

Aus der Fachrichtung Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie,
Diabetologie und Ernährungsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. F. Lammert
Ehemals Univ.-Prof. Dr.med. S. Zeuzem

**Bedeutung des
2'-5'-Oligoadenylatsynthase (2'-5'-OAS)/RNase L Systems bei Patienten mit
chronischer Hepatitis C Virus Infektion und unterschiedlichem virologischen
Ansprechen auf eine Interferon alfa-basierte Therapie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Oliver Thorsten Ackermann
geb. am: 13.10.1978 in Erlangen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	5
1. Einleitung	6
Epidemiologie und Geschichte des Hepatitis C Virus	6
Krankheitsbild und Verlauf	7
HCV-Genotypen und Verteilungsmuster.....	8
Molekulare Struktur des HCV.....	9
HCV-Lebenszyklus	12
Wirkung von Interferon.....	14
Bedeutung des 2'-5'-Oligoadenylat-synthetase/RNase L Systems	15
Resistenzmechanismen.....	18
2. Fragestellung der Arbeit	20
3. Material und Methoden	22
Geräte und Einwegmaterialien.....	22
Chemikalien und Reagenzien	23
Reagenziensets	23
Enzyme	24
Primer	24
Patienten und Patientenserum.....	24
Therapiekontrolle	26
Versuchsvorbereitung	26
HCV-RNA-Extraktion.....	26
RNA-Extraktion und verwendete Kits.....	27
Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction)	29
Funktionsweise der Reversen Transkription	29
Durchführung der Reversen Transkription	30
Prinzip der Polymerasekettenreaktion	31
Durchführung der PCR.....	34
Agarosegel-Elektrophorese.....	35
Durchführung der Elektrophorese	36
Aufreinigung von PCR-Produkten	39
Sequenz-PCR und DNA-Sequenzierung	39
Durchführung der Sequenz-PCR	41
Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte, Prinzip der Gelsäulenfiltration.....	42
Durchführung der Gelsäulenfiltration	42
Sekundärstrukturprädiktion	43
Qualitative Sequenz-Analyse	46
Statistische Analyse.....	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Assoziation von RNase L Schnittstellen mit dem Therapieansprechen bei Patienten mit einer HCV-1b oder -3a Infektion.....	47
4.2 Assoziation der Anzahl der RNase L Schnittstellen mit dem HCV Genotyp....	51
5. Diskussion	53
6. Abkürzungsverzeichnis	59

7. Literaturverzeichnis	61
Danksagung	80
Lebenslauf.....	81

Zusammenfassung

Hintergrund: Interferon-alfa (IFN) induziert die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase, die wiederum die RNase L aktiviert. Virale RNA wird durch RNase L an UU und UA Dinukleotiden geschnitten. Die klinische Relevanz des 2'-5'-OAS/RNase L-Systems für das Ansprechen auf eine Interferon-basierten Therapie der chronischen Hepatitis C ist unbekannt.

Methoden: Bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1b oder 3a Infektion wurden Nukleotidsequenzen vor Therapiebeginn, die für Nichtstruktur- und Struktur-Proteine des Hepatitis C Virus (HCV) kodieren, auf eine Assoziation zwischen dem virologischen Ansprechen auf eine Interferon-basierte antivirale Therapie und der Anzahl an potentiellen RNase L Schnittstellen untersucht. Darüber hinaus wurde bei mit HCV Genotyp 1b infizierten Patienten mit fehlendem virologischem Ansprechen, d.h. kontinuierlich nachweisbarer HCV-RNA im Serum unter Therapie (Nonresponder) die Anzahl an RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen vor Therapie mit der Anzahl während einer Interferon-basierten antiviralen Therapie verglichen. Ferner wurde die Anzahl an potentiellen RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen von Isolaten verschiedener HCV Genotypen (HCV –1b und HCV-3a) verglichen. MFOLD wurde zur Prädiktion suboptimaler RNA-Sekundärstrukturen von Nukleotidsequenzen angewandt

Ergebnisse: Innerhalb eines gegebenen HCV Genotyps wurden keine Unterschiede in der Anzahl der RNase L Schnittstellen zwischen Patienten mit bzw. ohne Therapieansprechen beobachtet. Nonresponder mit einer HCV Genotyp 1b Infektion eliminierten nicht UU/UA Dinukleotide aus dem HCV Genom im Verlauf einer Interferon-basierten antiviralen Therapie.

HCV Genotyp 1b Isolate zeigten eine geringere Anzahl an UU/UA Dinukleotiden als HCV Genotyp 3a Isolate ($p < 0.001$).

Schlussfolgerungen: Ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Interferon-basierte antivirale Therapie läßt sich innerhalb eines gegebenen HCV Genotyps nicht mit einer unterschiedlichen Anzahl an RNase L Schnittstellen im HCV Genom erklären. Generelle Unterschiede in der Interferon-Empfindlichkeit verschiedener HCV Genotypen korrelieren jedoch mit der Anzahl an RNase L Schnittstellen.

Abstract

Background: Interferon-alfa induces 2'-5'-oligoadenylate synthetase which activates RNase L. Viral RNA is cleaved by RNase L at UU/UA dinucleotides. The clinical relevance of RNase L cleavage for response to an Interferon-alfa-based therapy in chronic hepatitis C is unknown.

Methods: RNase L cleavage sites within pre-treatment sequences coding for structural and non-structural hepatitis C virus proteins were compared between nonresponders and responders to an interferon-alfa-based antiviral therapy. Furthermore, RNase L cleavage sites were analyzed in partial genome isolates of hepatitis C virus genotype 1b infected patients without virologic response and persistently detectable HCV RNA during antiviral therapy (nonresponder) before and during treatment and in different hepatitis C virus genotypes (1b, 3a). MFOLD was applied for suboptimal RNA secondary structure predictions for the nucleotide sequences.

Results: No differences in RNase L cleavage sites were observed between nonresponders and responders within a given hepatitis C genotype. Nonresponders with hepatitis C virus genotype 1b infection did not eliminate UA/UU dinucleotides during therapy. Hepatitis C virus genotype 1b isolates showed a lower number of UA/UU dinucleotides than hepatitis C virus genotype 3a isolates ($p < 0.001$).

Conclusions: Response or non-response to an interferon-alfa-based therapy within a given hepatitis C virus genotype is not explained by differences for RNase L cleavage sites. General differences of interferon-sensitivity between hepatitis C virus genotypes correlate significantly with frequencies of RNase L cleavage sites.

1. Einleitung

Epidemiologie und Geschichte des Hepatitis C Virus

Der Begriff der Virushepatitis fasst eine Entität zusammen, die ausgelöst wird durch unterschiedliche Erreger und die eine nichteitrige Entzündung der Leber darstellt. Die Erreger der Virushepatitis werden mit den Großbuchstaben A-E bezeichnet. Desweiteren wurden in der jüngeren Vergangenheit Erreger identifiziert, die zunächst ebenfalls im Verdacht standen eine Virushepatitis auszulösen, wie zum Beispiel die TTV- und GBV-C/HGV-Viren, bei denen jedoch bislang kein eindeutiger Zusammenhang mit einer Virushepatitis hergestellt werden konnte (151).

Grundsätzlich werden parenteral (Hepatitis B, C, D) von enteral (Hepatitis A, E) übertragbaren Hepatitisviren unterschieden. Nach der Erstbeschreibung des Hepatitis A (HAV)- und Hepatitis B (HBV)Virus in den 1960er und 1970er Jahren wurden daraufhin alle Blutspender routinemäßig auf das parenteral übertragbare HBV getestet. Allerdings blieb die Ursache vieler Posttransfusionshepatitiden nach wie vor ungeklärt (39, 100). Erst 1988/89 gelang es einer Forschergruppe um Choo mittels moderner molekularbiologischer Verfahren, den Erreger dieser - als Non-A-Non-B-Hepatitis bezeichneten - Posttransfusionshepatitis zu identifizieren. Durch Sequenzierung sich überlappender cDNA-Klone konnte schließlich die gesamte Nukleotidsequenz dieses dann Hepatitis C Virus genannten Virusgenoms dargestellt werden (22). Weitere Analysen zeigten, dass 60-80% dieser Posttransfusionshepatitiden eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus darstellten (23, 69).

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviridae, die sowohl die Flaviviren als auch die Pestiviren beinhaltet.

Die Virushepatitis C ist weltweit verbreitet. Nach Angaben der WHO sind global 170 Millionen Menschen, d.h. ca. 3% der Weltbevölkerung chronisch mit dem Hepatitis C Virus infiziert. In Deutschland beträgt die Anzahl der Menschen, die Kontakt mit dem HCV hatten, vermutlich zwischen 400.000 und 500.000 Menschen. Dies bedeutet eine Prävalenz von 0,5-0,7% der Bevölkerung (92). Für das Jahr 2007 wurden dem Robert-Koch-Institut in Berlin insgesamt 6.858 Fälle von erstdiagnostizierter Hepatitis

C übermittelt. Dies entsprach einer bundesweiten Inzidenz von 8,3 Erstdiagnosen pro 100.000 Einwohner (105).

Die Infektion mit dem Hepatitis C Virus erfolgt parenteral, beispielsweise durch Transfusion von Blut- und Blutprodukten in der Vergangenheit bzw. kontaminierte Instrumente und Kanülen bis in die heutige Zeit. Dies zeigt sich in den unterschiedlichen Durchseuchungsraten innerhalb der unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen. Eine sexuelle sowie perinatale Übertragung der Hepatitis ist möglich, tritt in der Häufigkeit im Vergleich mit den anderen Übertragungswegen allerdings in den Hintergrund (153). Eine Übersicht über die eben erläuterten Fakten zeigt die Tabelle 1.1, die vom statistischen Bundesamt in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut erstellt wurde.

Bevölkerungsgruppe	HCV-Durchseuchung (Antikörper-positiv)
Menschen mit Bluterkrankheit (Hämophilie), die vor 1987 Blutgerinnungsfaktoren erhalten haben	80-90%
Intravenös injizierende Drogenkonsumenten	60-80%
Organtransplantierte	5-15%
Dialysepatienten	4-10%
Kinder von Müttern, die während der Schwangerschaft/Entbindung HCV-infiziert waren	3-5%
Allgemeinbevölkerung (Erwachsene)	0,5-0,7%

Tabelle 1.1 HCV Durchseuchungsraten in verschiedenen Bevölkerungsgruppen in Deutschland (52, 120, 121, 128, 145)

Krankheitsbild und Verlauf

Bei der Mehrzahl der Betroffenen, in ca. 75%, verläuft die akute Hepatitis C Infektion asymptomatisch. Lediglich unspezifische grippeähnliche Symptome, wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Oberbauchbeschwerden, Leistungsabfall, teilweise auch Juckreiz und Gelenkbeschwerden werden berichtet. Desweiteren verläuft die Hepatitis C Infektion in einem bemerkenswerten Anteil der Fälle chronisch. Durchschnittlich 60-80% der akuten Fälle zeigen einen chronifizierenden Verlauf (68, 147). Von einer chronischen HCV-Infektion ist auszugehen, wenn die HCV-RNA über 6 Monate nachweisbar ist. Desweiteren finden sich typischerweise bei einer chronischen HCV-

Infektion lediglich leicht bis mäßig erhöhte Transaminasen, d.h. erhöhte Enzymaktivitäten der Alanin-Aminotransferase (ALAT) und der Aspartat-Aminotransferase (ASAT). Eine fehlende charakteristische Symptomatik und die fehlende bzw. minimale Erhöhung der Leberwerte zusammen mit der relativ langsamen Progredienz der Leberschädigung führt dazu, dass sich der typische Verlauf einer Hepatitis C Virusinfektion über mehrere Jahre, ja sogar Jahrzehnte erstreckt und in vielen Fällen unerkannt verläuft. Dieser lange Verlauf ist am ehesten die Folge der Immunreaktion, die eine chronische Entzündungsreaktion darstellt und nicht zu der Eliminierung des Virus führt, sondern zu einer Fibrose der Leber (122). Langfristig entwickelt sich bei ca. 20% der Betroffenen über die Fibrose eine Leberzirrhose. Durchschnittlich beträgt hierbei die mittlere Erkrankungsdauer von Infektion bis zur Entstehung der Leberzirrhose 20-30 Jahre. Vermutlich nimmt mit zunehmender Krankheitsdauer die Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung einer Leberfibrose zu. Innerhalb dieses Patientenkollektivs entwickeln bei eingetretener Leberzirrhose wiederum bis ca. 5% pro Jahr ein hepatozelluläres Karzinom. Diese Tatsache verleiht der Erkrankung und insbesondere der Diagnose eine entscheidende klinische und gesundheitsökonomische Bedeutung (37, 57).

HCV-Genotypen und Verteilungsmuster

Das HCV-Virus ist ein RNA-Virus. Wie die meisten RNA-Viren, die über eine RNA-Polymerase ohne Fehlerkorrekturmechanismus replizieren, so besitzt auch das HCV eine hohe Mutationsrate von durchschnittlich 2×10^{-3} Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr. Dies führt zu einer großen Heterogenität der Sequenzen (91). Bisher konnten mindestens 6 verschiedene HCV Genotypen differenziert werden, deren Genomhomologie 66-70% beträgt. Die Differenzierung erfolgte mittels phylogenetischer Analysen der Nukleotid- bzw Aminosäuresequenzen, der für das NS5A Protein kodierenden Genomregion.

Diese 6 Genotypen lassen sich weiterhin in eng miteinander verwandte Subtypen (Genomhomologie 77-80%) aufteilen, welche mit den Buchstaben a-z gekennzeichnet sind. Desweiteren gibt es noch einzelne Isolate mit einer Genomhomologie von 91-95% (14, 127).

Innerhalb eines Patienten bilden sich durch Mutationen des HCV-Genoms Populationen aus, die sich durch eine hohe Homologie (>98%) aufgrund lediglich einzelner Basenmutationen auszeichnen. Diese Populationen nennt man Quasispezies (63).

Die beschriebenen Genotypen zeigen weltweit eine unterschiedliche Prävalenz. Zeigen die Genotypen 1 bis 3 eine weltweite Verbreitung, so kommen die Genotypen 4 bis 6 in bestimmten geographischen Regionen gehäuft vor. So kommt der Typ 4 vornehmlich in Nord- und Zentralafrika sowie im Vorderen Orient vor, Typ 5 in Südafrika und Typ 6 in Südostasien und Hong Kong (126). In Deutschland herrscht der Genotyp 1 vor, wobei der Subtyp 1b über 1a dominiert. Diese beiden Subtypen zusammen machen hierzulande 50-70% der Infektionen aus.

Zuzüglich zur geographischen Verteilung unterscheiden sich die Genotypen außerdem in ihrem Ansprechverhalten auf eine antivirale Therapie. So spricht der Genotyp 1 weitaus schlechter auf die Standardtherapie mit Interferon-alfa bzw. pegyliertem Interferon-alfa plus Ribavirin an als die Genotypen 2 und 3 (20). Dagegen scheint es beim natürlichen Verlauf der HCV Infektion keine raschere Progression der Erkrankung in Assoziation mit der Infektion mit einem bestimmten HCV Genotyp zu geben.

Molekulare Struktur des HCV

Das Hepatitis C Virus gehört dem Genus der Hepaciviridae der Familie der Flaviviridae an (76). Das HCV Genom ist ca. 9600 Nukleotide lang und besitzt ein offenes Leseraster (open reading frame), welches für ein Polyprotein codiert, das aus ca. 3000 Aminosäuren besteht. Das N-terminale Drittel beherbergt die Struktur-Proteine, während die C-terminalen zwei Drittel die Nichtstruktur-Proteine (Nonstructural proteins) beinhalten. Dieses Polyprotein wird co- und posttranslational von viralen und wirtseigenen Proteasen in mindestens 10 Proteine prozessiert: Kapsid (Core), E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Die Viruspartikel der Hepaciviren werden von einer Lipidhülle umgeben, in der zwei Glykoproteine verankert sind: Envelope 1 (E1) und Envelope 2 (E2). Die Struktur-Proteine sind das Core-Partikel – bestehend aus einem Core-Protein (C) inklusive F-Protein (Frameshift-Protein)-auch alternative reading frame proteine (ARFP) und einer Einzel-(+)-Strang-RNA mit ca. 9600 Nukleotiden - und die beiden

Hüllenproteine E1 und E2 (Envelope). Sie werden durch wirtseigene Enzyme, die am endoplasmatischen Retikulum (ER) sitzen vom Polyprotein abgeschnitten. Das Core findet man hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Seite des ER und auf der Oberfläche von Lipid-Tropfen, die vom ER abgeschnürt werden (58). Das Core-Protein bildet das virale Nukleokapsid und agiert in ausgereifter Form wie ein Membranprotein (9, 111). Darüberhinaus interagiert das Core-Protein mit einer Vielzahl zellulärer Proteine und beeinflusst eine Reihe wirtseigener Zellfunktionen wie zelluläre Signalwege, Apoptosis, Karzinogenese und den Lipidstoffwechsel (83, 101, 135). Die Funktion des Frameshift-Proteins ist noch weitgehend unklar, es wird aber *in vivo* gebildet, stimuliert die spezifische Immunantwort mit resultierender Antikörperproduktion und scheint für einige Effekte verantwortlich zu sein, die dem Core-Protein zugeschrieben werden (5, 10, 137). E1 und E2 sind Typ-I-Membranproteine mit einer ausgeprägten glykosilierten Ektodomäne. Beide Proteine formen ein Heterodimer und verbleiben im ER (138). Beide Hüllproteine spielen eine Rolle beim Viruseintritt, der Rezeptorbindung und der Herstellung infektiöser Partikel (7, 24, 53, 106, 141). Die Ansammlung der Struktur-Proteine an dem ER lässt vermuten, dass sie in diesem Zellkompartement entstehen, allerdings gibt es hierfür noch keinen direkten experimentellen Nachweis.

Ob das p7-Protein zu den Struktur oder den Nicht-Struktur-Proteinen gehört, ist noch nicht ganz geklärt. Es besteht aus zwei Transmembrandomänen und bildet einen Ionenkanal, der für die Sekretion infektiöser Virus' eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (108, 129). Interventionen an diesem Ionenkanal führen zu antiviralen Effekten (85, 108).

