

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. med. F. Lammert

**Bedeutung von Aminosäurevariationen im Hepatitis C Virus p7-Protein
für das virologische
Ansprechen auf eine Therapie mit Amantadin in Kombination mit
pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin bei Patienten mit
chronischer Hepatitis C Genotyp 1 Infektion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Ulrike Elisabeth Elsler, geb. Plieninger
geb. am: 23.11.1982 in Tübingen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (deutsch und englisch)	7
1 Einleitung	11
1.1 Geschichte und Epidemiologie der Hepatitis C	11
1.2 Krankheitsbild und Verlauf	12
1.3 HCV Genotypen und geographisches Verteilungsmuster	13
1.4 Molekulare Struktur des HCV	14
1.4.1 HCV p7-Protein	19
1.4.2 Viroporine	20
1.5 Therapie der chronischen Hepatitis C	21
1.5.1 Amantadin	23
1.6 Fragestellung der Arbeit	26
2 Patienten, Material und Methoden	28
2.1 Patienten	28
2.2 Geräte und Einwegmaterialien	30
2.3 Allgemeine Chemikalien	31
2.4 Enzyme	31
2.5 Reagenzien-Sets	32
2.6 Primer	32
2.7 Seren	32
2.8 Quantitative HCV-RNA-Messung und HCV-Genotypisierung	33
2.9 HCV-RNA-Extraktion	33
2.10 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion	36
2.10.1 Prinzip der Reversen Transkription	36
2.10.2 Durchführung der Reversen Transkription	37
2.10.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion	38
2.10.4 Durchführung der Polymerasekettenreaktion	40
2.11 Agarosegel-Elektrophorese	42

2.11.1	Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese	42
2.11.2	Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese	43
2.12	Aufreinigung von PCR-Produkten	44
2.13	Probenaufbereitung vor DNA-Sequenzierung	45
2.13.1	Sequenz-PCR	46
2.13.2	Gelsäulenfiltration der Sequenz-PCR-Produkte	47
2.14	DNA-Sequenzierung	47
2.15	Qualitative Sequenz-Analyse	48
2.16	Statistische Analyse	59
3	Ergebnisse	50
3.1	HCV-1a-infizierte Patienten	50
3.2	HCV-1b-infizierte Patienten	50
3.2.1	Dreifachkombinationstherapie-Gruppe mit Interferon alpha, Ribavirin und Amantadin	52
3.2.2	Kombinationstherapie-Gruppe mit Interferon alpha, Ribavirin und Placebo	53
3.2.3	Vergleich der beiden Behandlungsarme	56
4	Diskussion	61
5	Referenzen	68
6	Danksagung	77
7	Lebenslauf	78

Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1	Patiententabelle	29
Tabelle 2	Zusammensetzung des RT-Mastermix 1	37
Tabelle 3	Zusammensetzung des RT-Mastermix 2	38
Tabelle 4	Sequenz-PCR Protokoll	46
Tabelle 5	Gegenüberstellung klinischer Charakteristika der Patienten dieser Studie und der gesamten PRAMA-Studie	51
Tabelle 6	Darstellung der verschiedenen Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten innerhalb verschiedener Regionen der HCV p7-Sequenzen	55
Abbildung 1	Darstellung des HCV-Genoms, des Ablaufs der Translation und der Aufteilung der Proteine	16
Abbildung 2	Darstellung des Replikationszyklus des Hepatitis C Virus	18
Abbildung 3	„nested“-PCR Protokoll	41
Abbildung 4	Beispiel einer Elektrophorese	44
Abbildung 5	Arbeitsschema im Thermocycler bei Sequenz-PCR	46
Abbildung 6A	Alignment der Aminosäuren 1-63 des HCV p7 von Patienten mit Placebothherapie	57
Abbildung 6B	Alignment der Aminosäuren 1-63 des HCV p7 von Patienten mit Amantadintherapie plus pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin	58
Abbildung 7	Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen in der kompletten HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen	59
Abbildung 8	Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen im TM1-Abschnitt (AS 13-32) der HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen	59

Abbildung 9	Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen im TM2-Abschnitt (AS 39-58) der HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen	60
-------------	---	----

Abkürzungsverzeichnis

AS:	Aminosäure(n)
BVDV:	Bovines Diarrhoe Virus
cDNA:	komplementäre DNA
C-Protein:	Kapsid-Protein
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTP:	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT:	Dithiothreitol
E1- und E2-Protein:	envelope / Hüll-Glycoproteine E1 und E2
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ETR:	end of treatment response, virologisches Ansprechen zum Therapieende mit Rückfall im weiteren Verlauf
GAGs:	Glykosaminoglykane
GBV-C / HGV:	GB Virus C / Hepatitis G Virus
HAV:	Hepatitis A Virus
HBV:	Hepatitis B Virus
HCV:	Hepatitis C Virus
HIV:	humanes Immundefizienzvirus
IFN-alfa:	Interferon alfa
IRES:	internal ribosome entry site; interne Ribosomenbindungsstelle
LDL:	low density lipoprotein
LDLR:	low-density lipoprotein receptor
mRNA:	messenger RNA
NR:	Non-responder, bzw. non-response, fehlendes virologisches Therapieansprechen
NS-Proteine:	Nicht-Strukturproteine
NTR:	nicht translatierte Region
PCR:	Polymerasekettenreaktion
PEG:	Polyethylenglykol

