsgruppe von Dr. F. Buchholz am Max-Planck-Institut für Zellbiologie und Genetik in Dresden (Herstellung von siRNAs).

II. Ergebnis und Verwertung

1. Erzielte Ergebnisse:

Mit vergleichenden Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass IFN- α in Huh7-Zellen die Expression von etwa 100 Genen um mindestens den Faktor zwei erhöht. Hinweise darauf, dass subgenomische oder genomische HCV-Replikons die intrazelluläre Wirkung von IFN- α merklich abschwächen oder gar aufheben können, wurden nicht entdeckt (Fig. 5). Die so gewonnenen Daten wurden dazu genutzt, eine Liste mit potenziellen Kandidatengenen zusammenzustellen, die möglicherweise an der IFN-induzierten Inhibition der HCV-Replikation beteiligt sind.

FIG. 5. Effekt von IFN- α auf das Transkriptom von Huh7-Zellen (der vollständige Datensatz wird auf Anfrage gerne zur Verfügung gestellt).

In einem wichtigen Pilotexperiment wurde untersucht, ob die Transfektion von esiRNAs die IFN-induzierte Expression von Effektorproteinen soweit unterdrücken kann, dass die Replikation von IFN-sensitiven Viren in interferonisierten Zellen ablaufen kann. Dieses Experiment wurde mit dem Thogoto virus (THOV) als Modelvirus durchgeführt. THOV ist ein durch Zecken übertragenes Orthomyxovirus, dessen Replikation in interferonisierten Zellen durch die Expression von MxA inhibiert wird (Frese et al. 1995, J. Virol. 69:3904-3909; Pavlovic et al. 1995, J. Virol. 69:4506-4510). MxA gehört zu den am stärksten exprimierten Effektorgenen. Eine zusammen mit Dr. M. Trippler an der Universität Essen durchgeführte Quantifizierung

der MxA-Expression mittels real-time PCR ergab, dass IFN- α die Zahl der MxA-Transkripte von etwa 50 Kopien auf bis zu 25.000 Kopien pro 100.000 Aktin-mRNAs ansteigen lässt. Trotzdem konnte die Expression von MxA mit Hilfe von esiRNAs fast vollständig blockiert und die Replikation von THOV rekonstituiert werden (Fig. 5).