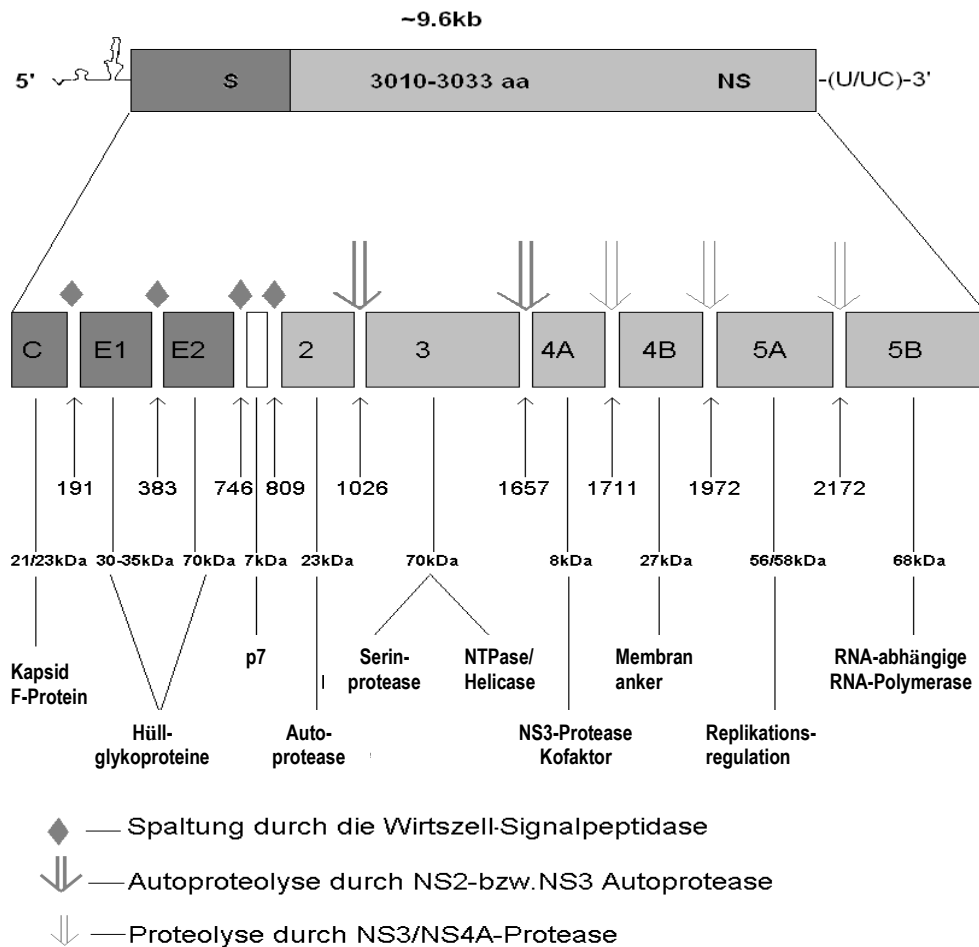
Die Gruppe der Nichtstruktur-Proteine setzt sich zusammen aus NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. NS2-3 ist eine Autoprotease, die an der Schnittstelle NS2-NS3 schneidet. Die weitere proteolytische Prozessierung der Regionen NS3-NS5 wird katalysiert durch die NS3-Protease und ihren Kofaktor NS4A. Desweiteren erfüllt NS3 die Funktion einer Helikase, das heißt sie entrollt doppelsträngige Nukleinsäuren, des Weiteren besitzt sie eine NTPase-Aktivität. NS4A dient als Kofaktor für die Aktivitäten von NS3. NS4B besteht aus mehreren transmembranen Domänen, dient der Membranassoziation und bildet mit Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums den Replikationskomplex (33, 35, 36, 46, 47, 61, 74). NS5A dient als Membrananker (11, 33, 94). Darüberhinaus besteht NS5A aus 3 Domänen, von welchen die Struktur der Domäne I kürzlich radio-kristallographisch

dargestellt werden konnte (134). Diese Domäne I ist für die RNA-Replikation unerlässlich (133, 134). Die verbleibenden 2 Domänen II und III sind bisher weniger ausführlich charakterisiert worden. Domäne II ist vermutlich involviert in die Hemmung der interferon-induzierten Proteinkinase (PKR)(44). Domäne III ist eine genetisch flexible Region des NS5A Proteins, Insertionen oder auch Deletionen bleiben ohne größere Auswirkungen auf den Replikationszyklus (3, 88). Neben der RNA-Replikation scheint das NS5A Protein auch für die Sensitivität auf eine Interferon-alfa basierte Therapie eine entscheidende Rolle zu spielen (93, 131). NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und katalysiert die Synthese der viralen RNA (87).

Bei der Replikation des HCV wird über ein (-)-Intermediat der neue (+)-Strang gebildet. Dieser steht dann für die Translation der HCV-Proteine zur Verfügung oder wird für die Bildung neuer Viruspartikel verwendet (6).

Am 5'-Ende befindet sich eine hochkonservierte Nicht-translatierte-Region (NT-Region) von 341 Nukleotiden, die eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRBS) enthält und die Expression des HCV-Polyproteins steuert. Das 3'-nicht-translatierte Ende umfasst einen kurzen variablen Abschnitt, gefolgt von einem poly-(U)-Strang und einer hochkonservierten Region aus 98 Nukleotiden. Diese hochkonservierte Sequenz ist vermutlich für das Selbstpriming im Rahmen der Replikation notwendig. (Abb 1.1: (103, 143))

Abbildung 1.1: Darstellung des HCV-Genoms, des Ablaufs der Translation und der Prozessierung der Proteine.



kb Kilobase; S Strukturregion, NS Nichtstrukturregion; 5' 5'-Ende, 3' 3'-Ende, C Core-Protein; F-Protein Frameshiftprotein; E1/E2 Envelopeproteine; p7 p7-Protein, 2-3-4A-4B-5A-5B Nichtstrukturproteine 2-3-4A-4B-5A-5B; kDa Kilodalton

HCV-Lebenszyklus

Das HCV gelangt rezeptorvermittelt in die Hepatozyten. Nach aktuellem Kenntnisstand ist dies ein mehrschrittiger Prozess, der eine Vielzahl an Eintrittsmolekülen benötigt (15). Hierbei kommt dem Lipoproteinstoffwechsel zu Beginn der Infektion eine entscheidende Bedeutung zu. Neben bestimmten Oberflächenmolekülen, die essentielle Rezeptoren oder Corezeptoren des HCV-Zelleintritts sind, gehören die Lipoproteine zu einer Molekülgruppe, die einzubeziehen sind bei der Anlagerung und der Aufnahme des HC-Virus in die Zielzelle. HC-Viruspartikel werden durch triglyceridreiche Lipoproteine gebunden.

Diese Lipoproteine enthalten zumeist Apolipoproteine, insbesondere Apolipoprotein B (ApoB) (2, 75). Dies ist darüber hinaus auch ein wesentlicher Bestandteil der Low density Lipoproteine (LDL) und der Very low density Lipoproteine (VLDL)(2, 89). VLDL begünstigt die Virusaufnahme und schützt gleichzeitig das Virus vor neutralisierenden Antikörpern (139). Desweiteren gehören in diese Molekülgruppe, die eine Aufnahme des HCV in die Hepatozyten ermöglichen, die oberflächenexprimierten Glycosaminoglycane, wie das Heparansulfat, die Lectine, Dendritic cell (DC)-specific intracellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin DC-SIGN und das leberspezifische (L)-SIGN (26, 70). Außerdem der low-density lipoprotein (LDL)-Rezeptor (1).

Zur Gruppe der Rezeptoren gehören der Tetraspanin CD81-Rezeptor (95), der Human Scavenger Rezeptor Class B Type 1 (SR-B1) (119) und die Tight junction Proteine Claudin-1 (CLDN-1) (38) und Occludin (73). Die lipoproteinassoziierten Hepatitis C Viren binden mit der E2-Bindungsregion an den CD81-Rezeptor, des weiteren kommt es durch die hypervariable Region 1 des HCV-E2-Proteins (E2HVR1) zu einer Bindung an den Scavenger Rezeptor SR-B1 (119). Dieser Komplex gelangt nun im Rahmen einer Relokalisation in den Bereich der Zell-Zellkontakt-Region und somit in Kontakt mit den Tight-junction Proteinen Claudin-1 und Occludin (12). Hierbei scheint es auch zwischen Occludin und E2 zu einer direkten Interaktion zu kommen (8, 73). Über Endozytose erfolgt die Aufnahme des Virus in das Zellinnere.

Anschließend wird die RNA freigesetzt und verfolgt von nun an 2 Pfade. Zuerst wird die RNA durch wirtseigene Ribosomen in das virale Polyprotein translatiert. Anschließend wird die genomische RNA direkt durch das NS5B - Protein, welches eine RNA-abhängige RNA-Polymerase darstellt, über eine replikative Zwischenstufe und Vorläufer-RNA in eine neue Plusstrang RNA kopiert. Dann werden die Struktur-Proteine mit der neu-gebildeten viralen RNA zusammengelagert, bilden somit neue reife Viruspartikel, die dann durch Lyse oder Exozytose in den Kreislauf entlassen werden (70).

Durch die Tatsache, dass es keine DNA-enthaltende Form des HCV gibt - im Gegensatz zu dem HIV oder dem HBV - wird eine HCV-Infektion prinzipiell als kurierbar mit vollständiger Elimination des HCV aus dem Wirtsorganismus angesehen. Beobachtungen aus dem letzten Jahrzehnt belegen durchaus Erfolge in der Therapie mit der aktuellen Standardtherapie, bestehend aus pegyliertem

Interferon alfa und Ribavirin, die in unterschiedlicher Anzahl innerhalb der jeweiligen Genotypengruppen zu einem dauerhaften virologischen Ansprechen geführt haben (sustained virologic response) (43, 80).

Wirkung von Interferon

Interferon ist ein körpereigenes Zytokin, welches im Rahmen einer viralen Infektion vom Körper produziert und freigesetzt wird und die erste Stufe der antiviralen Körperabwehr darstellt. Die weitere Reaktion des infizierten Körpers besteht in der adaptiven oder zellulären Immunantwort durch die Gegenwart virusreaktiver T-Zellen, die bei der Virushepatitis u.a. die Beseitigung infizierter Hepatozyten zur Folge hat.

In Hepatozyten triggert im Rahmen der nicht-adaptiven Immunantwort (innate immunity) virale Doppelstrang-RNA die Aktivierung zweier Moleküle – Toll-like receptor (TLR) 3 und retinoic-acid-inducible-gene I (RIG-I). Die Aktivierung jedes dieser Proteine führt zur Phosphorylierung des Interferon regulatory factor (IRF)-3, welcher anschließend in den Nukleus transloziert, um dort die Interferon-beta Produktion zu aktivieren. Interferon-beta wird nun sowohl autokrin als auch parakrin freigesetzt. Es kommt an der Zelloberfläche zu einer Verbindung mit den IFN AR1/AR2-Oberflächenrezeptoren, die wiederum die Typ1 Interferon-Signaltransduktion triggern. Diese wird vermittelt über die Jak und STAT Kinasen. Die Bindung an den Interferonrezeptor aktiviert die rezeptorassoziierte Jak1 und Tyk2-Kinasen, welche wiederum zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 führen. STAT1 und STAT2 nun bilden zusammen mit IRF-9 (Interferon regulatory factor 9) einen heterotrimeren Komplex, der wiederum in den Nukleus transloziert und dort eine Translation der sogenannten interferonstimulierten Gene (ISGs) auslöst. Hierbei handelt es sich um ca. 100 Gene, die durch IFN und auch IRF-7 aktiviert, dann phosphoryliert werden, anschließend dimerisieren und somit eine Interferon-alpha vermittelte Genexpression darstellen. Diese Reaktion führt also zu einer generalisierten antiviralen Antwort der infizierten Zelle und ihrer Nachbarzellen (45).

Von der Vielzahl antiviraler Interferon-alfa-induzierter Effektormechanismen sind lediglich wenige gut untersucht und deren Wirkmechanismus bekannt. Hierzu gehört die 1) Doppelstrang-RNA aktivierte Proteinkinase (PKR), welche die

Phosphorylierung des eukariotischen Translationsinitiationsfaktor-2a (eIF-2a) und damit eine allgemeine Hemmung der Translation bewirkt. 2) ISG56, das die HCV-Translation inhibiert und 3) die Oligoadenylatsynthetase, die eine endogene Ribonuklease – RNase L - induziert, die wiederum selektiv einzelsträngige virale RNA schneidet (21). Desweiteren 4) die Gruppe der Mx-Proteine insbesondere das humane MxA-Protein (Myxovirus resistance A-Protein). Mx-Proteine sind GTPasen aus der Superfamilie der dynaminähnlichen GTPasen, die die Virusreplikation hemmen, indem sie an das Nukleokapsid binden und daraus folgend die primäre Transkription unterbinden (67, 109).

Bedeutung des 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase/RNase L Systems

Das 2'-5' Oligoadenylatsynthetase(OAS)/RNase L System ist ein wichtiges antivirales System, das in nahezu jeder Zelle vorhanden ist. Es befindet sich im Zytoplasma und reagiert dort auf virale doppelsträngige RNA, was schließlich die Aktivierung latenter Endoribonukleasen und den Abbau viraler mRNA zur Folge hat. In diesem Abbauweg stellt die 2'-5'OAS das initiale Enzym dar.

Interferon (Interferon- α , Interferon- β und Interferon- γ) induziert die Expression von 2'-5'OAS. Hierbei werden verschiedene Formen der 2'-5'OAS unterschieden: klein (small), mittel (medium), groß (large) (60, 102). Diese Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch durch die Anzahl ihrer katalytischen Domänen (small: 1 Domäne, medium: 2 Domänen, large: 3 Domänen). Auch wenn die Isoformen unterschiedlich innerhalb der Zelle verteilt sind, so finden sie sich doch alle verteilt im Zytoplasma und im Nukleus.

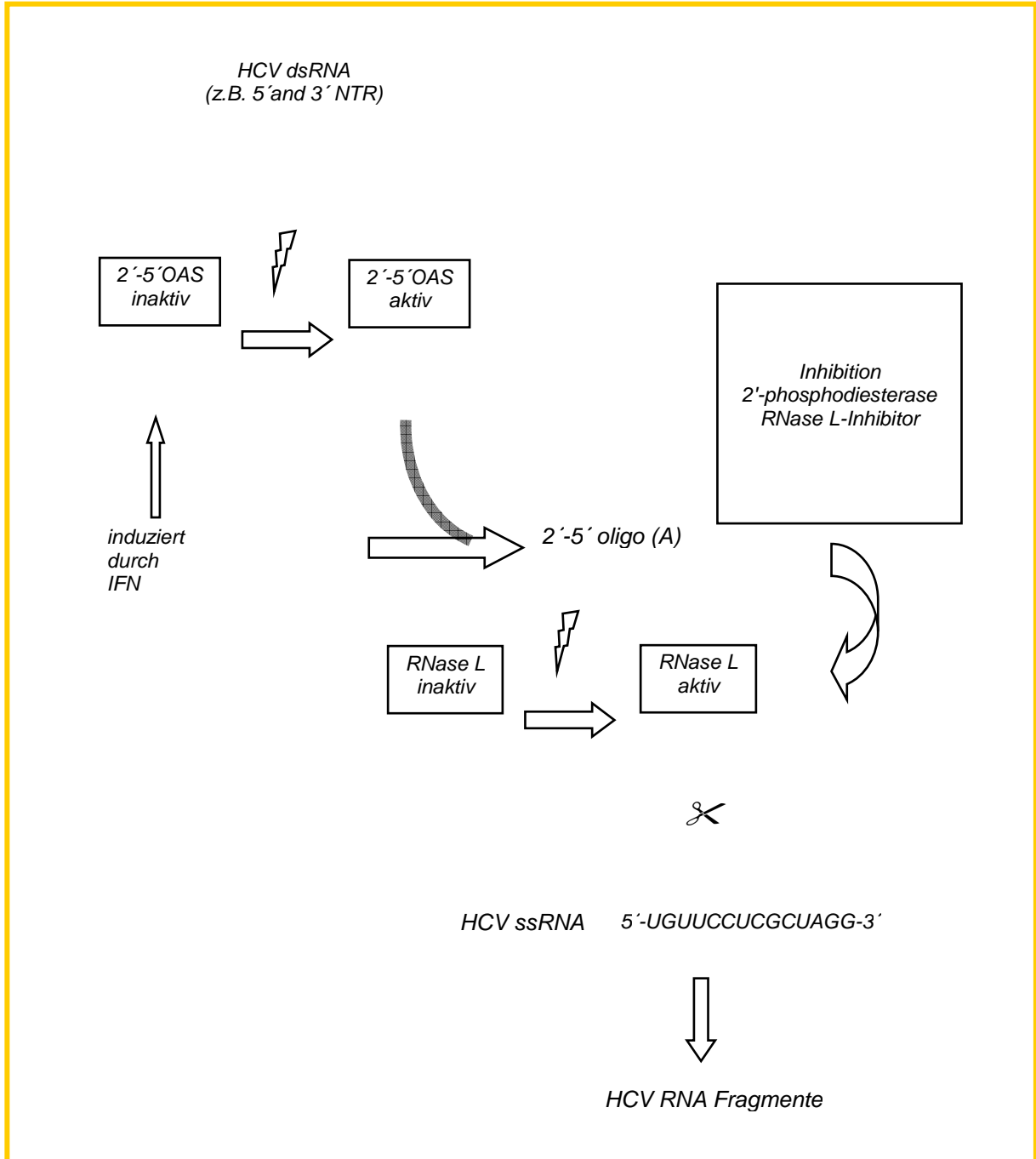
Selbst wenn die Expression der 2'-5'OAS durch Interferon stimuliert wird, so ist letztlich doch doppelsträngige (ds)RNA ein unverzichtbarer Kofaktor für die Aktivierung der 2'-5'OAS. In Abwesenheit der dsRNA findet keine 2'-5'OAS-katalysierte Synthese von 2'-5'oligo(A) statt. Hinsichtlich der Aktivierung der OAS durch virale dsRNA scheint neben der Konzentration auch die Größe der dsRNA eine Rolle zu spielen: in niedrigeren Konzentrationen aktiviert längere dsRNA eher, während in höheren Konzentrationen die 2'-5'OAS auch durch kurze dsRNA vollständig aktiviert wird (30, 112). Desweiteren scheint auch die Struktur der dsRNA

eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen, extensive Sekundärstrukturen durch Faltungen der RNA scheinen die 2'-5'OAS besonders zu aktivieren (29, 81).