PEG Interferon alfa:	pegyliertes Interferon alfa;
RNA:	Ribonucleinsäure
RT:	Reverse Transkription
rpm:	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute während Zentrifugation
siRNA:	small interfering RNA
SR-BI:	scavenger Rezeptor BI
SVR:	sustained virologic response, dauerhaftes virologisches Therapieansprechen
Taq:	Thermus aquaticus
TM:	transmembrane Domäne
TTV:	TT-Virus
UV:	Ultraviolett

Zusammenfassung

Hintergrund: In vitro wurde die Ausbildung transmembraner Ionenkanäle durch das HCV p7-Protein und eine Hemmung der Kanalfunktion durch Amantadin gezeigt. Das Influenzavirus besitzt einen funktionell verwandten Ionenkanal (M2). Bei der Therapie der Influenza mit Amantadin kommt es rasch zu einer Selektion von Aminosäurevarianten die den inhibitorischen Effekt des Amantadins aufheben. In einer Pilotstudie wurde bei Patienten mit einer HCV-Subtyp 1b Infektion und einer Interferon alfa basierten antiviralen Kombinationstherapie mit Amantadin ein Trend zum häufigeren Vorkommen der Aminosäure-Substitution L20F bei virologischen Non-respondern im Vergleich zu virologischen Respondern gefunden. Darüber hinaus fanden sich in dieser Arbeit bei Patienten mit einer HCV 1b Infektion und Nichtansprechen auf eine antivirale Kombinationstherapie mit oder ohne Amantadin eine höhere Anzahl nicht-konservativer Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 als bei Patienten mit virologischem Ansprechen. Außerdem konnten in einer aktuellen Arbeit von StGelais und Mitarbeitern in vitro mögliche Resistenzmutationen des HCV p7 gegenüber dem Amantadin charakterisiert werden (StGelais et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit soll die mögliche Bedeutung von Aminosäurevarianten im HCV p7-Protein für das virologische Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie mit Amantadin in vivo überprüft werden.

Methoden: In der vorliegenden Arbeit wurde bei 221 konsekutiven Patienten mit einer chronischen HCV Genotyp 1 Infektion, die mit Amantadin/Placebo plus pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin innerhalb einer kontrollierten klinischen Studie behandelt worden waren retrospektiv das HCV p7-Gen untersucht. Dazu wurde von Serumproben vor Therapiebeginn die HCV RNA extrahiert, das HCV p7-Gen amplifiziert und nach einer direkten Sequenzierung die Aminosäuresequenz in Korrelation mit dem virologischen Therapieansprechen untersucht.

Ergebnisse: Die Aminosäuresubstitution L20F im HCV p7-Protein war weder mit dem virologischen Therapieansprechen noch mit dem Therapieregime mit oder ohne Gabe von Amantadin assoziiert. Die von StGelais und Mitarbeitern beschriebenen resistenten HCV p7-Varianten lagen in keinem einzigen Isolat der vorliegenden Arbeit vor. Weiterhin konnte auch keine Assoziation zwischen den Häufigkeiten von nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen innerhalb des HCV-1b p7 und dem Therapieansprechen bei mit Amantadin oder mit Placebo behandelten Patienten beobachtet werden. Die Häufigkeiten von nicht-konservativen Aminosäuresubstitutionen unterschied sich nicht zwischen Non-respondern bzw. Respondern der beiden Behandlungsarme.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen nicht die Hypothese, dass bei Patienten mit einer chronischen HCV Genotyp 1b Infektion präexistente Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 einen wesentlichen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber einer antiviralen Kombinationstherapie aus PEG-Intereron alfa 2a und Ribavirin sowie der zusätzlichen Gabe von Amantadin ausüben.

Summary

Background: Formation of transmembrane ion channels by HCV p7 and abrogation of channel function by amantadine was demonstrated in vitro. In the functionally related influenza M2 ion channel, amino acid substitutions abolish the inhibitory effect of amantadine. In a previous pilot study, amino acid substitution L20F within HCV-1b p7 was observed more often in virologic non-responders than responders to an interferon alfa based antiviral combination therapy with amantadine, although this effect was not statistically significant. In addition, in that study, patients with a HCV-1b infection and non-response to an antiviral combination therapy with or without amantadine showed a higher number of non-conservative amino acid variations within HCV p7 than responders. Furthermore, StGelais and coworkers recently characterized HCV p7 amino acid variations, that conferred resistance towards amantadine in vitro (StGelais et al. 2009).