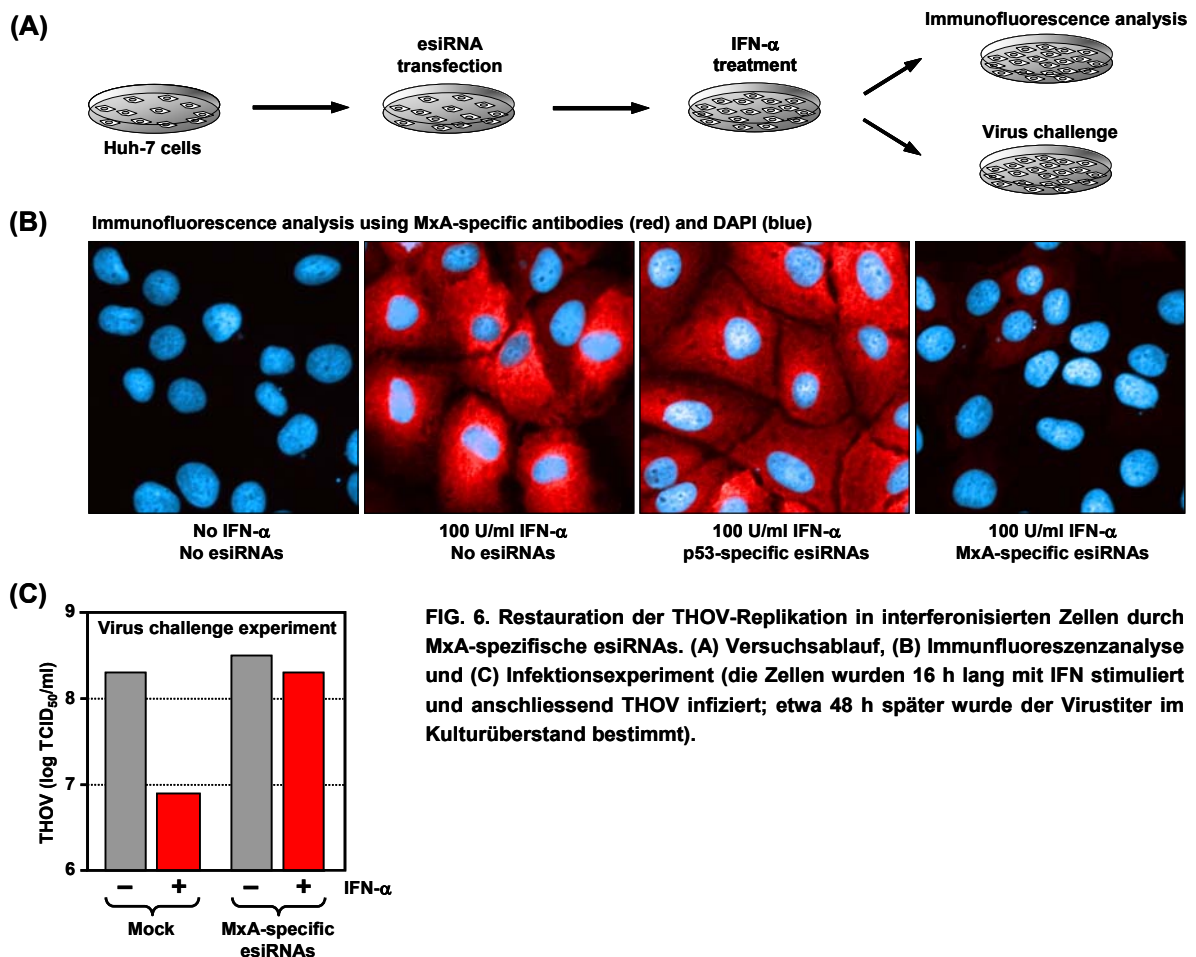


FIG. 6. Restauration der THOV-Replikation in interferonisierten Zellen durch MxA-spezifische esiRNAs. (A) Versuchsablauf, (B) Immunfluoreszenzanalyse und (C) Infektionsexperiment (die Zellen wurden 16 h lang mit IFN stimuliert und anschliessend THOV infiziert; etwa 48 h später wurde der Virustiter im Kulturüberstand bestimmt).

Für die Analyse der IFN-induzierten Hemmung der HCV-Replikation wurde ein Replikon mit einem Luziferasereporter gen eingesetzt (Fig. 4B). Wie erwartet, konnte die HCV-Replikation durch silencing von für die IFN-Signaltransduktion essentiellen Genen in Gegenwart von IFN- α und - γ rekonstituiert werden (Fig. 7A zeigt eine Übersicht über die Funktion der am signaling beteiligten Proteine). Die Ergebnisse zeigen, dass die durch esiRNAs erzielte Wirkung sehr spezifisch ist. So führt ein silencing der STAT2-Expression zwar zu einer Rekonstitution der viralen Replikation unter IFN- α aber nicht zur viralen Replikation unter IFN- γ . Umgekehrt führt ein silencing der IFN- γ -Rezeptorexpression zu viraler Replikation unter IFN- γ aber nicht unter IFN- α . Durch die Kombination verschiedener esiRNAs konnte die Effektivität der Rekonstitution sogar nochmals gesteigert werden (Fig. 7B). Interessanterweise

hatte die Transfektion von STAT1-spezifischen esiRNAs aber nur einen Effekt auf die antivirale Wirkung von IFN- γ . Dies ist unerwartet, weil dieser Transkriptionsfaktor eine bedeutende Funktion in der Signaltransduktion von beiden IFN-Typen hat (Fig. 7A). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die in der Literatur beschriebenen STAT1-unabhängige Signaltransduktionswege auch eine Rolle in der durch IFN- α induzierten Hemmung der HCV-Replikation spielen.