Die RNase L wird durch ein Gen kodiert. Sie wird nicht durch Interferon reguliert und findet sich in den meisten Zellen. Hier liegt sie vornehmlich im Zytoplasma und im Nukleus vor. In Abwesenheit von 2'-5'OAS ist die RNase L inaktiv und liegt als Monomer vor. Bindet RNase L hingegen an 2'-5'oligo(A), so dimerisiert sie, was wiederum zur Aktivierung ihrer Endoribonuklease führt (17, 25, 31). Von den vier Ribohomopolymeren: Poly(A), Poly(G), Poly(C), Poly(U) wird lediglich Poly(U) effizient durch die RNase L gespalten, und zwar bei heteropolymerischer viraler mRNA bevorzugt an einzelsträngigen UA und UU-Dinukleotiden (40, 148, 149).

Um eine dauerhafte Aktivierung der RNase L zu verhindern, spaltet eine 2'-Phosphodiesterase 2'-5'OAS in ATP und AMP.

Abb. 1.2.: Das antivirale 2'-5'Oligoadenylatsynthetase/Ribonuklease L-System
ds double strand; ss single strand; NTR nontranslating region



Resistenzmechanismen

Die Hepatitis C Virusinfektion verläuft oftmals chronisch. Dies und die Tatsache, dass Interferon-alpha nicht uneingeschränkt antiviral wirksam zu sein scheint, werfen Fragen nach den zugrundeliegenden Mechanismen auf.

Untersuchungen haben gezeigt, dass HCV imstande ist, das wirtseigene angeborene Immunsystem durch die Wirkung viraler Proteine zu schwächen und zu überwinden (44). Dies geschieht auf den unterschiedlichen Ebenen, der Interferon-Gen Induktion, der Interferon Signal-Transduktion und der interferonstimulierten Genproduktion.

Bei der Interferon-Gen-Induktion besitzt die HCV Serin-Protease NS3-4A die Fähigkeit nahezu die komplette endogene Produktion von Interferon zu hemmen. So unterbricht sie den RIG-I-Signalweg zum Interferon-beta-Promoter, indem sie ein mitochondriales Effektor-Protein - bekannt als IPS-1 – abspaltet. Daraus resultiert die Hemmung von IRF-3 (interferon regulatory factor 3) (42, 62) . Desweiteren spaltet NS3-4A Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing Interferon-beta (TRIF) Moleküle, somit werden TLR-3 vermittelte Signale, die RIG-I-unabhängig IRF-3 aktivieren, unterbrochen.

Die Interferon Signal Transduktion wird gehemmt durch das HCV Core Protein, welches nachgewiesenermaßen die Phosphorylierung von STAT 1 hemmt und dessen Abbau unterstützt. Infolgedessen kommt es zu einer Unterbrechung des Jak-STAT Kinase Pathways der verantwortlich für die Interferon Signal Transduktion ist. (72). Des Weiteren ist das HCV Core Protein imstande, die Expression der suppressor of cytokine 1 and 3 Proteine (SOCS 1 and 3) zu induzieren, dies hat eine Hemmung der Jak-STAT Aktivität auf Rezeptorebene zur Folge. Eine weitere Wirkung des exprimierten HCV Polyproteins ist die Induktion der Proteinphosphatase, die konsekutiv zur STAT 1 Hypomethylierung führt und somit zu einer herabgesetzten Aktivität der STAT 1-Funktion (34).

HCV NS5A und E2 Proteine scheinen die PKR-Funktion zu beeinflussen, indem sie an die PKR binden und somit Ihre katalytische Aktivität hemmen (44, 132) . Des Weiteren induziert das HCV NS5A Protein die Expression von Interleukin 8. IL-8 ist ein Chemokin, das die Funktion von Interferon antagonisiert, indem es entweder die

ISG-Expression oder die –Funktion oder beides abschwächt (98). Nichtstrukturproteine unterdrücken die Expression und Funktion von ISG56, welches normalerweise die virale Protein Translation hemmt (130, 142).

2. Fragestellung der Arbeit

Die chronische Hepatitis C Virus Infektion (HCV) stellt ein globales Gesundheitsproblem dar (4). Die Raten für ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (sustained virologic response, SVR) auf die derzeitige antivirale Standardtherapie mit pegyliertem Interferon-alfa (Interferon-alfa) und Ribavirin sind bislang nicht zufriedenstellend (43, 48, 80). Dabei erscheinen neuartige Wirkstoffe zwar vielversprechend, die Kombination mit Interferon-alfa wird aber weiter benötigt, da dadurch eine Steigerung der antiviralen Aktivität und eine Unterdrückung von resistenten Mutationen (41, 66, 104) erreicht wird (54, 115, 118). Um die antivirale Kombinationstherapie zu optimieren ist deshalb eine weitergehende Charakterisierung des antiviralen Wirkmechanismus des Interferon-alfa erforderlich.

Die Aktivierung des 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2'-5'-OAS)/RNase L Systems ist einer der antiviralen Wirkmechanismen des Interferon-alfa (154). Interferon-alfa induziert die 2'-5'-OAS, die wiederum die RNase L aktiviert. RNase L schneidet einzelsträngige virale RNA auf der 3'-Seite von UU und UA-Dinukleotiden (32, 40, 59, 65, 96, 107, 124, 149). Die überwiegende Anzahl von RNA-Viren werden durch RNase L inhibiert (50).

In vitro konnte die Spaltung der HCV-RNA durch RNase L nachgewiesen werden (49, 51, 144). Doppelsträngige virale RNA wurde dabei nicht geschnitten (51).

Ob eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber einer Spaltung der viralen RNA durch die RNase L, vermittelt durch eine geringere Anzahl an RNase L Schnittstellen im HCV Genom, auch in einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber einer Interferon-basierten antiviralen Therapie resultiert, ist bislang unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Anzahl der RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen vor Behandlungsbeginn (56, 85, 113, 114, 116, 146) von Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf eine Interferon-alfa basierte antivirale Therapie miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden die RNase L Schnittstellen in Isolaten von HCV-1b infizierten Nonrespondern vor und unter Therapie untersucht, um zu prüfen, ob das 2'-5'-OAS/RNase L System einen Evolutions- oder Selektionsdruck auf das HC-Virus mit Elimination von UU und UA Schnittstellen während der Therapie ausübt. Ferner wurde die Anzahl von RNase L Schnittstellen innerhalb der Nukleotidsequenzen von HCV Genotypen mit

unterschiedlicher Sensitivität auf Interferon-alfa (1b, 3a) analysiert. Dabei wurde die Gesamtanzahl der RNase L Schnittstellen unter den Gruppen verglichen. Zusätzlich wurde eine RNA-Sekundärstrukturprädiktion vorgenommen, da in vivo nur Einzelstrang-RNA Bereiche für die RNase L zugänglich und damit relevant für die Funktion sind und die Anzahl der RNase L Schnittstellen innerhalb der einzelsträngigen RNA-Regionen zwischen den Gruppen verglichen.

3. Material und Methoden

Geräte und Einwegmaterialien

Laminar-Flow-System	Heraeus / Kendro Laboratory Products, Hanau
Thermocycler Gene Amp PCR System 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler	Vortex REAX, Heidolph, Kehlheim
Pipetten Typ Labmate	ABIMED, Langenfeld
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	0,5 ml Perkin Elmer, Weiterstadt
Rotilab-Mini-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Mikrowellenofen	Bosch, Stuttgart
Sterilfilter-Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg
Chemikalienwaage	Denley
Elektrophoresekammer	Whatman-Biometra, Gibco BRL, Karlsruhe
Spannungsgeber	Consort E 835, Keutz, Reiskirchen
Foto-Apparatur	Polaroid, Cambridge, England
Nitril-Handschuhe	NOBA Verbandsmittel, Wetter
Wasserheizbad 1083	GFL, Burgwedel
UV- Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich, Bäch, Schweiz
Sequenzierautomat ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt

Chemikalien und Reagenzien

Agarose Broad Range Art.Nr.T846.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B.Braun Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT 0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
dATP-Lösung 10mM	Sigma, Taufkirchen
dCTP-Lösung 10mM	Sigma, Taufkirchen
dGTP-Lösung 10mM	Sigma, Taufkirchen
dTTP-Lösung 10mM	Sigma, Taufkirchen
10xconc. PCR-Puffer mit MgCl ₂	Roche, Mannheim
MgCl ₂	ABI, Darmstadt
40x TAE-Puffer	193,82 g Tris, 65,62g NaAcetat (Trihydrat), 29,78 g EDTA
1x TAE-Puffer	0,4 M Tris, 0,2 m NaAcetat, 10mM EDTA
Ladungspuffer (loading buffer)	2g Bromphenolblau, 60g Saccharose, 2 mmol EDTA, 36g Harnstoff in 100 ml Aqua bidest. Lösen und autoklavieren

Reagenziensets

QIAmp Viral RNA Mini Spin Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Dye Ex 2.0 Spin Kit	QIAGEN, Hilden
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt

Enzyme

RNase OUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim

Primer

HCV-1b NS4B:

NS4B outer sense: 5'-GTGGGCAGGATCATCTTGTCC-3' (nc 5376-96)
NS4B outer antisense: 5'-GCAGGAGCTTGGACTGGAGC-3' (nc 6311-30)
NS4B inner sense: 5'-CCAGGAGTTTCGATGAGATG-3' (nc 5435-53)
NS4B inner antisense: 5'-CAGTCAACACCGTGCATATCC-3' (nc 6277-97)

HCV-1b NS5A:

NS5A outer sense: 5'-TGG ACT CTT TCG ACC CGC TTC-3' (nc 7087-7107)
NS5A outer antisense: 5'-GTC GCT GAG ATC GGG RTC CCC CGG CTC-3' (nc 7509-7535)
NS5A inner sense: 5'-GGA TGA GAG GGA GGT ATC C-3' (nc 7118-7136)
NS5A inner antisense: 5'-GGT AGA CCA AGA CCC GTC GCT GAG-3' (nc 7527-7550).

Patienten und Patientenserum

Die Nukleotidsequenzen (n = 414) für die Analyse einer Assoziation von RNase L Schnittstellen mit dem Therapieansprechen wurden aus Isolaten von 313 konsekutiven Patienten gewonnen (HCV-1b: n = 263; HCV-3a: n = 50). Von diesen Patienten zeigten 110 ein dauerhaftes virologisches Therapieansprechen (sustained virologic response, SR, negative HCV RNA zu Therapieende und 24 Wochen danach), 62 Patienten zeigten eine end-of-treatment response (ETR, negative HCV

RNA zum Therapieende mit erneut positivem HCV RNA Nachweis innerhalb der folgenden 24 Wochen) und 141 Patienten zeigten ein Therapieversagen (non-response, NR, positive HCV RNA zum Therapieende) auf folgende Therapieregime: pegyliertes Interferon-alfa-2a/b (180µg/Woche oder 0.5-1.5µg/kg/Woche) plus Ribavirin (n = 51); Standard Interferon-alfa-2a/b (n = 80); Standard Interferon-alfa-2a/b plus Ribavirin (n = 182). Die Ribavirindosen waren gewichtsadaptiert, die kumulativen Dosen von Standard Interferon-alfa-2a/b waren 216-1680 MU. Vierundzwanzig Patienten erhielten zusätzlich 200-400mg Amantadin/Tag (56, 85, 113, 114, 116, 117, 146).

Die HCV Genotyp 1b oder 3a Nukleotidsequenzen aus Isolaten vor Behandlungsbeginn für die Untersuchung einer Assoziation von RNase L Schnittstellen mit dem Therapieansprechen entstammen früheren Publikationen der Arbeitsgruppe (56, 85, 113, 114, 116, 117, 146). Die Nukleotidpositionen der Sequenzen innerhalb des HCV Genoms sind in Tabelle 1 angegeben.

Für das HCV p7 standen bei 27 Nonrespondern von den 61 HCV-1b infizierten Patienten Nukleotidsequenzen von Behandlungswoche 24 zur Verfügung zum Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen vor Behandlungsbeginn (85).

Darüber hinaus wurden HCV NS4B und Teile von HCV NS5A bei fünf konsekutiven Patienten mit einer HCV-1b Infektion und Non-response auf Interferon-alfa plus Ribavirin zu zwei verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Therapie sequenziert (vor Behandlungsbeginn, Therapiewoche 24). Diese Patienten erhielten eine Interferon-alfa-basierte antivirale Therapie im Rahmen von klinischen Studien in den Gastroenterologischen Ambulanzen der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg. Alle Patienten unterzeichneten eine schriftliche Einwilligungserklärung vor Studieneinschluss. Die Studien wurde von den Ethikkommissionen in Frankfurt am Main und Homburg / Saar genehmigt und die Studie gemäß der Helsinki-Deklaration aus dem Jahre 1975 durchgeführt. Die Diagnose einer chronischen Hepatitis C wurde aufgrund der erhöhten Transaminasen sowie dem Nachweis von HCV-RNA im Serum innerhalb von mindestens 6 Monaten gesichert. Eine Koinfektion mit dem HBV oder HIV wurde bei allen Patienten serologisch ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden RNase L Schnittstellen zwischen HCV-1b und HCV-3a Genomteilsequenzen verglichen: Für HCV-1b E2CD81 und für HCV-3a wurden hierbei die selben Sequenzen verwandt wie für den Vergleich von Nonrespondern

mit Therapieansprechern (SR+ETR). Die E2PePHD und NS5A Nukleotidsequenzen von HCV-1b wurden gekürzt, um sie den entsprechenden HCV-3a Sequenzen anzupassen (Tab. 3).

Therapiekontrolle

Zur Beurteilung des virologischen Ansprechens wurde ein qualitativer HCV-RNA-Assay (Superquant NGI, Los Angeles, USA oder HCV Amplicor 2.0, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit einer Nachweisgrenze von 30-50 IU/ml verwendet. Die HCV-Genotypisierung erfolgte entsprechend der Klassifikation von Simmonds et al. (127) und wurde mit dem Reverse Hybridisation Assay von der Firma INNO LiPa HCV-II, Innogenetics (Gent, Belgien) durchgeführt.

Versuchsvorbereitung

HCV-RNA-Extraktion

Vor der Verwendung RNA-haltigen Materials zu gentechnologischen Untersuchungen, ist es erforderlich RNA zu isolieren. Die virale RNA des Hepatitis C Virus liegt vor in Umgebung der virusbeinhaltenden Zellen, der Virushülle, dem Nukleokapsid mit Nukleokapsidproteinen, welche interkalierend wirken.

Durch bestimmte Detergentien, die bei der Isolierung verwendet werden, wird die aus Lipiden bestehende Hülle zerstört, dies führt weiterhin zur Destabilisierung des Kapsids bis letztlich die Nukleinsäure frei wird.

Infolge der Entfernung der genannten Strukturen bei der Isolierung wird die RNA anfälliger gegenüber Umwelteinflüssen, die zu einem schnelleren Abbau der RNA führen. Temperaturen über 65°C sowie Änderungen des pH-Werts in den alkalischen Bereich, die zu einer alkalischen Hydrolyse führen, sind hierbei zu nennen.

Hieraus folgt, dass bei den Arbeitsbedingungen auf Reinheit im Sinne von Asepsis, durch Verwendung nukleasefreier Materialien und Reagenzien und auf kontrollierte Temperaturverhältnisse (z.B. Eisbad) zu achten ist, um mögliche Kontaminationen mit RNasen und eine Degradation der RNA zu vermeiden. Weiterhin gilt es, während der Probenaufarbeitung mögliche Hemmsubstanzen - Proteine und genomische DNA

– zu entfernen, zu inaktivieren bzw. auszudünnen, um die Translation der RNA in DNA und die daran anschließenden Amplifikationsreaktionen nicht zu behindern.

Somit dient die RNA-Extraktion der Freisetzung der Ribonukleinsäure, deren Präservierung und der Beseitigung von die weiteren Reaktionen hemmenden Substanzen.

Die RNA-Extraktion bei den hier beschriebenen Experimenten basierte auf der Verwendung von Silikogelmembranen, die in den Zentrifugensäulchen enthalten sind. Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung von Nukleinsäuren durch die Silikogelmembran in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Nachdem die Nukleinsäure an die Siliziumsäule gebunden hat, wird in einem nächsten Arbeitsschritt die gebundene Nukleinsäure mit einem Waschpuffer gewaschen. Dieser Puffer besitzt eine hohe Salzkonzentration und stellt eine alkalische Lösung dar. In diesem alkalischen Milieu liegt die RNA als Polyanion vor, bindet deshalb an die Filtermembran, während andere Proteine die Filtermembran passieren. Die letztendliche Herstellung des Eluats zur weiteren experimentellen Verwendung geschieht durch die Anwendung eines wässrigen Elutionspuffers, der eine geringe Salzkonzentration enthält und eine saure Lösung darstellt und hiermit die gewaschene RNA von der Silikogelmembran eluiert.

RNA-Extraktion und verwendete Kits

Die RNA-Extraktion erfolgte unter Zuhilfenahme des QIAamp Viral RNA Mini Spin Kits der Firma QIAGEN. Der Kit beinhaltet folgende Komponenten:

- Puffer AVL mit Carrier-RNA (Binde - und Lysispuffer)
- Puffer AW 1
- Puffer AW 2
- QIAamp – Säule mit integrierter Silicogel – Membran
- Puffer AVE
- Ethanol 96-100%
- 2ml Auffanggefäße
- 1,5ml Reaktionsgefäße

Die in der Ausgangssubstanz enthaltenen Nukleinsäuren werden durch die Verwendung eines chaotropen Salzes an eine Silikogelmembran gebunden. Die im Lysis- und Bindepuffer enthaltene PolyA als Carriersubstanz dient der verbesserten Gewinnung von Nukleinsäuren aus niedrigkonzentrierten Proben. Der Waschpuffer entfernt Verunreinigungen in der Probe.

Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß der Originalanleitung des QIAamp Viral Mini Spin Kits.

Zunächst wurden 400µl des AVL Puffer mit der Carrier-RNA in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenreaktionsgefäß vorgelegt. Hierzu wurden 100µl des Serums gegeben, anschließend für 15 Sekunden gevortext, dann wurde das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 400µl Ethanol 96-100%ig hinzugefügt, anschließend erneut für 15 Sekunden gevortext, um dann wiederum kurz zentrifugiert zu werden.

Anschließend wurde die Menge des Reaktionsgemisches nacheinander in 2 Portionen auf eine mitgelieferte QIAamp Spin Säule pipettiert, die sich in einem 2ml Sammelgefäß befand, ohne den Rand zu berühren. Die Säulen wurden nun in der Zentrifuge mit 8000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gestellt und anschließend wurden 500µl des mitgelieferten AW1 Waschpuffer hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 8000 U/min über die Dauer von 1 Minute.

Im Anschluss wurde die Säule erneut in ein sauberes Sammelgefäß gestellt, die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen.

Im nächsten Schritt wurden dem Gemisch 500µl des AW2 Waschpuffers hinzugefügt. Es erfolgte eine Zentrifugation über die maximale Umdrehungsgeschwindigkeit von 13000 U/min über 4 Minuten. Danach wurde das Gefäß der Zentrifuge entnommen, die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen und die Reaktionssäule wiederum in ein sauberes Sammelgefäß gestellt. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation mit der vollen Umdrehungsgeschwindigkeit über 1 Minute an. Dieser Schritt war fakultativ und diente der Elimination möglicher Rückstände des AW2 Waschpuffers.

Der letzte Schritt bestand darin, die Reaktionssäule in ein 1,5ml Reaktionsgefäß zu stellen, 30µl des AVE Puffers hinzuzugeben, welcher bei Raumtemperatur equilibriert wurde, 1 Minute bei Raumtemperatur zu inkubieren und anschließend bei 8000

U/min für 1 Minute zu zentrifugieren. Am Ende befand sich in dem 1,5ml Reaktionsgefäß die aus dem Serum isolierte RNA.

Die so gewonnene RNA wurde dann in einem Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in vitro Technik, mit der man Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Abschnitte, welche sich zwischen zwei Genomregionen befinden, deren Nukleotidsequenz bekannt ist, gezielt vermehren (amplifizieren) kann.

Liegt RNA als Ausgangssubstanz vor, so muss diese zuerst durch einen Zwischenschritt – die reverse Transkription – in cDNA umgewandelt werden. Für diesen Reaktionsschritt benötigt man ein spezielles Enzym – die Reverse Transkriptase.

Aus diesem Grund wird die Polymerasekettenreaktion mit RNA als Ausgangssubstanz als RT-PCR bezeichnet.

Funktionsweise der Reversen Transkription

Um die mRNA in cDNA umzuschreiben, benötigt man die Reverse Transkriptase. Diese wiederum benötigt einen Primer in Form eines kurzen Oligonukleotids, der sich an die Poly-A-Gruppe des 3'-Endes der mRNA hängt und somit eine Anheftungsstelle für die Reverse Transkriptase generiert. An dieser 3'-OH-Primergruppe startet die Reverse Transkriptase mit den vier Desoxynukleotidtriphosphaten die cDNA-Synthese.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase der Firma Invitrogen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Reverse Transkriptase mit deletierter RNase H-Funktion, welche die Effizienz der Reversen Transkriptase erhöht. Die RNase H ist eine Endonuklease, die spezifisch RNA-Phosphodiester-Bindungen hydrolisiert, die an DNA hybridisiert sind. Diese Eigenschaft führt zu einem sofortigen Abbau von RNA, sobald ein cDNA-Strang erstellt ist.

In einem extra Schritt wurden zunächst Primer und RNA gut durchmischt und bei 70°C für 10 Minuten inkubiert, um eine Entfaltung der Nukleinsäure und die Anlagerung des Primers zu ermöglichen. Anschließend wurde dieser Reaktionsansatz gekühlt und die übrigen Reagenzien konnten hinzugefügt werden.

Durchführung der Reversen Transkription

Zur Durchführung der Reversen Transkription sind folgende Reagenzien notwendig:

- $MgCl_2$ 25 mM
- dNTP Mix 10mM
- 10x Puffer Taq
- RNase OUT Inhibitor
- Random Hexamere
- SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase
- RNA-Extrakt

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des RT-Mastermix

Mastermix für RT

RT	μ l
MgCl ₂ 25mM	4,75
dNTP Mix 10mM	4
10x Buffer Taq MgCl ₂	2
RNase Out Inh. 40 U	0,5
Superscript II 200 U	0,25
Random Hexamere	0,5
Gesamt	12
RNA-Extrakt/Cup	8
RT-Mix	12
Gesamtvolumen	20

Inkubation bei 37°C über 1h

Der RT-Mastermix wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis aus den einzelnen Reagenzien gemischt. Dann wurde der Mix gleichmäßig auf kleinere, 0,5ml fassende Reaktionsgefäße verteilt. Hier wurde dem Mix der RNA-Extrakt hinzugefügt. Ohne weitere Wartezeit wurde nun über 60 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte bis zur Entnahme aus dem Cycler die Kühlung bei 4°C im Gerät. Nun ist die Transkription der mRNA abgeschlossen, es liegt nun eine cDNA vor.

Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die PCR besteht aus einer sich wiederholenden Abfolge von Zyklen, von dem jeder in drei Schritte unterteilt werden kann.

1.Schritt: Die Denaturierung der DNA

Die DNA wird auf 95°C erhitzt, hierbei findet eine Trennung der beiden DNA-Stränge voneinander statt durch Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen.

2.Schritt: Das Annealing

Annealing bezeichnet die Anlagerung zweier synthetisch hergestellter Primer über die Wasserstoffbrückenbindung an die DNA-Einzelstränge. Die Auswahl der Primer orientiert sich am 5'-bzw. 3'-Ende der Zielstränge, zu denen sie komplementär sind und die zu vermehrende Region begrenzen. Die Hinzugabe der Primer zum Reagens erfolgt im Überschuss, da sich so die komplementären Zielstränge eher mit den Primern als miteinander verbinden. Die Annealingtemperatur liegt zwischen 40°C-60°C und ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer und deren Schmelztemperatur.

3.Schritt: Die Elongation

Die DNA-Polymerase katalysiert die matrixabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges. Als Startpunkte dienen der Polymerase hierbei die Primer.

Bei den Polymerasen handelt es sich um thermostabile Polymerasen, die ursprünglich aus Mikroorganismen gewonnen wurden (z.B. *Thermus aquaticus*), mittlerweile allerdings gentechnisch hergestellt werden können. Musste man anfänglich nach jedem Denaturierungszyklus neue DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz hinzufügen, so entfällt dies mittlerweile durch den Einsatz hitzestabiler Polymerasen, und die PCR kann heute automatisch in sogenannten Cyclern ablaufen.

Man unterscheidet thermostabile Polymerasen hinsichtlich ihrer Hitzestabilität, ihrer Prozessivität, der 5'-3'-Exonucleaseaktivität und der gegebenenfalls vorhandenen 3'-5'-Exonucleaseaktivität, die einer Korrekturaktivität entsprechen und somit eine geringere Fehlerrate ermöglichen.

Die DNA-Polymerase synthetisiert immer in 5'-3'-Richtung, ausgehend vom 3'-Hydroxylende des an die DNA gebundenen Primers. Die Synthese besteht in dem Anbau der vier Nukleotide an die einzelsträngige Matrize, entsprechend der komplementären Basenpaarung, zu einem Doppelstrang. Hierbei liegt die optimale Aktivitätstemperatur der Polymerase bei ca. 70°C.

Die Zyklen werden je nach Bedarf zwischen 25 bis 45 Mal wiederholt. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl amplifizierter Fragmente, eine hundertprozentige Ausbeute vorausgesetzt, so dass eine exponentielle Vermehrung der DNA erreicht wird. Allerdings ist dies limitiert durch die abnehmende Aktivität des Enzyms, die durch die Hitze im Laufe der Reaktion abnimmt. Desweiteren ist bei einem Überschuss der Ziel-DNA der relative Mangel an Enzym ein weiterer limitierender Faktor. Zuletzt findet mit zunehmender Reaktionsdauer und Zyklenzahl eine Hybridisierung der DNA-Stränge statt, die die Effektivität der Vervielfältigung mindert. Die gesamte Reaktion erfolgt in einem PCR-Automaten, auch Cycler genannt, der präzise Reaktionsbedingungen hinsichtlich der gewünschten Temperaturen und der Zeitintervalle ermöglicht.

Eine weitere Spezialisierung der PCR stellt die „nested“-PCR dar. Hierbei wird die Spezifität und auch die Sensitivität der Reaktion erhöht, durch zwei ineinander verschachtelte Polymerasekettenreaktionen. Diese zwei Reaktionen laufen nacheinander ab, das Produkt der ersten Reaktion wird in die zweite Reaktion eingesetzt. Die Primer der zweiten Reaktion binden innerhalb des Fragments der ersten Reaktion, kommen also zwischen den Primern der ersten Reaktion zu liegen. Hierbei werden bei der zweiten Reaktion falsche Amplifikate der ersten Reaktion ausgesondert. Dieses Vorgehen wurde in dieser Arbeit durchgeführt.

Um die Effektivität der PCR zu kontrollieren und um möglich Kontaminationen zu erkennen, wurden bei jedem Versuch eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitbearbeitet.

Durchführung der PCR

Der Reaktionsansatz der PCR besteht aus folgenden Reagenzien:

- 10 x konzentrierter PCR-Reaktions-Puffer mit MgCl_2 -100mM Tris-HCl, 15mM MgCl_2 , 500mM KCl, pH 8,3 (bei 20°C)

Das Aktivitätsmaximum der DNA-Polymerase liegt bei einem pH-Wert oberhalb von 8, deshalb wird zur Pufferung ein Tris-Puffer verwendet.

Als Kofaktoren für die PCR werden verschiedene Salze verwendet, Kaliumchlorid steigert die Ausbeute der PCR.

Magnesiumionen beeinflussen die Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge, Trennung der Stränge bei der Denaturierung, Produktspezifität, Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate.

Darüber hinaus bilden Magnesiumionen zusammen mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, der für den Nukleotideinbau ausschlaggebend ist, zusätzlich stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die Denaturierungstemperatur des Doppelstranges als auch der Bindung zwischen Primer und Matrize.

- Sense – Primer 10 μM
- Antisense – Primer 10 μM
- dNTP Mix 10mM – Nukleotide (A,C,G,T)
- steriles Wasser
- Taq – DNA Polymerase (5U/l) – hochprozessives Enzym ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Optimale Elongationstemperatur liegt bei 72°C.
- DMSO – Dimethylsulfoxid als PCR – Beschleuniger

Tabelle 3.2: Protokoll PCR I und II

PCR I

Reagenzien	Menge(µl)
10xBuffer 15mM	
MgCl ₂	4
"Outer"-Sense Primer	0,5
"Outer"-Antisense Primer	0,5
dNTP-Mix 10mM	1
DMPC-Aqua	20,7
Taq-Polymerase	0,3
DMSO	1
RT-Produkt	20

PCR II

Reagenzien	Menge(µl)
10xBuffer 15mM	
MgCl ₂	5
"Inner"-Sense Primer	0,5
"Inner"-Antisense Primer	0,5
dNTP-Mix 10mM	2
DMPC-Aqua	39,7
Taq-Polymerase	0,3
DMSO	1
Amplikon PCR I	2

Cycler-Programm

Schritt	Temp.	Zeit
		2
Denaturierung	95°C	min 60 45
Denaturierung	95°C	sec 1 25
Annealing	45°C	min 1 45
Extension	72°C	min 10
Extension	72°C	min
Abbruch	4°C	∞

Cycler-Programm

Schritt	Temp.	Zeit
Denaturierung	95°C	2 min 60 45
Denaturierung	95°C	sec 1 45
Annealing	45°C	1 min 45
Extension	72°C	1 min 10
Extension	72°C	min
Abbruch	4°C	∞

Agarosegel-Elektrophorese

Das Reaktionsergebnis der PCR besteht aus DNA-Fragmenten für die Reaktion spezifischer Länge und Sequenz. Färbt man diese Reaktionsprodukte nun mit einem fluoreszierenden Farbstoff an und legt eine elektrische Spannung an ein Agarosegel an, welches sich innerhalb einer Elektrophorese-Kammer befindet, so werden die DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Aufgrund der negativen Phosphatgruppen wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Die Wanderungsgeschwindigkeit

hängt von Faktoren wie der Molekülgröße, dem verwendeten Puffer, der angelegten Spannung und der Konzentration des Agarosegels ab. Abhängig von der Anzahl ihrer Basenpaare – und somit von ihrer Länge - wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld unterschiedlich schnell. Je nachdem welche durchschnittliche Länge man erwartet, werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen gewählt.

Um die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen, färbt man diese mit Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$) an. Dies kann man auch erreichen, indem man bei der Herstellung des Agarosegels bereits die erforderliche Menge Ethidiumbromids hinzugibt und das Gel anschließend aushärten lässt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basen der Doppelhelix an. Dies wird durch seine ebene Struktur begünstigt. Unter UV-Beleuchtung zeigt dieser Komplex seine typische orangefarbene Fluoreszenz. Die Nachweisgrenze für DNA liegt mit diesem Verfahren bei 2-4ng.

Durchführung der Elektrophorese

In dieser Arbeit wurden je 5µl des PCR-Produktes auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

Für das Agarosegel und als Füllmedium der Elektrophoresekammer wurde 1xTAE-Puffer verwendet. Die Zusammensetzung des Einfach(1x)-TAE-Puffers bestand aus folgenden Reagenzien: 0,4 M Tris, 0,2 M NaAcetat, 10 mM EDTA. Der Puffer wurde als 40fach-konzentrierte Vorratslösung zubereitet. Die Zusammensetzung des 40x-TAE-Puffers war: 193,82 g Tris, 65,62 g NaAcetat, 29,78g EDTA. Die einzelnen Reagenzien wurden eingewogen und in 800ml Wasser unter ständigem Rühren aufgelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (Eisessig, 100%) auf 8,3 eingestellt. Zur Verdünnung auf die einfache Konzentration wurden 25 ml 40x TAE auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt.

2 g Agarose Broad Range (Firma Carl Roth, Karlsruhe) wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer eingerührt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Anschließend wurden 1,5µl Ethidiumbromid hinzugefügt, die Lösung wurde dann auf einen Elektrophorese-Schlitten mit einem Kamm blasenfrei gegossen. Nach dem Erstarren des Gels unter Abluft wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt.

Nun wurden 5µl des PCR-Produktes mit ca. 1µl Ladungspuffer (Bromphenolblau, Glycerin, EDTA-Puffer) vermischt. Hierbei erfüllt der Ladungspuffer zwei Aufgaben: 1) aufgrund des hohen Glycerin-Anteils kommt es zum Absinken der Proben auf den Boden der Geltaschen, ein Abdiffundieren in den umgebenden Puffer wird verhindert; 2) durch die Färbung mit Bromphenolblau wird die Front der Elektrophorese optisch sichtbar gemacht.

Die mit dem Ladungspuffer versetzten DNA-PCR-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Gleichzeitig wurde in die äußere freie Tasche ein standardisierter Größenmarker und in weitere freie Taschen eine Positiv-Kontrolle und eine Negativ-Kontrolle aufgetragen.

Anschließend wurde eine elektrische Stromquelle mit einer Spannung von 120V und einer Stromstärke von 400mA über eine Stunde angelegt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden unter UV-Licht aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids deutlich sichtbar und konnten abfotografiert werden.

Abb. 3.1: Agarosegel der HCV NS4B-Region

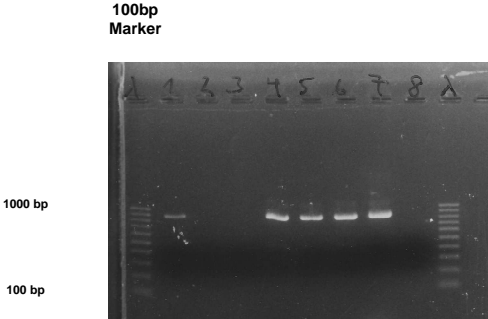
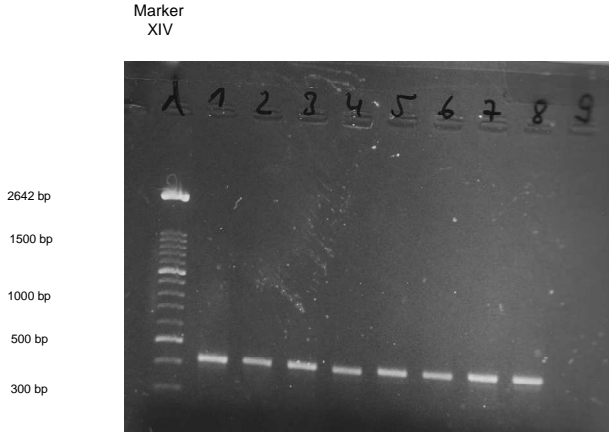


Abb.3.2: Agarosegel der HCV NS5A-Region



Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR erfolgt die Reinigung der DNA-Moleküle von den Resten des Reaktionsansatzes (dNTPs, Enzyme, Salze, Primer und DMSO). Hierbei wurde in dieser Arbeit der QIAquick PCR Purification Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Ähnlich wie bei der RNA-Isolierung aus dem Serum wurden auch hier die DNA-Moleküle in Anwesenheit eines chaotropen Salzes in hoher Konzentration an eine im Reaktionssäulchen integrierte Silicogelmembran gebunden. Auch hier ist die DNA-Adsorption an die Siliziumverbindung stark vom pH-Wert des Bindepuffers (Puffer PB) abhängig. Bei einem pH $\leq 7,5$ erreicht die Adsorption normalerweise 95%. In diesem Schritt wurden 45 μ l des PCR-Produktes mit der fünffachen Menge (225 μ l) an PB-Puffer im Zentrifugensäulchen versetzt, anschließend gut gevortext. Nach dem vortexen wurde die Säule in eine Zentrifuge gestellt und mit 13.000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der durch das Zentrifugieren entstandene Durchfluss wurde verworfen.