The present study further investigates the relevance of HCV p7 amino acid variations for sensitivity of HCV to antiviral therapy with amantadine in a large and homogeneous cohort of patients with chronic hepatitis C genotype 1b infection receiving either amantadine or placebo in combination with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin.

Methods: In the present study, retrospective analysis of HCV p7 amino acid sequences of 221 patients with chronic HCV genotype 1 infection treated with amantadine/placebo plus pegylated interferon alfa-2a and ribavirin within a controlled clinical trial was performed. HCV RNA was extracted from baseline samples before initiation of antiviral therapy, amplified and amino acid sequences of HCV p7 obtained by direct sequencing were analyzed in correlation with virologic treatment response.

Results: Substitution L20F within the HCV p7 protein was neither associated with treatment response nor with treatment arms with or without application of amantadine. The amino acid variations of HCV p7 which were reported by StGelis and coworkers to confer resistance towards amantadine in vitro did not occur in the isolates of the present study. Furthermore, no association was observed between the frequencies of (non-conservative) amino acid substitutions within HCV-1b p7 isolates and treatment response in amantadine or placebo treated patients. The frequencies of amino acid substitutions did not differ between non-responders or responders, respectively, of the two treatment arms.

Conclusion: The results of the present study do not support a major impact of HCV p7 amino acid variations on sensitivity towards combination therapy of pegylated interferon alfa 2a and ribavirin with the additional application of amantadine in chronic HCV genotype 1b infection.

1. **Einleitung**

1.1 **Geschichte und Epidemiologie der Hepatitis C**

Ein Großteil aller Virushepatitiden (90%) werden durch 5 Viren ausgelöst, die mit Großbuchstaben von A bis E bezeichnet werden. Dabei werden fäkal-oral übertragbare Viren (Hepatitis A- und Hepatitis E-Virus) von parenteral übertragbaren Viren (Hepatitis B-, Hepatitis D- und Hepatitis C-Virus) unterschieden, wobei das Hepatitis D Virus auf eine vorhandene Hepatitis B Virusinfektion angewiesen ist. In den 60er bzw. 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurden erstmals die Hepatitisviren A (HAV), B (HBV) und D (HDV) beschrieben und eine routinemäßige Testung aller Blutspender auf eine HBV Infektion eingeführt. Dennoch blieben viele nach Bluttransfusionen aufgetretene Hepatitisfälle in ihrer Ursache ungeklärt (Feinstone et al. 1975). Der Gruppe von Michael Houghton der Chiron Corporation (USA) gelang es im Jahre 1988, das gesuchte parenteral übertragbare Non-A-Non-B-Hepatitis Virus aus Schimpansen mit Hilfe einer Genexpressions-Bibliothek zu identifizieren. Durch Sequenzierung sich überlappender cDNA Klone konnte schließlich die gesamte Nukleotid-Sequenz dieses Non-A-Non-B-Virus-Genoms dargestellt werden, welches als Hepatitis C Virus (HCV) bezeichnet wurde (Choo et al. 1989). 60 – 80% der Fälle einer Posttransfusionshepatitis erwiesen sich als Infektion mit dem HCV (Kuo et al. 1989).

Die chronische Hepatitis C stellt mit weltweit etwa 170 – 200 Millionen infizierten Menschen ein globales Gesundheitsproblem dar. Betroffen sind ca. 3% der Weltbevölkerung und es wird davon ausgegangen, dass sie für ca. 250.000 bis 350.000 Todesfälle im Jahr verantwortlich ist. In Deutschland muss bei einer HCV Antikörper-Prävalenz von 0,4-0,6% und einer Chronifizierungsrate von ca. 70-80% mit ca. 500.000 Patienten mit chronischer Hepatitis C gerechnet werden, wobei nur bei einem Bruchteil von ca. 1/4 bis 1/5 der Patienten die Diagnose bekannt ist (Palitzsch et al. 1999). Im Verlauf der Erkrankung besteht das Risiko der Entwicklung einer Leberfibrose mit dem Endstadium der Leberzirrhose und das Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (NIH 2002). Eine Leberzirrhose auf dem Boden

einer chronischen Hepatitis C stellt eine häufige Indikation zur Lebertransplantation dar. Die akute und chronische HCV-Infektion verläuft oftmals subklinisch und die Diagnose wird häufig zufällig im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung, Blutspende, Operation oder aufgrund einer Abklärung unklar erhöhter Leberwerte gestellt.