Mittels esiRNAs wurden bis heute etwa 40 verschiedene Effektorkandidaten im Hinblick auf ihre antivirale Aktivität getestet. Die Abbildung 7C und D zeigt das Ergebnis eines typischen Experiments. Das MxA-spezifische esiRNAs die HCV-Replikation nicht rekonstituieren konnten, war aufgrund früherer Experimente nicht überraschend (Frese et al. 2001, J. Gen. Virol. 82: 723-733). Wesentlich interessanter war dagegen die Analyse der PKR-Funktion. Wie eingangs beschrieben, gibt es in der Literatur widersprüchliche Berichte über eine Rolle von PKR als möglicher Resistenzfaktor (bei viralen Infektionen im Allgemeinen und bei der Hepatitis C im Besonderen). Die im Rahmen dieses Projektes (z.B. Fig. 7) sowie im TP13.2 durchgeführten Experimente zeigen dagegen übereinstimmend, dass PKR keine essentielle Funktion bei der IFN-induzierten Hemmung der HCV-Replikation hat.

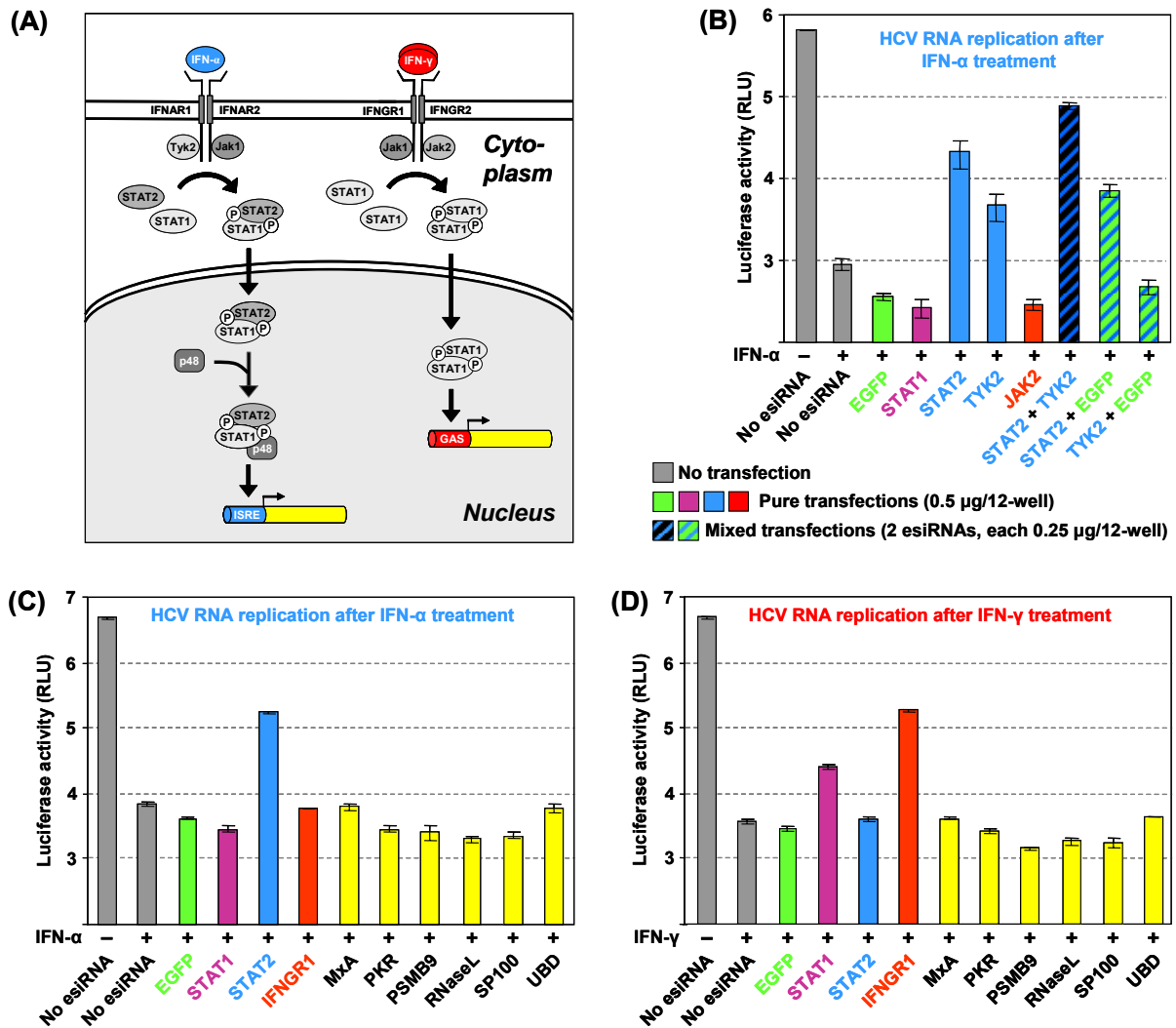


FIG. 7. Rekonstitution der HCV-Replikation in interferonisierten Zellen durch die Transfektion von esiRNAs. (A) IFN-Signaltransduktionswege. IFNAR, IFN- α -Rezeptor; IFNGR, IFN- γ -Rezeptor; Tyk, Tyrosinkinase, Jak, Januskinase oder just another kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; ISRE, IFN-stimulated