Dann wurde das Säulchen aus der Zentrifuge entnommen und mit 750 μ l eines ethanolhaltigen Puffers (PE-Puffer) versetzt, anschließend erneut mit 13.000rpm zentrifugiert. Mit Hilfe des ethanolhaltigen Puffers (Waschpuffer) konnten unerwünschte Verunreinigungen die Membran passieren und wurden auf diesem Wege aus der Lösung entfernt. Das Eluat dieses Vorganges wurde ebenfalls verworfen. Nun wurde das Säulchen erneut zentrifugiert, um die letzten Überreste Ethanols aus der Lösung zu entfernen. Dann wurde das Säulchen in ein neues Cup aufgesetzt. Jetzt wurde mittels eines alkalischen Puffers (Puffer EB: 10mM TrisCl, pH 8,5) die gereinigte DNA wieder eluiert, indem man 30 μ l des EB-Puffers auf die Mitte der Membran pipettierte, eine Minute lang inkubierte und letztlich erneut für eine Minute bei 13.000rpm zentrifugierte.

Das Eluat mit aufgereinigter DNA konnte nun direkt zur Sequenzierung benutzt, oder über mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Sequenz-PCR und DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist die genaue Bestimmung der Nukleotid-Abfolge eines Nukleinsäurestranges. Frederik Sanger hat diese Methode 1975 entwickelt, sie wird auch „Kettenabbruchsynthese“ genannt (110) [85]. Hierbei entspricht das Prinzip dem

der DNA-Amplifikation durch PCR und wird mit den den sequenzierenden DNA-Abschnitt einschließenden Primern durchgeführt. Dem Nukleotidgemisch, bestehend aus den Desoxynukleotidtriphosphaten mit den Basen Adenin, Cytosin, Guanosin und Thymidin werden noch vier Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) hinzugefügt, die am 3'-Ende keine Hydroxylgruppe besitzen. Die DNA-Polymerase akzeptiert sowohl die dNTPs als auch die ddNTPs als Substrate. Wird allerdings ein ddNTP zur Kettenverlängerung verwendet, so kommt es zum vorzeitigen Abbruch des synthetisierten Stranges, da bei fehlender 3'-OH⁻-Gruppe kein weiteres Nukleotid eingefügt werden kann. Daraus resultiert ein Gemisch aus synthetisierten DNA-Strängen unterschiedlicher Länge, die jeweils an einem A, einem T, einem C oder einem G enden. Anfänglich wurden vier Ansätze mit je unterschiedlicher Base als Didesoxynukleotid durchgeführt. Anschließend wurde jeder Ansatz mittels Gelelektrophorese getrennt. Seit Anfang der neunziger Jahre wird jedes ddNTP mit einem eigenen spezifischen Farbstoff markiert, wodurch nun alle vier ddNTPs einem einzigen PCR-Ansatz zugefügt werden können. Die unterschiedlich langen DNA-Moleküle können mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Hierbei reflektiert die Wanderdistanz die Reihenfolge der durch die vier ddNTPs unterschiedlich terminierten DNA-Sequenzen. Zu beachten ist, dass mit zunehmender Länge der DNA-Fragmente die Ausbeute an PCR-Produkten und somit die Signalintensität abnimmt, so dass ab einer bestimmten Länge die reproduzierte Menge für die Auswertung nicht mehr ausreicht.

Früher war das Ablesen der DNA-Sequenziergele eine mühsame Angelegenheit. Heute wird dies durch moderne Sequenziergeräte erleichtert, die die DNA-Sequenzen als ein farbkodiertes Wellenmuster liefern, wobei jeder Peak einem ddNTP am Ende eines Stranges entspricht, welches durch sein Absorptionsmaximum identifiziert werden kann.

In dieser Arbeit wurden Sequenzierungen mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Dieses Gerät besitzt 2x8 gelgefüllte Kapillaren, die in zwei Kolonnen angeordnet sind. Die aufgereinigte PCR-Lösung wird kolonnenweise in eine 96-Loch-Platte pipettiert, anschließend mit einer Gummidecke verschlossen und im Gerät platziert. Die Kapillaren, welche aus einem Isolatormaterial bestehen, werden mit dem einen Ende in die PCR-Lösung eingetaucht, das andere endet in einem Puffersystem. Anschließend wird eine elektrische Spannung angelegt und die DNA-Fragmente wandern in das Gel ein. In

einer Detektionskammer kann mit einem Laser-Fotospektrometer die Absorption der sich vorbeibewegenden DNA-Moleküle gemessen werden. Für jedes Nukleotid-Analogon wird eine spezifische Wellenlänge gemessen, die seinem Absorptionsmaximum entspricht. Kürzere Fragmente wandern im Gel schneller als Längere, sodass die Basen aufsteigend in der Reihenfolge ihrer Position geordnet werden. Als Gel wurde das Applied Biosystems 3100 Pop-6 verwendet.

Durchführung der Sequenz-PCR

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, benötigt man ausreichend markierte DNA-Moleküle. Um dies zu gewährleisten, wird die Sequenz-PCR durchgeführt. Wie bei der normalen PCR zur Amplifikation der DNA-Substanz, läuft auch die Sequenz-PCR in drei Teilschritten ab, die sich entsprechend der Anzahl der Zyklen wiederholen.

Die Sequenz-PCRs wurden mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Dieser Kit enthält bereits fertig gemischte PCR-Ansätze mit vier unterschiedlich markierten Terminator-Dyes. Diesem Ansatz wurden dann noch aufgereinigte DNA und die Primer der letzten PCR, die den zu sequenzierenden Abschnitt begrenzen, hinzugefügt.

Tabelle 3.3: Sequenz-PCR Protokoll

Sequenz-PCR

PCR sense	Menge (µl)	PCR antisense	Menge (µl)
Seq. Kit	4	Seq. Kit	4
Sense-Primer	0,5	Antisense-Primer	0,5
Aqua	9,5	Aqua	9,5
Gesamt	14	Gesamt	14

In jedes Mikroreaktionsgefäß wurden noch je 6µl des aufgereinigten PCR-Produktes hinzugegeben und wiederum durch mehrmaliges auf – und abpipettieren gut vermischt.

Anschließend lief im Thermocycler folgendes Programm ab:

Tabelle 3.4: Cycler-Programm für Sequenz-PCR

Cycler-Programm für Sequenz-PCR

Schritt	Temp.	Zeit	
Denaturierung	96°C	2 min	
Denaturierung	96°C	10 sec	30 Zyklen
Annealing	50°C	15 sec	30 Zyklen
Extension	60°C	4 min	30 Zyklen
Extension	72°C	10 min	

Anschließend Kühlung bei 4°C

Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte, Prinzip der Gelsäulenfiltration

Im Anschluss an die durchgeführte Sequenz-PCR müssen die nicht eingebauten Terminator-Dyes aus der Lösung entfernt werden, bevor das Reaktionsprodukt zur Kapillarelektrophorese in das Sequenziergerät eingebracht wird.

Zu diesem Zweck wird die Gelsäulenfiltration durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Lösung durch Zentrifugation durch eine spezielle Gelmatrix mit Poren gepresst wird, wobei die langen DNA-Fragmente das Gel passieren können, während die kurzen Moleküle im Gel gebunden werden.

Somit entspricht bereit das erste Eluat dem aufgereinigten Produkt.

Durchführung der Gelsäulenfiltration

Zur Durchführung der Gelsäulenfiltration wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Zu Beginn des Verfahrens ist es notwendig, die Gelsäule vor Gebrauch durch vortexen zu homogenisieren. Anschließend wurde die Säule dem Protokoll entsprechend für 3 Minuten bei 2700rpm zentrifugiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule auf ein frisches Cup aufgesetzt. Dann wurde das PCR-Produkt vorsichtig auf die Säule aufgebracht, ohne dieselbe zu berühren. Nun

wurde die Säule ein weiteres Mal für 3 Minuten bei 2700rpm zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Eluat konnte nun direkt zur Sequenzierung verwendet werden.

Sekundärstrukturprädiktion

Die Sekundärstrukturprädiktion wurde in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken durchgeführt. MFOLD (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) wurde zur Prädiktion suboptimaler RNA-Sekundärstrukturen von Nukleotidsequenzen zweier Referenz-Stränge angewandt, HCV-J (Genotyp 1b, (64)) und HCV-K3a (Genotyp 3a, (150)). Es wurden sechs HCV-J Gene (E2, p7, NS3, NS4B, NS5A, NS5B, beispielhaft werden die Prädiktionen für HCV-1b NS4B und NS5A in Abb. 2.3 und 2.4 dargestellt) und zwei HCV-K3a Gene (E2, NS5A) untersucht. Die thermodynamisch relevantesten Faltungen wurden weitergehend analysiert. Um die Beständigkeit der Strukturmodelle zu untersuchen, wurden Energie-Plots von jeder RNA-Sekundärstrukturprädiktion angefertigt. Aufgrund einer Obergrenze von 6000 Nukleotiden pro Datenverarbeitung, konnte eine Prädiktion der RNA Sekundärstruktur nicht für die gesamte HCV Sequenz durchgeführt werden. Somit wurden bei Untersuchungen der gesamten HCV Sequenz neben dem Auszählen der gesamten Anzahl der Schnittstellen, die Auswirkungen der die Schnittstellen benachbarten Nukleotide nicht aber die Sekundärstruktur untersucht.

Abb. 3.3: Sekundärstrukturprädiktion der RNA des HCV-1b NS5A Gens

Output of sir_graph
by D. Stewart and M. Zuker

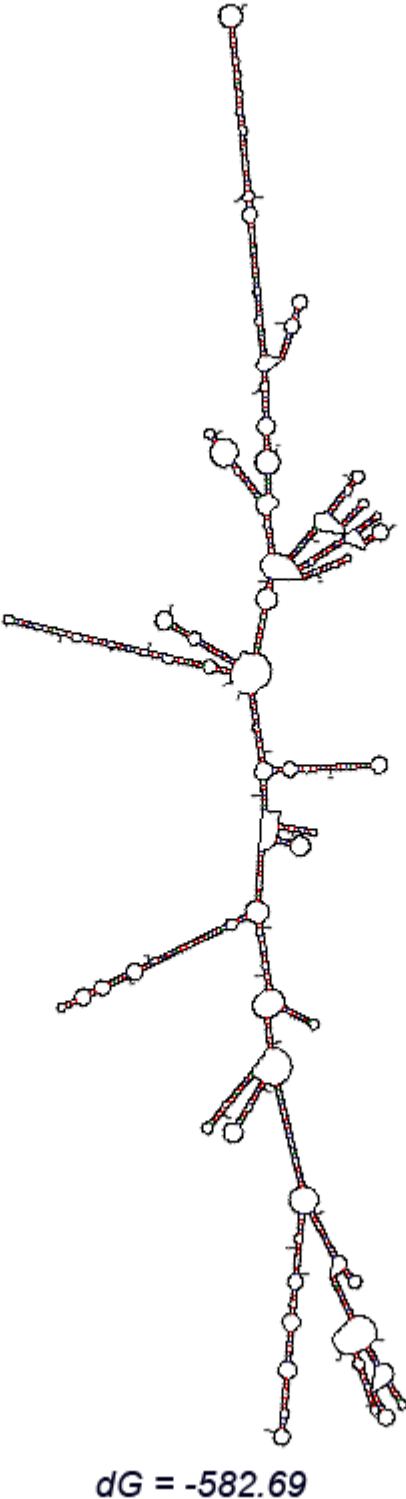
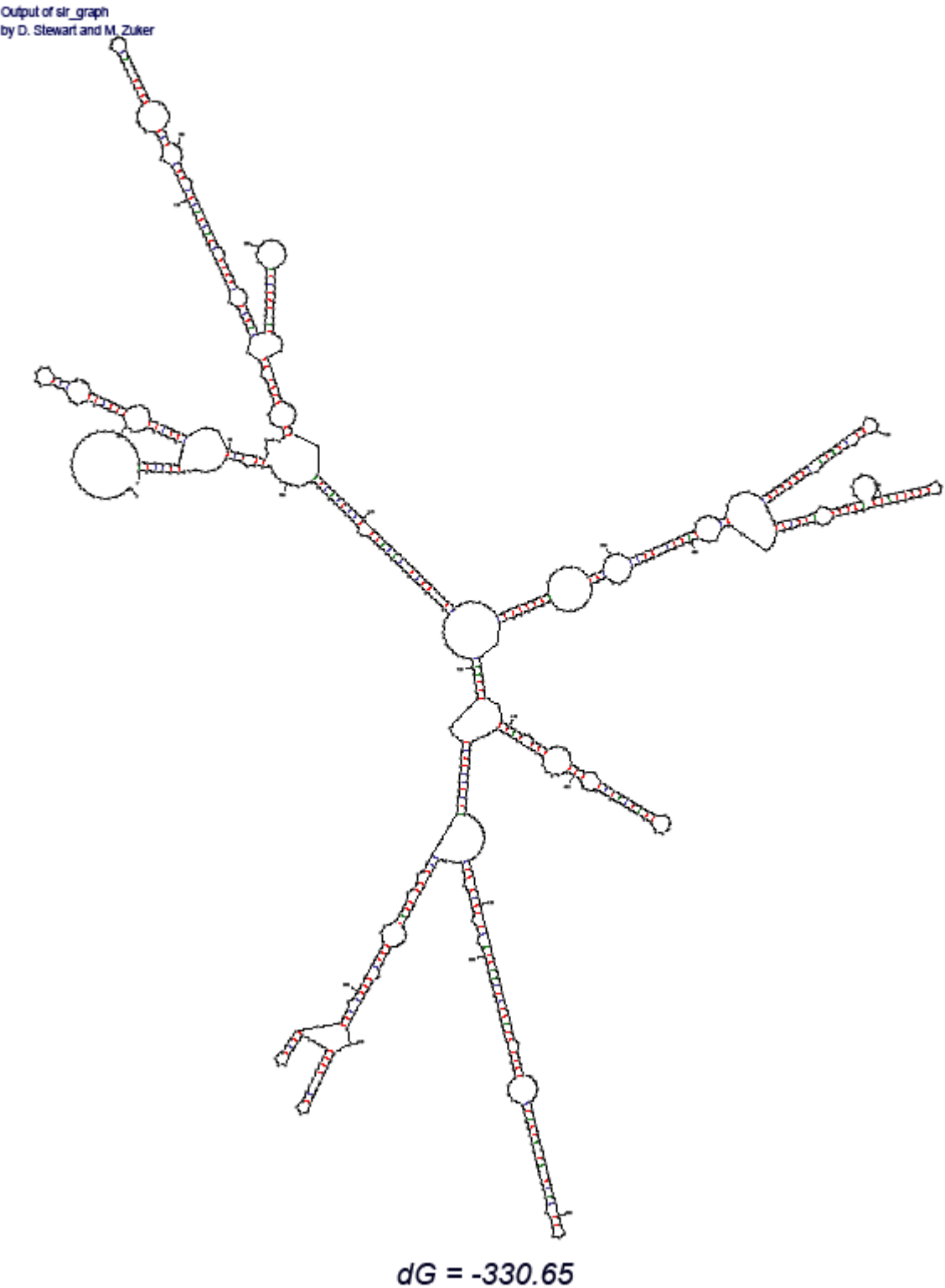


Abb. 3.4: Sekundärstrukturprädiktion der RNA des HCV-1b NS4B Gens



Qualitative Sequenz-Analyse

Die durch die Sequenzierung gewonnenen Sequenzen wurden nun in das OMIGA-Auswertungsprogramm eingelesen, um sie der weitergehenden Analyse zugänglich zu machen. Die Anzahl an RNase-L-Schnittstellen (UU+UA) wurde mittels MATLAB[®] 6.5 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) gezählt. Für die Analyse der einzelsträngigen RNA Abschnitte wurden alle Abschnitte nach UU und UA Dinukleotiden durchsucht, die aus mindestens zwei benachbarten einzelsträngigen Nukleotiden bestanden.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels nichtparametrischer Test (Mann-Whitney-, Kruskal-Willis- und Wilcoxon-Test) unter Verwendung des SPSS-Programms. Es wurde die Bonferroni Korrektur angewandt, d.h. alle p-Werte wurden mit der Anzahl der durchgeführten Tests multipliziert. Alle angegebenen p-Werte sind Werte nach Durchführung der Bonferroni Korrektur. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Assoziation von RNase L Schnittstellen mit dem Therapieansprechen bei Patienten mit einer HCV-1b oder -3a Infektion

4.1.1 Vergleich von RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen vor Behandlungsbeginn zwischen Patienten mit und ohne virologisches Ansprechen (SR+ETR versus NR) auf eine Interferon-alfa basierte Therapie

Innerhalb eines gegebenen HCV Genotyps (HCV-1b oder HCV-3a) fand sich weder innerhalb der kompletten Sequenzen der untersuchten Regionen noch in der entsprechenden Analyse vorhergesagter einzelsträngiger RNA Abschnitte eine Assoziation der Anzahl von RNase L Schnittstellen mit dem virologischen Therapieansprechen (Tabelle 4.1.1 A und B, Abb. 4.1.1A und B).