Die Transmission des Hepatitis C-Virus erfolgte bisher vor allem parenteral durch kontaminierte Blutprodukte, intravenösen Drogenkonsum, nicht genügend sterilisierte Instrumente und Nadelstichverletzungen durch Kanülen. Nach der Entdeckung des HCV im Jahr 1988/89 (Choo et al. 1989) wurde bereits 1990 ein generelles Screening aller Blutprodukte auf HCV Antikörper eingeführt, das aktuell in vielen Ländern zusätzlich durch ein Screening auf HCV RNA ergänzt wurde. Das Risiko einer Übertragung des HCV durch Blut und Blutprodukte ist daher heutzutage in den Industrienationen vernachlässigbar gering. Eine sexuelle sowie perinatale Übertragung der Hepatitis C ist möglich, aber im Vergleich zu den Hauptübertragungswegen selten (Zeuzem et al. 1995). Bei etwa 30 – 40% der Patienten bleibt der Übertragungsweg unklar. Eindeutige Hinweise für nicht-parenterale Übertragungswege liegen jedoch nicht vor.

1.2 Krankheitsbild und Verlauf

Eine akute Hepatitis-C-Infektion zeigt in den meisten Fällen kaum klinische Symptome. Häufig geht sie mit grippeartigen Symptomen, wie beispielsweise unspezifischen Oberbauch-Beschwerden, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, oder auch Juckreiz und Gelenkbeschwerden einher. Ca. 70 – 80 % aller HCV-Infektionen gehen in chronische Formen über (Wiese et al. 2000), die klinisch ebenfalls zumeist unauffällig sind. Ein chronischer Verlauf ist dann anzunehmen, wenn die HCV-RNA länger als 6 Monate nachweisbar ist. Typischerweise, finden sich im Serum bei der chronischen Form nur leicht bis mäßig erhöhte Enzymaktivitäten von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT i. S.) und Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT i. S.). Bei rund 20 % der chronisch Infizierten entwickelt sich nach jahrelanger Latenzzeit eine Leberzirrhose. Die Zeitdauer von der akuten Infektion bis zum Vollbild einer

Zirrhose beträgt häufig ca. 20 bis 30 Jahre. Mit zunehmender Infektionsdauer nimmt die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Leberzirrhose vermutlich nicht-linear zu. Die Entwicklung von primären hepatozellulären Karzinomen bei ca. 5% der Zirrhose-Patienten pro Jahr, gelegentlich auch in früheren Fibrosestadien, verleiht der Erkrankung eine erhebliche klinische und gesundheits-ökonomische Bedeutung (El-Serag 2002; Hoofnagle 2002; Seeff 2002).

1.3 HCV Genotypen und geographisches Verteilungsmuster

Das Hepatitis-C-Virus gehört zu der Familie der Flaviviridae und der Gattung der Hepaciviren. Wie bei den meisten RNA-Viren besitzt die RNA-abhängige Polymerase keine Proof-Reading-Aktivität, und damit keine Lesekorrektur nach der Replikation. Daher weist das Hepatitis-C-Virus eine hohe Mutationsrate von durchschnittlich 2×10^{-3} Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr auf, welche zu der großen Heterogenität der vorhandenen Isolate führt (Ogata et al. 1991). Mittels phylogenetischer Analysen der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der für das NS5B-Protein kodierenden Genomregion konnten bis heute 7 verschiedene HCV-Genotypen 1-7 differenziert werden, deren Genomhomologie auf Aminosäureebene 66-70% beträgt. Diese lassen sich weiter in enger miteinander verwandte Subtypen (Genomhomologie 77-80%), welche mit den Buchstaben *a*, *b*, *c*, ... gekennzeichnet sind (z.B. 1a, 1b, 1c), und einzelne Isolate (Genomhomologie 91-95%) aufteilen (Simmonds et al. 1993; Bukh et al. 1995). Die neuere Einteilung von Simmonds et al. unterscheidet nur noch sechs Genotypen mit einer Genomhomologie von mindestens 66-69% innerhalb der einzelnen Genotypen (Simmonds et al. 2005). Durch die hohe Sequenzvariation und die ungenaue Replikation des HCV-Genoms bilden sich innerhalb eines Patienten verschiedene Populationen aus, welche sich nur in ebenfalls zahlreichen Basenpositionen (Homologie > 90%) unterscheiden. Diese bezeichnet man als Quasispezies (Kao et al. 1995). Der Mensch ist neben dem Schimpansen der einzige bekannte Wirt des HCV. Die weltweite Verteilung der HCV-Genotypen ist unterschiedlich. So findet man in den westlichen Industrienationen sowie in Japan vorwiegend die Genotypen