response element; GAS, gamma activation sequence. (B, C und D) HCV-Replikation (Luziferase-aktivität) in interferonisierten Zellen nach der Transfektion von esiRNAs. Gezeigt sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus mehreren Versuchen (n = 4 to 6). RLU, relative light units.

Von den anderen in diesem Projekt getesteten esiRNAs hatten leider nur wenige (z.B IFITM2-spezifischen esiRNAs) eine rekonstituierende Wirkung auf die HCV-Replikation. Diese Ergebnisse werden zurzeit in weiterführenden Experimenten überprüft. Wie im Antrag beschrieben, wurde zu diesem Zweck ein neuere retroviraler Vektor konstruiert (Fig. 8). Dieser Vektor ermöglicht die kon-stitutive Expression von sogenannten short hairpin RNAs (shRNAs), die von der Zielzelle zu siRNA prozessiert werden. Wie in verschiedene Experimenten gezeigt werden konnte, ist dieses neue Vektorsystem ein effizientes Werkzeug zum spezifischen und dauerhaften silencing von viralen und zellulären Genen (Krönke et al. 2004, J. Virol. 78: 3456-3446).

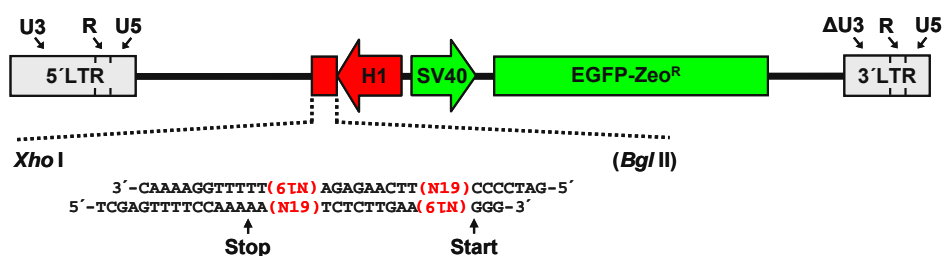


Fig. 8. Schematischer Aufbau der retroviralen Vectors pBABE/H1/SV40-EGZDU3. LTR, *long terminal repeat*; H1, *H1 gene promoter*; SV, *SV40 promoter*