4.1.2 Vergleich der Anzahl von RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen vor Behandlungsbeginn mit der Anzahl von RNase L Schnittstellen in Nukleotidsequenzen unter Therapie bei Patienten mit fehlendem virologischen Ansprechen (NR, Nonrespondern) auf eine Interferon-alfa basierte Therapie

Bei HCV-1b infizierten Nonrespondern auf eine Interferon-alfa basierte Therapie wurde die Anzahl von RNase L Schnittstellen in strukturellen (p7) und nicht-strukturellen (NS4B, Teile von NS5A inklusive der variablen (V)3 Region) HCV Genen zu zwei Zeitpunkten verglichen. Dabei wurden Sequenzen aus Isolaten vor Behandlungsbeginn mit solchen zu Therapiewoche 24 verglichen. Der Vergleich der Anzahl der UU+UA Dinukleotide ergab jedoch weder bei der Analyse der kompletten Sequenzen noch bei der Analyse der vorhergesagten einzelsträngigen HCV RNA Abschnitte einen Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten (Tabelle 4.1.2, Abb. 4.1.2).

Tabelle 4.1.1. Assoziation des Therapieansprechens mit RNase L Schnittstellen pro Sequenz aus Isolaten vor Behandlungsbeginn bei Patienten mit NR versus SR+ETR

A) HCV Genotype 1b		Komplette Sequenz		Einzelstrang-RNA Sequenz	
		UU+UA / Sequenz		UU+UA / Sequenz	
		Median (Range)	p-Wert	Median (Range)	p-Wert
1b-E2CD81 (nc 1713-2018)	NR (n=19)	22 (17-29)	>0.200	5 (2-8)	>0.200
	SR+ETR (n=19)	21 (19-28)		4 (3-8)	
1b-E2PePHD (nc 2182-2567)	NR (n=19)	35 (27-41)	>0.200	16 (13-20)	>0.200
	SR+ETR (n=22)	34.50 (28-43)		14.50 (12-19)	
1b-p7 (nc 2568-2756)	NR (n=27)	17 (12-21)	>0.200	9 (5-11)	0.126
	SR+ETR (n=34)	17 (13-24)		10 (6-14)	
1b-NS3* (nc 3657-5165)	NR (n=11)	112 (100-125)	>0.200	42 (37-45)	>0.200
	SR+ETR (n=15)	112 (101-122)		43 (34-50)	
1b-NS4B (nc 5463-6245)	NR (n=15)	49 (43-57)	>0.200	25 (21-29)	>0.200
	SR+ETR (n=27)	49 (43-62)		25 (20-30)	
1b-NS5A (nc 6246-7586)	NR (n=23)	78 (71-89)	>0.200	29 (24-36)	>0.200
	SR+ETR (n=21)	80 (73-88)		29 (25-34)	
1b-NS5B* (nc 8949-9002)	NR (n=11)	7 (4-7)	>0.200	1 (0-1)	>0.200
	SR+ETR (n=15)	7 (5-8)		1 (0-1)	

B) HCV Genotyp 3a		Komplette Sequenz		Einzelstrang-RNA Sequenz	
		UU+UA / Sequenz		UU+UA / Sequenz	
		Median (Range)	p-Wert	Median (Range)	p-Wert
3 ^o E2CD81 (nc 1723-2031)	NR (n= 5)	24 (20-27)	>0.200	12 (10-15)	>0.200
	SR+ETR (n= 12)	23.50 (19-26)		11.50 (10-15)	
3 ^o E2PePHD (nc 2251-2451)	NR (n= 11)	19 (17-23)	>0.200	11 (9-13)	0.081
	SR+ETR (n= 22)	19 (15-22)		10 (8-11)	
3a-NS5A (nc 6769-7239)	NR (n= 11)	37 (34-42)	>0.200	12 (10-17)	>0.200
	SR+ETR (n= 22)	35.50 (31-46)		12.50 (10-15)	

nc Nukleotid(e); Sequenzen für die Analysen wurden verwendet von (56, 85, 113, 114, 116, 117, 146), * Für die Analyse der einzelsträngigen RNA wurden 3 Patienten ausgeschlossen, da der HCV Genotyp 1 Subtyp nicht eindeutig festgestellt werden konnte und somit für diese Patienten eine RNA Sekundärstrukturprädiktion auf der Basis eines HCV-1b Subtyps ungenau sein könnte. Nc Nummerierung erfolgt entsprechend HCV-J (Genotyp 1b, (64)) und HCV-K3a (Genotyp 3a, (150)). Eine der veröffentlichten 45 Sequenzen von NS5A wurde nicht in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen aufgrund einer Längenabweichung wegen Insertionen (114)].

Abb. 4.1.1

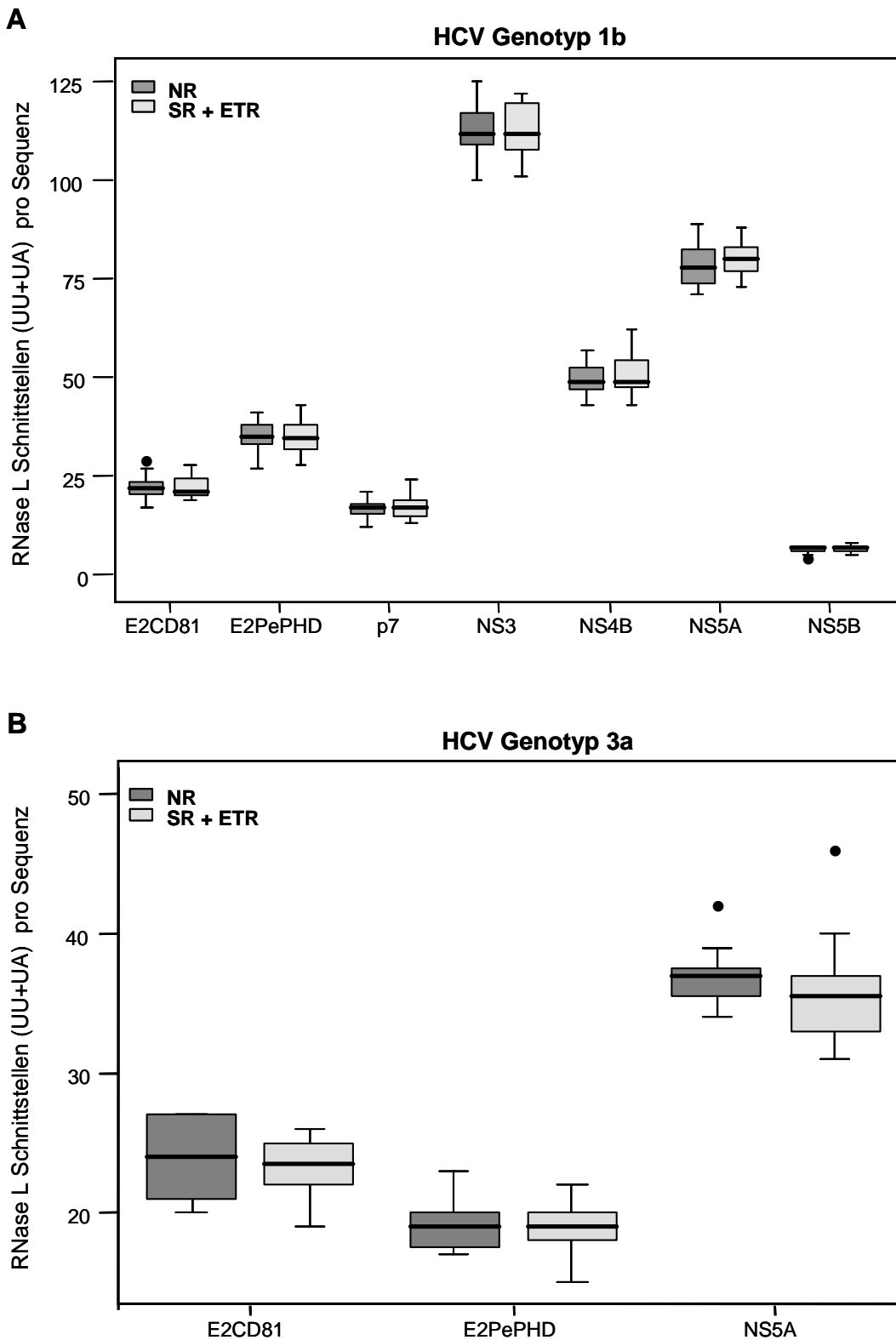


Abb.4.1.1: Vergleich der Anzahl an RNase L Schnittstellen pro Sequenz in Isolaten vor Therapiebeginn von Nonrespondern (NR) und Respondern (SR+ETR) auf eine Interferon-alfa-basierte Therapie Median (-), 25. bis 75. Perzentile (schattierte Kästchen) und Spanne der Anzahl der RNase L Schnittstellen innerhalb der untersuchten Nukleotidsequenzen, dargestellt durch Boxplot-Graphen. NR: HCV-RNA positiv am Behandlungsende, SR+ETR: HCV RNA negativ am Behandlungsende. **A)** HCV-1b, **B)** HCV-3a

Tabelle 4.1.2. Vergleich der RNase L Schnittstellen pro Sequenz vor und während einer Therapie bei Patienten mit fehlendem virologischen Ansprechen auf eine Interferon-alfa basierte antivirale Therapie und HCV Genotyp 1b Infektion

		komplette Sequenz		Einzelstrang-RNA Sequenz	
		UU+UA / Sequenz		UU+UA / Sequenz	
		Median (Range)	p-Wert	Median (Range)	p-Wert
1b-p7 (nc 2568-2756)	TW0 (n=27)	17 (12-21)	>0.200	5 (2-8)	>0.200
	TW24 (n=27)	17 (13-21)		4 (2-4)	
1b-NS4B (nc 5463-6245)	TW0 (n=5)	48 (42-58)	>0.200	24 (23-25)	>0.200
	TW24 (n=5)	50 (38-61)		24 (20-26)	
1b-NS5A (nc 7239-7478)	TW0 (n=5)	12 (11-17)	>0.200	3 (2-4)	>0.200
	TW24 (n=5)	12 (11-18)		3 (2-3)	

nc Nukleotide, TW0 vor Behandlungsbeginn, TW24 Therapiewoche 24

Abb.4.1.2

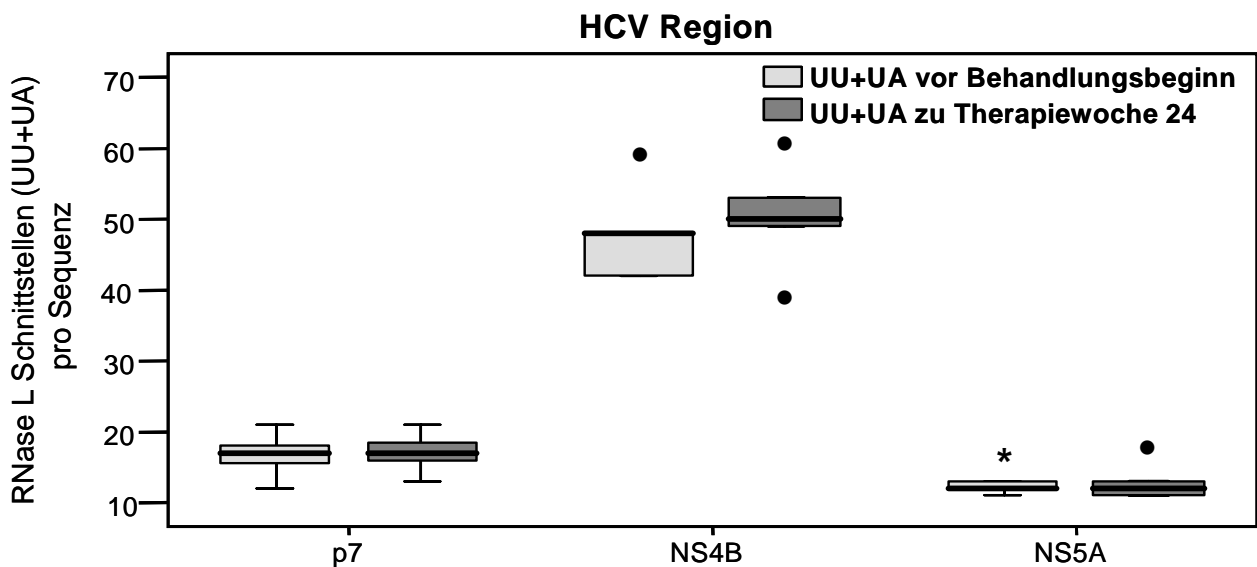


Abb 4.1.2: Vergleich der RNase L Schnittstellen in Isolaten von HCV-1b infizierten Nonrespondern (NR) vor und während einer Interferon-alfa-basierten antiviralen Therapie. Median (-), 25. bis 75. Perzentile (schattierte Kästchen) und Spanne der Anzahl der RNase L Schnittstellen innerhalb der untersuchten Nukleotidsequenzen von HCV p7, NS4B und NS5A dargestellt durch Boxplot-Graphen. HCV p7 Nukleotid Sequenzen für Analysen wurden entnommen aus (85).

4.2 Assoziation der Anzahl der RNase L Schnittstellen mit dem HCV Genotyp

Teile der für E2 (E2CD81, E2PePHD) und NS5A kodierenden Gene wurden untersucht hinsichtlich einer Assoziation der RNase L Schnittstellen mit dem HCV Genotyp (HCV-1b versus HCV-3a, Tabelle 3.2, Abb. 3.2). Im Bereich der E2PePHD und NS5A Region fanden sich in den Nukleotidsequenzen der HCV-3a Isolate signifikant mehr RNase L Schnittstellen als in den Nukleotidsequenzen der HCV-1b infizierten Patienten, sowohl innerhalb der kompletten Sequenz als auch innerhalb der vorhergesagten einzelsträngigen RNA-Regionen. Für E2CD81 konnte ebenfalls eine größere Anzahl an RNase L Schnittstellen in HCV-3a Isolaten im Vergleich zu HCV-1b Isolaten beobachtet werden. Allerdings zeigte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz, sofern die komplette Sequenz analysiert wurde – wurde aber hochsignifikant, betrachtete man ausschließlich die vorhergesagten einzelsträngigen RNA-Regionen.

Abb. 4.2

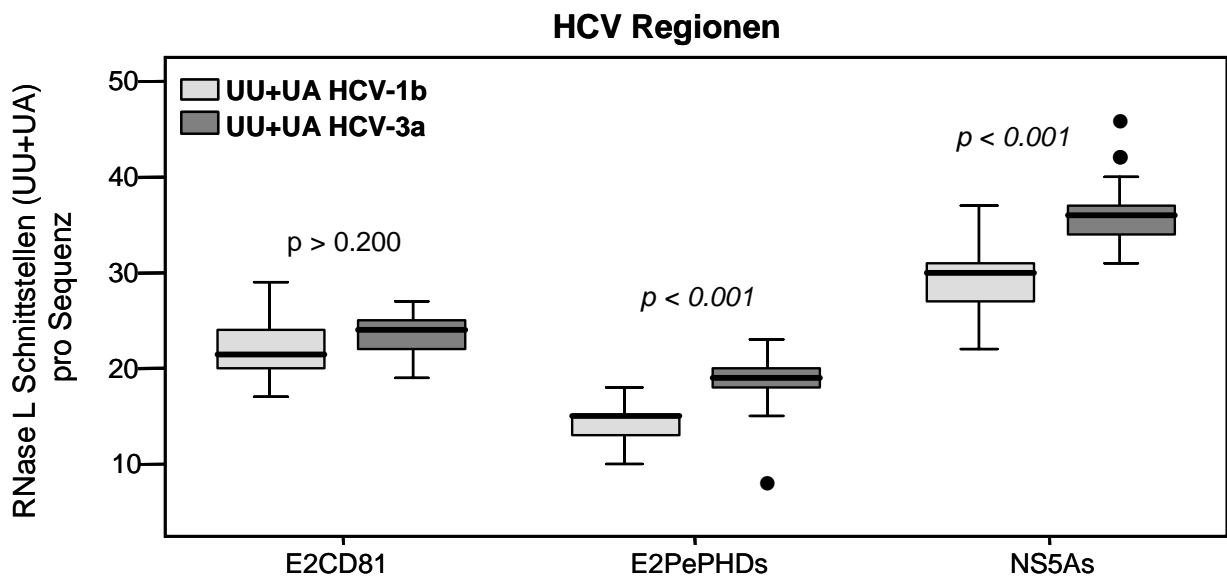


Abb.4.2: Assoziation der Anzahl der RNase L Schnittstellen pro Sequenz mit dem Genotyp. Median (-), 25. bis 75. Perzentile (schattierte Kästchen) und Spanne der Anzahl der RNase L Schnittstellen innerhalb der untersuchten Nukleotidsequenzen von HCV E2CD81, E2PePHD und NS5A der Patienten mit HCV-1b im Vergleich zu HCV-3a Infektion, dargestellt durch Boxplot-Graphen.

Da die Länge der E2CD81 Nukleotidsequenz zwischen HCV Genotyp 1b (306nc) und 3a (309nc) differiert, wurde in einer zusätzlichen Analyse die Anzahl der RNase L Schnittstellen pro Nukleotid berechnet und zwischen beiden Genotypen verglichen (komplette Sequenz: UU+UA: $p > 0.200$; „erwartete Schnittstellenhäufigkeit pro Sequenz“: $p > 0.200$; Einzelstrang-RNA: UU+UA: $p < 0.001$). Interessanterweise hatten HCV-3a Isolate durchweg mehr Einzelstrang-RNA Nukleotide pro Sequenz als HCV-1b Isolate: E2CD81: HCV-1b 70/306nc, HCV-3a 112/309nc; E2PePHD: HCV-1b 54/201nc, HCV-3a 68/201nc und NS5A: HCV-1b 146/471nc, HCV-3a 162/471nc.