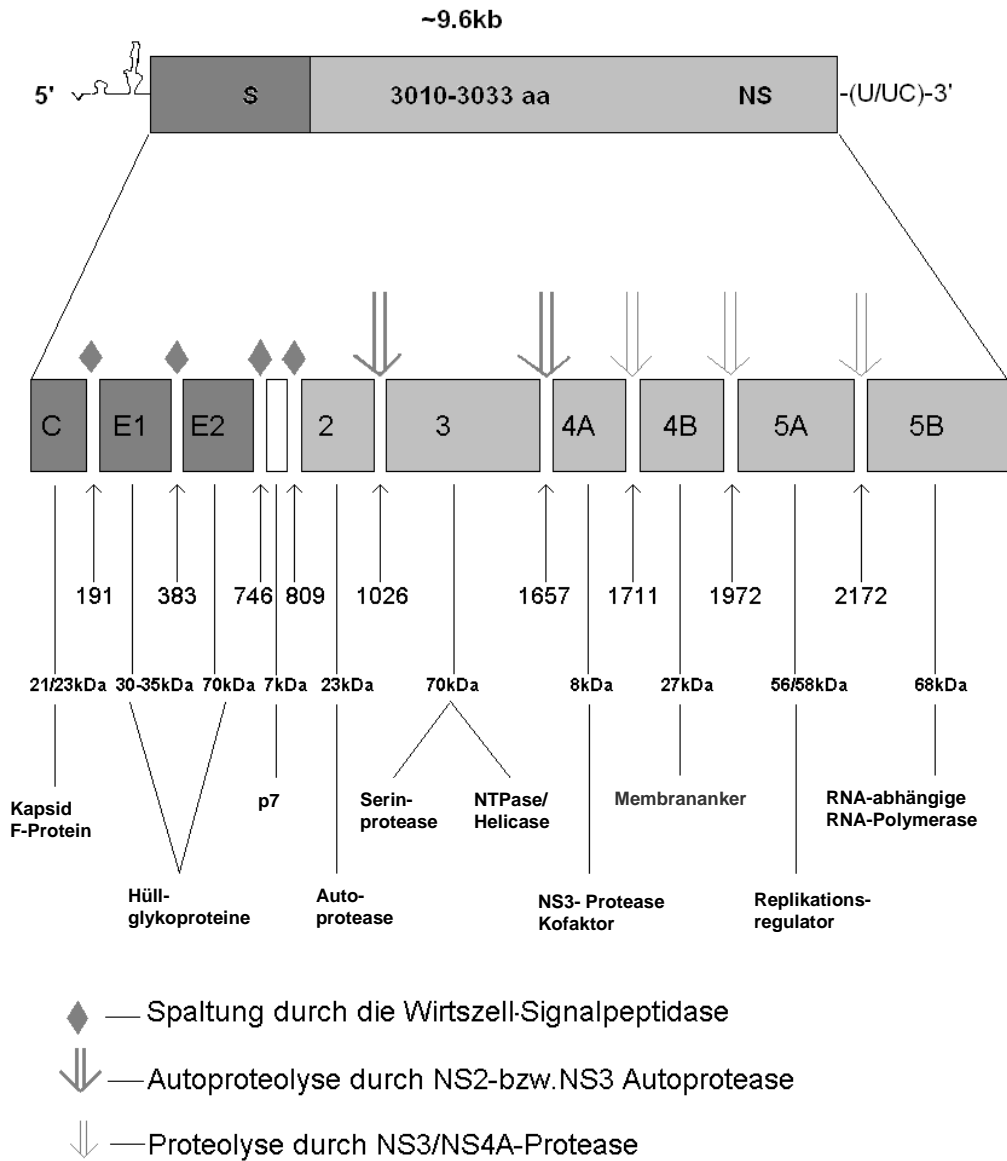
1, 2 und 3, während der Genotyp 4 in Zentral-, West-Afrika und in Saudi-Arabien häufig anzutreffen ist. Der Genotyp 5 ist im Wesentlichen in Süd-Afrika, und der Genotyp 6 in Süd-Ost Asien anzutreffen, während der ehemalige Genotyp 7, der nun zum Genotyp 6 (Geno-Subtypen 6c-6f) gezählt wird, mutmaßlich aus Zentralafrika stammt (Simmonds et al. 2005). In Deutschland herrscht der Genotyp 1 vor, wobei der Subtyp 1b über 1a dominiert. Diese beiden Subtypen machen deutschlandweit zusammen etwa 50 bis 70% aller Infektionen aus. Ein Einfluss einer Infektion mit einem bestimmten HCV Genotyp auf den natürlichen Verlauf der HCV Infektion ist nicht bekannt. Allerdings finden sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen bezüglich dem virologischen Ansprechen auf eine antivirale Therapie (Chemello et al. 1994). Die Behandlung der chronischen Hepatitis C-Infektion besteht aus einer Kombination von pegyliertem Interferon alfa mit Ribavirin. Mit Hilfe dieser Therapie kann eine anhaltende Viruseradikation in 54% - 63% der Fälle erreicht werden (Manns et al. 2001; Fried et al. 2002). Patienten mit einer HCV Genotyp1-Infektion zeigen nach 48 Wochen Kombinationstherapie ein anhaltendes virologisches Ansprechen in 33% – 52%. HCV-Genotyp 2 oder 3 infizierte Patienten zeigen nach 24 Wochen ein anhaltendes Ansprechen in mehr als 80% der Fälle (Manns et al. 2001).