Es ist denkbar, dass die antivirale Aktivität beider IFN-Typen durch mehrere Effektorproteine vermittelt wird. In diesem Fall ist es erforderlich, die Expression von mehreren Effektorgenen gleichzeitig zu verhindern. Wie die Ergebnisse mit den STAT1- und Tyk2-spezifischen esiRNAs zeigen, ist es möglich, zumindest zwei esiRNAs zu kombinieren. Entsprechende Experimente effektor-spezifischer esiRNAs sind in Vorbereitung. Allerdings lassen sich nicht beliebig viele esiRNAs gleichzeitig einsetzen. Zum einen steigt die Zahl der durchzuführenden Experimente exponentiell und zum anderen steht in der Zelle nur eine begrenzte Anzahl der RNA-induced silencing complexes für die mRNA-Degradation zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde für den weiteren Fortgang des Projektes eine Zusammenarbeit mit Dr. Reuven Agami (Division of Tumor Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) vereinbart. Durch diese Kollaboration besteht ein Zugang zu einer Bank mit 24.000 verschiedenen shRNAs.

2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit:

Trotz intensiver Bemühungen war es bisher nicht möglich, die gegen die HCV-Replikation gerichteten Effektoren des IFN-Systems zu ermitteln. Eine Beantwortung dieser Frage ist aber von großer Wichtigkeit, weil diese Effektoren möglicherweise als prognostische Marker für ein Therapieansprechen und als Ansatzpunkt für neue Therapieansätze dienen könnten. Die bisherigen Ergebnisse sind jedoch negativ, so dass kein konkreter Nutzen bzw. Verwertbarkeit gegeben ist.

Die Ergebnisse der THOV-Experimente zeigen, dass der im Rahmen dieses Projektes etablierte Funktionstest für antiviral aktive, IFN-induzierte Effektorproteine zumindest in anderen Virus-systemen erfolgreich angewendet werden kann. Diese Information könnte für andere im HepNet vertretene Forschungsprojekte von

Bedeutung sein. Eine konkrete Verwertbarkeit ausserhalb der reinen Grundlagenforschung ist jedoch nicht zu erkennen.

3. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

Die Frage nach zellulären Determinanten der durch IFN- α und IFN- γ vermittelten Hemmung der HCV-Replikation ist nach wie vor unklar. Es sind in den letzten 18 Monaten auf diesem Gebiet auch von anderen Stellen keine entscheidenden Fortschritte veröffentlicht worden.

4. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen:

Folgende Artikel wurden im Rahmen des HepNet-Projekts bereits veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

Originalpublikationen (peer-reviewed publications):

1. Krönke, J., R. Kittler, F. Buchholz, M. Windisch, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, and M. Frese (2004). Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *Journal of Virology* 78:3436-3446.
2. Mihm, S., M. Frese, V. Meier, P. W. Braun, J. G. Scharf, R. Bartenschlager, and G. Ramadori (2004). Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. *Laboratory Investigation* 84:1148-59.

Übersichtsartikel und Buchbeiträge:

1. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in Virus Research* 63:71-180.
2. Frese, M., V. Lohmann, T. Pietschmann, A. Kaul, N. Krieger, J. Bukh, and R. Bartenschlager. 2004. Hepatitis C virus replication in cell culture. In: M. Omata, K. Okita (eds.) *Therapy for viral hepatitis and prevention of hepatocellular carcinoma.*

Page 108-122.

c) *Manuskripte in Bearbeitung (Versuche abgeschlossen):*

1. Windisch, M. P., M. Frese, M. Trippler, V. Lohmann, and R. Bartenschlager. Dissecting interferon-mediated inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel replicon cell line (in preparation).

Kongressbeiträge:

1. U. Zeuge, I. Mägele, R. Kittler, F. Buchholz, M. Trippler, M. Lu, R. Bartenschlager, and M. Frese (2004). Towards the identification of interferon-induced proteins inhibiting hepatitis C virus replication. 11th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Heidelberg, 03.-07.10.04 (selected as best poster presentation).