Tabelle 4.2. Assoziation der Anzahl der RNase L Schnittstelle mit dem HCV Genotyp

	komplette Sequenz		Einzelstrang-RNA Sequenz	
	UU+UA / Sequenz		UU+UA / Sequenz	
	Median (Range)	p-Wert	Median (Range)	p-Wert
1b- E2CD81 (n=38) (nc 1713-2018)	21.5 (17-29)	> 0.200	4.5 (2-8)	< 0.001
3a- E2CD81 (n=17) (nc 1723-2031)	24 (19-27)		12 (10-15)	
1b- E2PePHDs (n=41) (nc 2223-2423)	15 (8-18)	< 0.001	4 (3-6)	< 0.001
3a- E2PePHD (n=33) (nc 2251-2451)	19 (15-23)		10 (8-13)	
1b-NS5As (n=44) (nc 6741-7211)	30 (22-37)	< 0.001	11 (7-15)	0.041
3a-NS5A (n=33) (nc 6769-7239)	36 (31-46)		12 (10-17)	

nc Nukleotide, NR HCVRNA positiv am Ende der Behandlung, SR+ETR HCV RNA negativ am Ende der Behandlung, PePHD/eIF2 α phosphorylation homology domain. Sequenzen für die Analysen wurden verwendet von (56, 113, 114, 116), Nc Nummerierung erfolgt entsprechend HCV-J (Genotyp 1b, (64)) und HCV-K3a (Genotyp 3a, (150)). Eine der veröffentlichten 45 Sequenzen von NS5A wurde nicht in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen aufgrund einer Längenabweichung wegen Insertionen (114).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich innerhalb eines gegebenen HCV Genotyps (HCV-1b oder HCV-3a) keine Differenz in der Anzahl der UU und UA-Dinukleotide in den Nukleotidsequenzen der untersuchten HCV-Struktur und Nichtstrukturproteine vor Therapiebeginn bei Patienten mit und ohne virologisches Ansprechen (Respondern versus Nonrespondern) auf eine Interferon-alfa-basierte antivirale Therapie. Darüber hinaus zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der UU und UA Dinukleotide in Isolaten von HCV-1b infizierten Nonrespondern vor und während einer Interferon-alfa-basierten antiviralen Therapie. Auch eine Analysebeschränkung auf vorhergesagte Bereiche von Einzelstrang-RNA zeigte weder einen Unterschied hinsichtlich der Anzahl der RNase L Schnittstellen zwischen Nonrespondern und Respondern innerhalb eines gegebenen HCV Genotyps noch zwischen den Therapiezeitpunkten bei HCV-1b infizierten Nonrespondern. Demnach scheint bei gegebenem HCV Genotyp die Häufigkeit der RNase L Schnittstellen innerhalb des HCV-Genoms keinen Effekt auf das Therapieansprechen auf eine Interferon-alfa-basierten Therapie zu haben. Überdies ließ sich bei HCV-1b-infizierten Nonrespondern während einer Interferon-alfa-basierten antiviralen Therapie keine Selektion UU und UA armer HCV Genome durch einen potentiellen Evolutionsdruck durch das 2'-5'-OAS/RNase L System nachweisen.

Veränderungen der RNase L Schnittstellen im Bereich der HCV Quasispezies sowohl vor als auch unter Therapie wurden in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Diesbezüglich wären klonale Sequenzuntersuchungen notwendig gewesen.

Es gibt Hinweise darauf, dass HCV-Genome mit einer höheren Anzahl an UU/UA Dinukleotiden empfindlicher auf Interferon alfa sind.

In zwei aktuellen Publikationen (49, 144) wurde eine höhere Anzahl an UU und UA Dinukleotiden in Genomen von Interferon-alfa-empfindlicheren HCV Genotypen beschrieben als in Genomen vom Interferon-alfa-unempfindlicheren HCV Genotyp 1. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit HCV-1b und -3a-Genom-Teilsequenzen auf ihre Anzahl an RNase L Schnittstellen auch unter Berücksichtigung der prädizierten RNA-Sekundärstruktur verglichen. Im Rahmen dieser zusätzlichen Untersuchungen zeigte wiederum der Interferon-alfa-

empfindlichere HCV Genotyp 3a im Vergleich zum Interferon-alfa-unempfindlicheren HCV Genotyp 1b eine größere Anzahl an UU und UA Dinukleotiden, auch bei Beschränkung der Analyse auf einzelsträngige RNA-Regionen. Interessanterweise zeigten sich darüber hinaus in der vorliegenden Arbeit in den untersuchten HCV-3a Sequenzen durchgehend mehr Einzelstrang RNA-Nukleotide auf die gesamte Sequenz, als innerhalb der HCV-1b Sequenzen. Demnach sind die RNase L Schnittstellen in HCV-3a denen in HCV-1b nicht nur zahlenmäßig überlegen, sondern scheinen auch stärker exponiert gegenüber dem Einfluss der RNase L. Somit bekräftigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass eine unterschiedliche Sensitivität verschiedener HCV Genotypen gegenüber Interferon-alfa u.a. bedingt sein könnte durch eine unterschiedliche Sensitivität der HCV-Genome gegenüber dem 2'-5'-OAS/RNase L System. Allerdings stellt sich die Frage, ob eine größere Anzahl an RNase L Schnittstellen tatsächlich mit einer größeren Sensitivität gegenüber einer Spaltung der RNA durch RNase L verbunden ist. Diese Einschätzung lässt sich unterstützen durch vorliegende Daten, aus denen ersichtlich wird, dass zwar bei HCV Genotypen 3a die meisten RNase L Schnittstellen zu finden sind, HCV Genotypen 2 allerdings eine bessere Ansprechrate auf die gängigen Therapieregime zeigen (123, 140, 152)

In vitro Untersuchungen, die diese Frage thematisieren, zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Während eine Studie einen gesteigerten Abbau von HCV-2a RNA im Vergleich zu HCV-1a RNA beschreibt, zeigen sich in einer anderen Studie keinerlei Unterschiede in der Kinetik der RNA-Spaltungen zwischen diesen beiden Genotypen. Jedoch scheint die in vitro Situation möglicherweise nicht die Komplexität der in vivo Situation widerzuspiegeln. Vor allem, wenn lediglich eine geringe Konzentration an RNase L vorhanden ist, wird gegebenenfalls die Anzahl der Schnittstellen innerhalb der HCV RNA relevant werden. In vivo wird die RNase L Aktivität durch 2' Phosphodiesterase und RNase L Inhibitor limitiert. Darüber hinaus können in vivo HCV RNA Fragmente z.B. durch Ligation oder evtl. Rekombination repariert werden. Eine geringe Anzahl an HCV Genomen ist jedoch in vivo ausreichend, um einen virologischen Relapse am Ende der antiviralen Therapie zu verursachen. Möglicherweise wird die Differenz zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der erwarteten Schnittstellenhäufigkeiten im untersuchten Genomabschnitt durch eine ungleichmäßige Verteilung der Schnittstellen innerhalb des HCV-Genoms erklärt.

Darüber hinaus zeigen aktuelle Publikationen einen zusätzlichen antiviralen Effekt der RNase L über die Zerstörung des Virus durch direkte Spaltung hinaus im Sinne der angeborenen Immunabwehr, der „innate immunity“. Hierbei wird durch die virale Einzelstrang-RNA die Oligoadenylatsynthetase aktiviert, dies führt wie bereits vorher beschrieben zu der Produktion von 2'-5'-Oligo-A und somit zur Aktivierung der RNase L, durch deren Aktivität Spaltprodukte zellulärer und viraler RNA entstehen, die die antivirale Immunität verstärken, indem sie die Interferon- β -Produktion steigern (77, 124). Der antivirale Effekt der RNase L wird dabei nicht über einen einzelnen Mechanismus sondern durch die Spaltung verschiedener RNA-Substrate über eine Kombination verschiedener Effekte vermittelt. So führt die Spaltung von viraler Einzelstrang-RNA zu einer ausbleibenden Replikation (71). Einzelstrang-RNA-Moleküle die in Beziehung zu Doppelstrangregionen stehen, wie es in einigen viralen Replikationszwischenstufen vorkommt, bewirken eine lokalisierte Aktivierung der Oligoadenylatsynthetase und somit auch der RNase L, was zu einer bevorzugten Spaltung an genannten Regionen führt (90), möglicherweise ist dies eine Erklärung für die selektive Spaltung viraler RNA durch die RNase L. (71). Eine Spaltung viraler mRNA durch die RNase L bewirkt somit zusammen mit dem interferoninduzierten PKR-Protein eine Hemmung der viralen Proteinsynthese (84).

Im Rahmen der Virusreplikation kommt es zur Beschädigung zellulärer Bestandteile, z.B. des Ribosoms. Dies trägt zum antiviralen Effekt der RNase L bei (125, 148), da somit die Virusreplikation gehemmt wird. Die Spaltung beider - 28S und 18S - rRNA kennzeichnen die RNase L Aktivität virusinfizierter Zellen. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass auch zelluläre mRNA der RNase L zum Opfer fällt (78). Ob die RNase L zwischen viraler und zellulärer mRNA unterscheiden kann ist unklar. Allerdings ist nachweisbar, dass die Spaltung zellulärer RNA, die für die Virusreplikation benötigt wird, eine effektive Strategie zur Virushemmung darstellt (124).

Bei der Spaltung einzelsträngiger RNA durch die RNase L entstehen als Spaltungsprodukte kurze Duplex-RNA's mit 3'-Phosphoryl-Gruppierungen (40, 51, 149). Diese RNA-Spaltprodukte bewirken eine mediators - und transkriptionsfaktor-vermittelte Aktivierung des Interferon-beta-Gens (77) mit daraus folgender Produktion von von Interferon-beta. Somit kann auch wirtseigene RNA, die durch RNase L gespalten wird die angeborene Immunreaktion induzieren, verstärken und aufrechterhalten.

Ein weiterer Aspekt der RNase L Aktivität ist die Fähigkeit, die Apoptose der Zelle einzuleiten. Dies wird bedingt entweder durch eine anhaltende RNase L Aktivität oder durch eine Aktivierung über einen bisher nicht näher bestimmten Schwellenwert (18, 19, 156). Die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren lässt eine gewisse Tumorsuppressorfunktion des Oligoadenylsynthetase/RNase L-Pathway vermuten und bietet entsprechende Überlegungen zu therapeutischen Strategien basierend auf RNase L-Aktivatoren (79).

Dieser Effekt, die „innate immunity“ zu verstärken könnte stärker bei den Infektionen zur Geltung kommen, deren HCV Genome mehr Schnittstellen aufweisen, da somit die RNase L bedingte Spaltung zu einer größeren Anzahl an Spaltprodukten führt.

Zusammenfassend scheint allerdings bei gegebenem HCV Genotyp die Häufigkeit der RNase L Schnittstellen innerhalb des HCV-Genoms keinen ausreichenden Effekt auf das Therapieansprechen auf eine Interferon-alfa-basierte Therapie zu haben. Darüber hinaus zeigte sich bei HCV-1b infizierten Nonrespondern kein Entwicklungsdruck auf das HCV Genom durch das 2'-5'-OAS/RNase L System mit Verlust von UU und UA Dinukleotiden während einer Interferon-alfa-basierten antiviralen Therapie. Allerdings bekräftigt diese Arbeit die Hypothese, dass unterschiedliche Sensitivitäten der HCV-Genotypen gegenüber Interferon-alfa auf unterschiedliche Sensitivitäten der HCV-Genome gegenüber dem 2'-5'-OAS/RNase L System zurückzuführen sein könnten.

Bereits in früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das HCV Genom einen natürlichen Mangel an UU und UA Dinukleotiden aufweist, anders als statistisch zu erwarten wäre (49). Darüberhinaus konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es unter einer interferon-basierten Therapie zu ausgeprägten und unterschiedlichen Remodelierungen der HCV mRNA insbesondere hinsichtlich der UU/UA-Dinukleotide und somit potentieller RNase L Schnittstellen kommt. Hierbei handelte es sich allerdings um sogenannte „silent mutations“ also Veränderungen in der Nukleotidsequenz ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. In der gleichen Studie zeigte sich, dass sowohl UU/UA-Dinukleotide eliminiert, als auch neue UU/UA-Dinukleotide generiert wurden (49).

In der vorliegenden Studie zeigte sich in den untersuchten Genomabschnitten unter einer interferon-alfa basierten Therapie kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der UU/UA-Dinukleotide/RNase L Schnittstellen sowohl vor Beginn als auch während der Therapie.

Das negative Ergebnis der vorliegenden Studie muß auch betrachtet unter dem Aspekt einer möglichen Beeinflussung durch die uneinheitlichen Therapieregime. Zwar sind die Ausgangsdaten der Patienten vor Beginn der interferon-basierten Therapie vergleichbar. Die durchgeführten Therapieregime mit sowohl pegyliertem Interferon-alfa, als auch Standard Interferon-alfa, zusätzliche Therapie mit Ribavirin in unterschiedlichen Dosierungen sind allerdings sehr heterogen.

Der genaue Mechanismus des synergistischen Effekts einer Kombinationstherapie bestehend aus Interferon-alfa und Ribavirin in der Therapie der chronischen Hepatitis C Virusinfektion ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt weiterhin unklar. Studien konnten belegen, dass unter einer Kombinationstherapie der Anteil der Patienten, die ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (sustained virologic response, SVR) zeigten verdoppelt werden konnte, insbesondere da Ribavirin in der Monotherapie nicht zur Viruseradikation führt (13, 43, 82, 99). Aktuelle Studien zeigen darüber hinaus einen signifikanten Einfluß des Ribavirin auf die HCV RNA Suppression im Rahmen einer Tripletherapie mit pegyliertem Interferon-alfa und neuen direkt antiviral wirksamen Substanzen (54, 97).

Es konnte gezeigt werden, dass Ribavirin als Guanosinanalogon einen mutagenen Effekt ausübt bei der Transition von G-zu-A und C-zu-U nach fehlerhafter in vitro Eingliederung in die Poliovirus-RNA (27). Hofmann et al. konnten zeigen, dass es unter Ribavirin sowohl einen Anstieg der Mutationshäufigkeit als auch der Transitionen (G→A, C→U) zu verzeichnen gab (55). In einer weitergehenden Studie untersuchten Mihm et al., ob es durch die ribavirininduzierte Mutagenese zu einem Anstieg der RNase L Schnittstellen in den untersuchten HCV-Regionen kommt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Anstieg der RNase L Schnittstellen im Bereich der HCV NS3 und NS5B Quasispezies (86).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ein entscheidendes Problem auf in der Interpretation möglicher bzw zu erwartender RNase L Schnittstellen: scheint doch die Wahrscheinlichkeit für eine Spaltung durch die RNase L an einer Schnittstelle in vivo auch von anderen Faktoren abhängig zu sein, wie z.B. der Größe der Einzelstrangschleife, die zur Spaltung erforderlich ist (49). Die negativen Ergebnisse der vorliegenden Studien sind möglicherweise in den Unterschieden zwischen der erwarteten Schnittstellenhäufigkeit und der Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen Spaltung durch die RNase L in der gefalteten viralen RNA in vivo begründet.

Die intrazellulären Reaktionen im Rahmen einer Hepatitis C Virusinfektion sind vielfältig und im Vorfeld ausführlich beschrieben. Hierbei kommt es sowohl zu einer Aktivierung der zellulären als auch der humoralen Immunantwort. Die HCV RNA aktiviert das 2'-5'-OAS/RNase L System konzentrationsabhängig, sodass in Folge einer initial rasanten HCV Ausbreitung nach Erreichen einer bestimmten intrazellulären Konzentration das 2'-5'-OAS/RNase L System aktiviert wird (136, 155). Infolge der RNase L vermittelten Spaltung viraler RNA kommt es zu einer konsekutiven Reduktion der HCV Konzentration, Reduktion viraler Genexpression und entsprechend reduzierter Replikation in Abhängigkeit des Ausmaßes der Immunantwort. Diese Gegenregulation ermöglicht der HCV Infektion, exzessive Provokationen des erworbenen Immunsystems zu vermeiden und somit eine anhaltende Infektion zu etablieren (49), insbesondere nach Abschluß einer interferonbasierten Therapie (16, 28, 144). Allerdings fehlen diesbezüglich aussagekräftige Untersuchungen im Hinblick auf die 2'-5'-OAS/RNase L Aktivität bei Patienten mit unterschiedlichen HCV-Genotypinfektionen ohne und unter antiviraler Therapie. Hier sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, um die antivirale Therapie individuell zu optimieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
2'-5'-OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
A	Adenin (Base), Adenosin (Nukleosid)
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin (Base), Cytidin (Nukleosid)
CD81	Cluster of Differentiation 81
cDNA	komplementäre DNA
C-terminal	Carboxy-terminal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelstängige Ribonukleinsäure
ETR	End of treatment Response
G	Guanin (Base), Guanosin (Nukleosid)
GBV-C	GB-Virus Typ C
HCV	Hepatitis C Virus
IFN	Interferon
IL-8	Interleukin 8
Interferon-β	Interferon-beta
Interferon-γ	Interferon-gamma
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon-stimulating gene
IU	International Unit
Jak	Janus activating kinase
kDa	Kilo-Dalton
ml	Milliliter
mM	Millimol

mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
nc	Nukleotide
NS5A	Nichtstrukturprotein 5A
N-terminal	Amino-terminal
NTR	Nicht translatierte Region
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PePHD	PKR/eIF2 α -Phosphorylierungs- Homologie-Domäne
PKR	Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase
RIG	Retinoic-acid-inducible-gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase L	Ribonuklease L
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
SR	Sustained Response
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
STAT	Signaltransducer and activator of transcription-proteins
T	Thymin (Base), Thymidin (Nukleosid)
Taq	Thermophilus aquaticus
TLR	Toll-like-receptor
TTV	TT-Virus
TW	Therapiewoche
U	Uracil (Base), Uridin (Nukleosid)
UA	Uracil-Adenin-Dinukleotid
UU	Uracil-Dinukleotid
UV	Ultraviolett
V3	Variable Region 3
WHO	Weltgesundheitsorganisation

7. Literaturverzeichnis

1. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. 1999. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12766-71
2. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G, Lotteau V. 2002. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76: 6919-28
3. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 79: 3187-94
4. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 144: 705-14
5. Bain C, Parroche P, Lavergne JP, Duverger B, Vieux C, Dubois V, Komurian-Pradel F, Trepo C, Gebuhrer L, Paranhos-Baccala G, Penin F, Inchauspe G. 2004. Memory T-cell-mediated immune responses specific to an alternative core protein in hepatitis C virus infection. *J Virol* 78: 10460-9
6. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 68: 5045-55
7. Bartosch B, Cosset FL. 2006. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 348: 1-12
8. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, Aldabe R, Lopez-Cabrera M, Majano PL. 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-

- associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48: 1044-53
9. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. 2005. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79: 11353-65
 10. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25: 105-17
 11. Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D. 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 277: 8130-9
 12. Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, Crotta S. 2008. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol* 82: 8316-29
 13. Brok J, Gluud LL, Gluud C. 2005. Ribavirin monotherapy for chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005527
 14. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. 1995. Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 25: 75-91
 15. Burlone ME, Budkowska A. 2009. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 90: 1055-70
 16. Camma C, Craxi A. 2000. Chronic hepatitis C: retreatment of relapsers. An evidence-based approach. *Semin Gastrointest Dis* 11: 115-21
 17. Carroll SS, Cole JL, Viscount T, Geib J, Gehman J, Kuo LC. 1997. Activation of RNase L by 2',5'-oligoadenylates. Kinetic characterization. *J Biol Chem* 272: 19193-8

18. Castelli JC, Hassel BA, Maran A, Paranjape J, Hewitt JA, Li XL, Hsu YT, Silverman RH, Youle RJ. 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* 5: 313-20
19. Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ. 1997. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med* 186: 967-72
20. Chemello L, Alberti A, Rose K, Simmonds P. 1994. Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 330: 143
21. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, Heathcote J, Edwards AM, McGilvray ID. 2005. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 128: 1437-44
22. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-62
23. Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW. 1990. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46: 423-41
24. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 87: 1075-84
25. Cole JL, Carroll SS, Blue ES, Viscount T, Kuo LC. 1997. Activation of RNase L by 2',5'-oligoadenylates. Biophysical characterization. *J Biol Chem* 272: 19187-92
26. Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. 2004. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14067-72

27. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 6: 1375-9
28. Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, Hoefs J, Gordon SC, Trepo C, Shiffman ML, Zeuzem S, Craxi A, Ling MH, Albrecht J. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1493-9
29. Desai SY, Patel RC, Sen GC, Malhotra P, Ghadge GD, Thimmapaya B. 1995. Activation of interferon-inducible 2'-5' oligoadenylate synthetase by adenoviral VAI RNA. *J Biol Chem* 270: 3454-61
30. Desai SY, Sen GC. 1997. Effects of varying lengths of double-stranded RNA on binding and activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *J Interferon Cytokine Res* 17: 531-6
31. Dong B, Silverman RH. 1997. A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *J Biol Chem* 272: 22236-42
32. Dong B, Silverman RH. 1995. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem* 270: 4133-7
33. Dubuisson J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13: 2406-15
34. Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. 2004. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 126: 263-77
35. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 76: 5974-84

36. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. 2004. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol* 78: 11288-95
37. El-Serag HB. 2002. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 36: S74-83
38. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801-5
39. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. 1975. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 292: 767-70
40. Floyd-Smith G, Slattery E, Lengyel P. 1981. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate--dependent endonuclease. *Science* 212: 1030-2
41. Forestier N, Reesink HW, Weegink CJ, McNair L, Kieffer TL, Chu HM, Purdy S, Jansen PL, Zeuzem S. 2007. Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology* 46: 640-8
42. Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2986-91
43. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347: 975-82

44. Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18: 5208-18
45. Gale M, Jr., Foy EM. 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436: 939-45
46. Gouttenoire J, Penin F, Moradpour D. 2010. Hepatitis C virus nonstructural protein 4B: a journey into unexplored territory. *Rev Med Virol* 20: 117-29
47. Gretton SN, Taylor AI, McLauchlan J. 2005. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol* 86: 1415-21
48. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. 2004. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 140: 346-55
49. Han JQ, Barton DJ. 2002. Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *RNA* 8: 512-25
50. Han JQ, Townsend HL, Jha BK, Paranjape JM, Silverman RH, Barton DJ. 2007. A phylogenetically conserved RNA structure in the poliovirus open reading frame inhibits the antiviral endoribonuclease RNase L. *J Virol* 81: 5561-72
51. Han JQ, Wroblewski G, Xu Z, Silverman RH, Barton DJ. 2004. Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *J Interferon Cytokine Res* 24: 664-76

52. Häussinger D NC, ed. 2001. *Hepatitis C*: Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin/Wien
53. Helle F, Wychowski C, Vu-Dac N, Gustafson KR, Voisset C, Dubuisson J. 2006. Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J Biol Chem* 281: 25177-83
54. Hezode C, Forestier N, Dusheiko G, Ferenci P, Pol S, Goeser T, Bronowicki JP, Bourliere M, Gharakhanian S, Bengtsson L, McNair L, George S, Kieffer T, Kwong A, Kauffman RS, Alam J, Pawlotsky JM, Zeuzem S. 2009. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 360: 1839-50
55. Hofmann WP, Polta A, Herrmann E, Mihm U, Kronenberger B, Sonntag T, Lohmann V, Schonberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. 2007. Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132: 921-30
56. Hofmann WP, Sarrazin C, Kronenberger B, Schonberger B, Bruch K, Zeuzem S. 2003. Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J Infect Dis* 187: 982-7
57. Hoofnagle JH. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36: S21-9
58. Hope RG, McLauchlan J. 2000. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 81: 1913-25
59. Hovanessian AG, Brown RE, Kerr IM. 1977. Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature* 268: 537-40

60. Hovnanian A, Rebouillat D, Mattei MG, Levy ER, Marie I, Monaco AP, Hovanessian AG. 1998. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms. *Genomics* 52: 267-77
61. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284: 70-81
62. Johnson CL, Gale M, Jr. 2006. CARD games between virus and host get a new player. *Trends Immunol* 27: 1-4
63. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Wang TH, Chen DS. 1995. Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. *J Infect Dis* 172: 261-4
64. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9524-8
65. Kerr IM, Brown RE. 1978. pppA₂'p5'A₂'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 256-60
66. Kieffer TL, Sarrazin C, Miller JS, Welker MW, Forestier N, Reesink HW, Kwong AD, Zeuzem S. 2007. Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology* 46: 631-9
67. Kochs G, Haller O. 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2082-6

68. Koretz RL, Abbey H, Coleman E, Gitnick G. 1993. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. Looking back in the second decade. *Ann Intern Med* 119: 110-5
69. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-4
70. Lavillette D, Tarr AW, Voisset C, Donot P, Bartosch B, Bain C, Patel AH, Dubuisson J, Ball JK, Cosset FL. 2005. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 41: 265-74
71. Li XL, Blackford JA, Hassel BA. 1998. RNase L mediates the antiviral effect of interferon through a selective reduction in viral RNA during encephalomyocarditis virus infection. *J Virol* 72: 2752-9
72. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 128: 1034-41
73. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83: 2011-4
74. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 77: 5428-38
75. Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. 2006. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J* 20: 735-7
76. Major ME, Feinstone SM. 1997. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 25: 1527-38

77. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448: 816-9
78. Malathi K, Paranjape JM, Bulanova E, Shim M, Guenther-Johnson JM, Faber PW, Eling TE, Williams BR, Silverman RH. 2005. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14533-8
79. Malathi K, Paranjape JM, Ganapathi R, Silverman RH. 2004. HPC1/RNASEL mediates apoptosis of prostate cancer cells treated with 2',5'-oligoadenylates, topoisomerase I inhibitors, and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 64: 9144-51
80. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358: 958-65
81. Maran A, Maitra RK, Kumar A, Dong B, Xiao W, Li G, Williams BR, Torrence PF, Silverman RH. 1994. Blockage of NF-kappa B signaling by selective ablation of an mRNA target by 2-5A antisense chimeras. *Science* 265: 789-92
82. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1485-92
83. McLauchlan J. 2000. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7: 2-14
84. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62: 379-90

85. Mihm U, Grigorian N, Welsch C, Herrmann E, Kronenberger B, Teuber G, von Wagner M, Hofmann WP, Albrecht M, Lengauer T, Zeuzem S, Sarrazin C. 2006. Amino acid variations in hepatitis C virus p7 and sensitivity to antiviral combination therapy with amantadine in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 11: 507-19
86. Mihm U, Hofmann WP, Welsch C, Polta A, Lengauer T, Zeuzem S, Sarrazin C, Herrmann E. 2009. Effect of ribavirin on the frequency of RNase L cleavage sites within the hepatitis C viral genome. *J Viral Hepat* epub
87. Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. 2004. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 78: 13278-84
88. Moradpour D, Evans MJ, Gosert R, Yuan Z, Blum HE, Goff SP, Lindenbach BD, Rice CM. 2004. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J Virol* 78: 7400-9
89. Nielsen SU, Bassendine MF, Burt AD, Martin C, Pumeechockchai W, Toms GL. 2006. Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J Virol* 80: 2418-28
90. Nilsen TW, Baglioni C. 1979. Mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2600-4
91. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. 1991. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3392-6
92. Palitzsch KD, Hottenträger B, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Scholmerich J, Jilg W. 1999. Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11: 1215-20

93. Pawlotsky JM, Germanidis G, Neumann AU, Pellerin M, Frainais PO, Dhumeaux D. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 72: 2795-805
94. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 279: 40835-43
95. 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
96. Player MR, Torrence PF. 1998. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* 78: 55-113
97. Pockros PJ, Nelson D, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, Everson GT, Fried MW, Ghalib R, Harrison S, Nyberg L, Shiffman ML, Najera I, Chan A, Hill G. 2008. R1626 plus peginterferon Alfa-2a provides potent suppression of hepatitis C virus RNA and significant antiviral synergy in combination with ribavirin. *Hepatology* 48: 385-97
98. Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. 2001. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol* 75: 6095-106
99. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. 1998. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352: 1426-32

100. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Millian SJ. 1974. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2: 241-6
101. Ray RB, Ray R. 2001. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 202: 149-56
102. Rebouillat D, Hovanessian AG. 1999. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19: 295-308
103. Reed KE, Rice CM. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 242: 55-84
104. Reesink HW, Zeuzem S, Weegink CJ, Forestier N, van Vliet A, van de Wetering de Rooij J, McNair L, Purdy S, Kauffman R, Alam J, Jansen PL. 2006. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 131: 997-1002
105. Robert-Koch-Institut. 2008. *Epidemiologisches Bulletin*. ed. RK Institut
106. Roccasecca R, Ansuini H, Vitelli A, Meola A, Scarselli E, Acali S, Pezzanera M, Ercole BB, McKeating J, Yagnik A, Lahm A, Tramontano A, Cortese R, Nicosia A. 2003. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 77: 1856-67
107. Rutherford MN, Hannigan GE, Williams BR. 1988. Interferon-induced binding of nuclear factors to promoter elements of the 2-5A synthetase gene. *EMBO J* 7: 751-9
108. Saint N, Montserret R, Chipot C, Penin F. 2009. Structural and functional analysis of the HCV p7 protein. *Methods Mol Biol* 510: 125-43

109. Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14: 778-809, table of contents
110. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
111. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68: 3631-41
112. Sarkar SN, Ghosh A, Wang HW, Sung SS, Sen GC. 1999. The nature of the catalytic domain of 2'-5'-oligoadenylate synthetases. *J Biol Chem* 274: 25535-42
113. Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, Ruster B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. 2001. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 289: 150-63
114. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. 2002. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 76: 11079-90
115. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, Wincheringer D, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD. 2007. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132: 1767-77
116. Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. 2000. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 31: 1360-70
117. Sarrazin C, Mihm U, Herrmann E, Welsch C, Albrecht M, Sarrazin U, Traver S, Lengauer T, Zeuzem S. 2005. Clinical significance of in vitro replication-

- enhancing mutations of the hepatitis C virus (HCV) replicon in patients with chronic HCV infection. *J Infect Dis* 192: 1710-9
118. Sarrazin C, Rouzier R, Wagner F, Forestier N, Larrey D, Gupta SK, Hussain M, Shah A, Cutler D, Zhang J, Zeuzem S. 2007. SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 132: 1270-8
119. 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
120. Schreier E HM. 2001. Hepatitis C - Epidemiologie und Prävention. pp. 554-561: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*
121. Schreier E RD. 2003. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch Institut
122. Seeff LB. 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: S35-46
123. Shiffman ML, Suter F, Bacon BR, Nelson D, Harley H, Sola R, Shafran SD, Barange K, Lin A, Soman A, Zeuzem S. 2007. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 357: 124-34
124. Silverman RH. 2007. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81: 12720-9
125. Silverman RH, Skehel JJ, James TC, Wreschner DH, Kerr IM. 1983. rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p)nA activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells. *J Virol* 46: 1051-5
126. Simmonds P. 1999. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 31 Suppl 1: 54-60

127. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74: 2391-9
128. Stark K, Bienzle U, Vonk R, Guggenmoos-Holzmann I. 1997. History of syringe sharing in prison and risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus infection among injecting drug users in Berlin. *Int J Epidemiol* 26: 1359-66
129. StGelais C, Foster TL, Verow M, Atkins E, Fishwick CW, Rowlands D, Harris M, Griffin S. 2009. Determinants of hepatitis C virus p7 ion channel function and drug sensitivity identified in vitro. *J Virol* 83: 7970-81
130. Sumpter R, Jr., Wang C, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr. 2004. Viral evolution and interferon resistance of hepatitis C virus RNA replication in a cell culture model. *J Virol* 78: 11591-604
131. Tan SL, Katze MG. 2001. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284: 1-12
132. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285: 107-10
133. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem* 279: 48576-87
134. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435: 374-9
135. Tellinghuisen TL, Rice CM. 2002. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Curr Opin Microbiol* 5: 419-27

136. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15661-8
137. Vassilaki N, Mavromara P. 2009. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* 61: 739-52
138. Voisset C, Dubuisson J. 2004. Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* 96: 413-20
139. von Hahn T, Yoon JC, Alter H, Rice CM, Rehermann B, Balfe P, McKeating JA. 2007. Hepatitis C virus continuously escapes from neutralizing antibody and T-cell responses during chronic infection in vivo. *Gastroenterology* 132: 667-78
140. von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, Bergk A, Bernsmeier C, Haussinger D, Herrmann E, Zeuzem S. 2005. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129: 522-7
141. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11: 791-6
142. Wang C, Pflugheber J, Sumpter R, Jr., Sodora DL, Hui D, Sen GC, Gale M, Jr. 2003. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 77: 3898-912
143. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 67: 3338-44

144. Washenberger CL, Han JQ, Kechris KJ, Jha BK, Silverman RH, Barton DJ. 2007. Hepatitis C virus RNA: dinucleotide frequencies and cleavage by RNase L. *Virus Res* 130: 85-95
145. Weber B, Rabenau H, Berger A, Scheuermann EH, Staszewski S, Kreuz W, Scharrer I, Schoeppe W, Doerr HW. 1995. Seroprevalence of HCV, HAV, HBV, HDV, HCMV and HIV in high risk groups/Frankfurt a.M., Germany. *Zentralbl Bakteriol* 282: 102-12
146. Welker MW, Hofmann WP, Welsch C, von Wagner M, Herrmann E, Lengauer T, Zeuzem S, Sarrazin C. 2007. Correlation of amino acid variations within nonstructural 4B protein with initial viral kinetics during interferon-alpha-based therapy in HCV-1b-infected patients. *J Viral Hepat* 14: 338-49
147. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. 2000. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology* 32: 91-6
148. Wreschner DH, James TC, Silverman RH, Kerr IM. 1981. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* 9: 1571-81
149. Wreschner DH, McCauley JW, Skehel JJ, Kerr IM. 1981. Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature* 289: 414-7
150. Yamada N, Tanihara K, Mizokami M, Ohba K, Takada A, Tsutsumi M, Date T. 1994. Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *J Gen Virol* 75 3279-84
151. Zeuzem S. 2000. *Chronische Virushepatitiden*: Uni-Med, Bremen
152. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J. 2004. Peginterferon alfa-2b plus

- ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 40: 993-9
153. Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G. 1995. [Viral hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 33: 117-32
154. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72: 753-65
155. Zhou A, Molinaro RJ, Malathi K, Silverman RH. 2005. Mapping of the human RNASEL promoter and expression in cancer and normal cells. *J Interferon Cytokine Res* 25: 595-603
156. Zhou A, Paranjape J, Brown TL, Nie H, Naik S, Dong B, Chang A, Trapp B, Fairchild R, Colmenares C, Silverman RH. 1997. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J* 16: 6355-63

Danksagung

Herrn Prof. Dr.med. Christoph Sarrazin möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken. Darüber hinaus möchte ich Frau Dr.med Ulrike Mihm für die hilfreiche und ausdauernde Unterstützung und den vielseitigen und kompetenten Rat in jeder Phase dieser Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen. Durch Ihre Geduld, stete Aufmunterung und sachkundige Unterstützung war sie am Entstehen der vorliegenden Arbeit maßgeblich beteiligt.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich in der gesamten Zeit unermüdlich unterstützt haben.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Form publiziert:

Mihm, U., Ackermann, O., Welsch, C., Herrmann, E., Hofmann, WP., Grigorian, N., Welker, MW., Lengauer, T., Zeuzem, S., Sarrazin, C. *Clinical relevance of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase/RNase L system for treatment response in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2009. **50**: 49-58.

Lebenslauf

Name: **Oliver Thorsten Ackermann**

Geburtsdatum: 13.10.1978

Geburtsort : Erlangen

Berufe der Eltern: Vater Diplom-Ingenieur, Mutter Sekretärin

2 Geschwister

1985-1989 Besuch der Thoner-Espan Grundschule in Nürnberg

1989-1998 Besuch des Gymnasiums in :
Bagdad (Bagdad International School)
Nürnberg (Peter Vischer-Gymnasium)
Aachen (Inda-Gymnasium)
Homburg/Saar (Christian-von-Mannlich-Gymnasium)

1998 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

10/1999-05/2006 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Medizinische Fakultät Homburg

07/06-12/06 Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum Homburg, Direktor Prof. Dr. S. Zeuzem

seit 01/07 Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik 1, Universitätsklinikum
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main,
Direktor Prof. Dr. S. Zeuzem

Frankfurt, im April 2010

Unterschrift