1.4 Molekulare Struktur des HCV

Das HCV-Virion ist aus einem einzelsträngigen positiven RNA-Genom aufgebaut, das von einem Kapsid umschlossen wird, welches wiederum von einer Lipid-Doppelmembran eingehüllt ist. Der Durchmesser des Virus wird mit 50 nm angegeben. Das HCV-Genom besitzt eine Länge von ca. 9600 Basen, und ein zusammenhängendes offenes Leseraster (open reading frame), welches von zwei nicht translatierten Regionen eingefasst wird und später in ein Vorläufer-Polyprotein übersetzt wird. Das kurze 5`-Ende der nicht translatierten Region des HCV (NTR; ca. 340 Nukleotide) enthält Domänen, die in das Priming des positiven Stranges während der HCV-Replikation involviert sind, und eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRBS), eine RNA-Struktur, die für eine Ribosomen-Anlagerung und für die Translation verantwortlich ist (Penin et

al. 2004). Das Polyprotein von ca. 3010 Aminosäuren wird co- und post-translational an mehreren Stellen durch Wirts-Signalpeptidasen und durch HCV-codierte Proteasen zur Produktion von letztendlich drei Strukturproteinen (Kapsid-Protein C, und den zwei Hüll-Glycoproteinen E1 und E2) und sechs Nicht-Struktur (NS) – Proteinen (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, und NS5B) gespalten (Abb.1). Das Kapsid-Protein interagiert mit der viralen RNA und bildet das Nucleokapsid. Zusätzlich scheint durch eine Verschiebung des Leserasters auch ein F-Protein hergestellt zu werden, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. E1 und E2 sind stark glykosylierte Virushüll-Proteine, die mit Plasmamembranen von Hepatozyten und anderen Zellen interagieren können. E1 und E2 sind in der Lage, Heteromer-Komplexe zu bilden, wobei nicht geklärt ist, ob ihre Verbindung für die Bindung an Zellmembranen notwendig ist (Tan et al. 2002). Für die beiden Proteine NS4B und NS5A konnte die Funktion noch nicht abschließend geklärt werden (Penin et al. 2004). Das NS4B Protein ist aber anscheinend für die Verankerung des Replikationskomplexes am ER verantwortlich, während das NS5A Protein eine wichtige Regulatorfunktion für die Replikation aufweist und möglicherweise für das Ansprechen auf eine Interferontherapie von Bedeutung ist (Moradpour et al. 2007; Wohnsland et al. 2007). Das Polyprotein kodiert die Strukturproteine sowie Enzyme bzw. Proteine, die die Replikation des HCV-RNA-Genoms katalysieren und regulieren. Die Prozessierung des HCV-Polypeptides wird durch Wirtsproteasen sowie zwei viral-kodierte Proteasen katalysiert (Abb. 1) (Tan et al. 2002). Die NS2-NS3 zink-abhängige Metalloproteinase durchläuft zur Produktion von NS2 und NS3 eine autokatalysierte Spaltung (Reed und Rice 2000). Die freigesetzte NS3-Serinprotease katalysiert die Spaltung des NS-Polyproteins zur Freisetzung von NS4A, NS4B, NS5A und NS5B, die, zusammen mit NS3 und möglichen zellulären Proteinen, den Replikations-Komplex oder die „Replicase“ des HCV bilden (Tan et al. 2002). Das 3´-Ende des Genoms beinhaltet eine nicht kodierende Region, die vermutlich in das Minus-Strang-Priming während der HCV-Replikation involviert ist. Die 3´UTR wurde in drei Regionen unterteilt: in eine variable Sequenz von annäherungsweise 40 Basen, einen längenvariablen poly-UC-reichen Abschnitt, und eine hochkonservierte 98-Basen-Region.

Abbildung 1: Darstellung des HCV-Genoms, des Ablaufs der Translation und der Aufteilung der Proteine



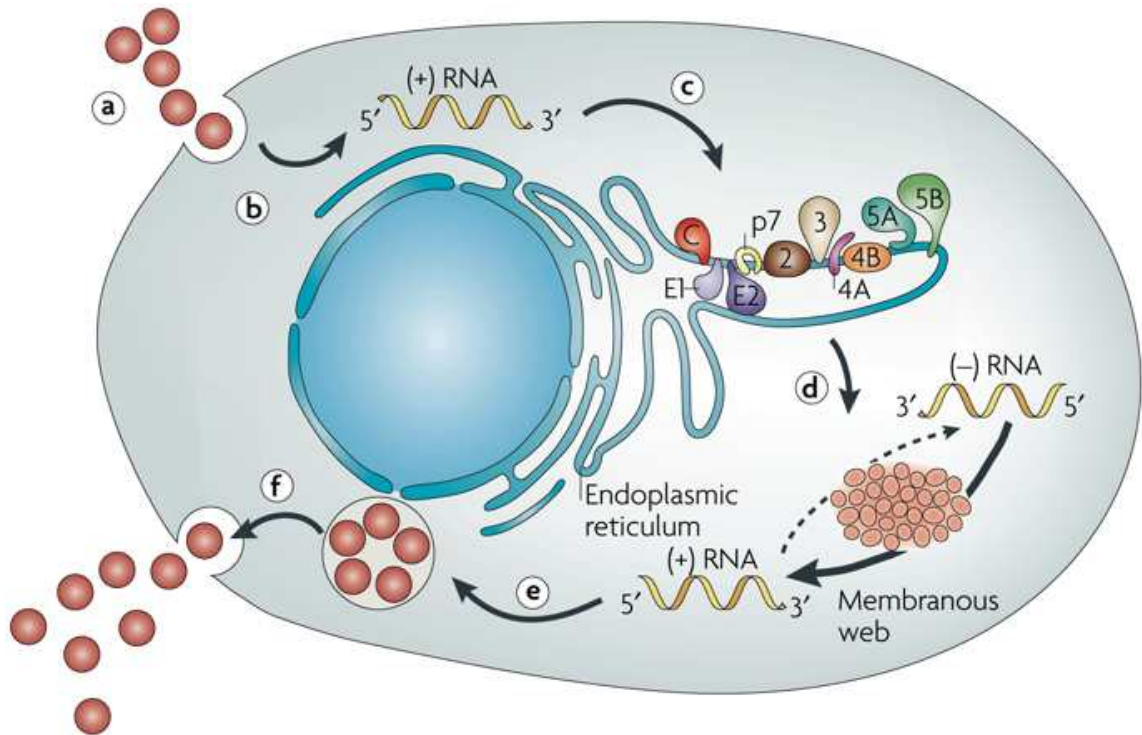
Die dünnen Pfeile sind mit der Nummer der Aminosäure jeweils an der Schnittstelle des Polyproteins bezeichnet. Die Zählung erfolgt nach dem HCV 1b Prototyp HCV-J. Modifiziert nach Kato et al. (Kato et al. 1990).

Abbildung modifiziert nach R. Bartenschlager (Bartenschlager 1999).

Der Lebenszyklus des HCV beginnt mit dem Eintritt in die Zielzelle, der über die Interaktion mit verschiedenen zellulären Rezeptoren vermittelt wird. Bisher wurden für den Zelleintritt die Interaktion des HCV mit vier Rezeptoren (CD81, SR-BI, Claudin-1 und Occludin) nachgewiesen (Pileri et al. 1998; Scarselli et al. 2002; Evans et al. 2007; Ploss et al. 2009). Weiterhin sind der LDL-Rezeptor

und Glykosaminoglykane (GAGs) für eine effektive Aufnahme des Virus in die Zelle von Bedeutung (Agnello et al. 1999; Barth et al. 2003). In Analogie zu anderen Flaviviridae wird das an seinen Rezeptorkomplex gebundene Virus internalisiert und anschließend das Nukleokapsid in das Zytoplasma freigesetzt. Die genomische HCV-RNA wird gleichermaßen für die Polyprotein-Translation und die Replikation im Zytoplasma genutzt. Die Replikation und die post-translationale Prozessierung scheinen in einem perinukleär lokalisierten Netz aus Membranen am ER (membranous web) stattzufinden, das im Wesentlichen aus dem NS4B Protein und aus Wirtszellproteinen aufgebaut ist und als Replikationskomplex zusätzlich die HCV Proteasen, NS5A Replikase und RNA-abhängige RNA-Polymerase enthält. Im Golgi-Apparat werden vermutlich die Nukleokapside eingehüllt und reifen aus, bevor neu produzierte Virione in den Perizellularraum durch Exozytose freigesetzt werden (Abb 2) (Penin et al. 2004).

Abbildung 2: Darstellung des Replikationszyklus des Hepatitis C Virus



Replikationszyklus des Hepatitis C Virus:

a) Virusanlagerung und Internalisierung, b) cytoplasmatische Freisetzung, c) Translation über die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) und Prozessierung des Polyproteins, d) RNA-Replikation, e) Einhüllung und Zusammenbau, f) Reifung des Virions und Freisetzung.
*IRES: internal ribosome entry site, interne Ribosomen-Bindungsstelle.

Die Topologie der Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine des Hepatitis C-Virus an der Membran des endoplasmatischen Retikulums ist schematisch dargestellt. Die RNA-Replikation des Hepatitis C-Virus findet in einem perinukleären Netz aus Membranen, dem „membranous web“, statt, welches am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Es sollte berücksichtigt werden, dass die IRES-vermittelte Translation und die Prozessierung des Polyproteins, genauso wie die Formation des membranous web und die RNA-Replikation, die hier zur Vereinfachung als getrennte Schritte dargestellt werden, möglicherweise in einem eng aneinandergeschlossenen Ablauf stattfinden (Moradpour et al. 2007).

1.4.1 HCV p7-Protein

Das p7 ist ein kleines hydrophobes Protein aus 63 Aminosäuren, das zwischen den für die Strukturproteine und die Nicht-Strukturproteine kodierenden Bereich des Polyproteins lokalisiert ist. Es wird davon ausgegangen, dass es aus zwei transmembranen α -Helices besteht, die über eine kleine zytoplasmatische Schleife miteinander verbunden sind (Carrere-Kremer et al. 2002; Clarke et al. 2006; Patargias et al. 2006; Haqshenas et al. 2007; Chew et al. 2009; Cook und Opella 2009; Luik et al. 2009; StGelais et al. 2009; Montserret et al. 2010). Neuere Studien haben gezeigt, dass es Membran-assoziiert vorliegt und vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Wohnsland et al. 2007). Die Rolle des HCV p7-Proteins im Lebenszyklus des Hepatitis C-Virus ist bislang unklar (Lin et al. 1994). Durch zelluläre Signalpeptidasen wird das p7-Protein am endoplasmatischen Retikulum gespalten (Lin et al. 1994; Mizushima et al. 1994; Mizushima et al. 1994). Dabei entsteht zunächst ein E2-p7-NS2-Prekursor-Protein (Dubuisson et al. 1994). Die Spaltung zwischen E2 und p7 scheint zum Teil unvollständig stattzufinden, so dass als Endprodukte ein E2-p7-Protein und auch die einzelnen Proteine vorliegen. Die beiden Amino (N)- und Carboxyl (C)-terminalen Enden des Proteins sind in Richtung des ER-Lumens orientiert (Carrere-Kremer et al. 2002). Im Jahre 2003 wurde von Griffin und seinen Kollegen erstmals die Fähigkeit des HCV p7-Proteins zur Oligomerisation und Kanalbildung in künstlichen Lipidmembranen demonstriert. Die Kanalfunktion des p7 sowie die Substanzen, die die Ionenleitfähigkeit des Kanals blockieren (vor allem Amantadin, Alkyl-Langketten-Iminozucker-Derivate, Hexamethylen Amilorid), wurden von mehreren Arbeitsgruppen in vitro und in vivo untersucht. Dabei blockierte die gleiche Konzentration von Amantadin, die zur Hemmung der Kanalfunktion des Influenza M2-Proteins in Zellkulturen führte (Pinto et al. 1997), auch die Aktivität des p7-Kanals (Griffin et al. 2004). Aufgrund dieser Funktion eines viralen Ionenkanals wurde das HCV p7 der Gruppe der Viroporine zugeordnet (siehe 1.4.2) (Griffin et al. 2003; Pavlovic et al. 2003; Griffin et al. 2004; Premkumar et al. 2004). In der Arbeit von Griffin und seinen Kollegen im Jahr 2004 wurde die Notwendigkeit der hochkonservierten basalen Schleife für die Aktivität des p7-Proteins als Ionenkanal vermutet. Aminosäureaustausche in dieser Region führten zur

deutlichen Reduktion der Kanalaktivität. Alle Experimente in dieser Studie wurden mit Hilfe des Hämadsorption-Assays durchgeführt. Dieses zellbasierte System wurde auch bei den früheren Untersuchungen für die Messung der Protonenkanalaktivität des Influenza M2-Proteins verwendet. Dabei zeigte sich die Abhängigkeit des Hämagglutinin-Transports an die Zelloberfläche in exozytotischen Vesikeln von der pH-regulierenden Funktion des M2-Protonenkanals (Takeuchi und Lamb 1994). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die p7-Funktion in diesem System die Ansäuerung der Vesikel mit Hämagglutinin in gleichem Maße verhindert, wie das Influenza M2-Kanalprotein (Griffin et al. 2004). In vivo Experimente mit Schimpansen zeigten einen Einfluss des p7-Proteins auf die Infektiosität des HCV mittels direkter intrahepatischer Transfektion der p7-mutagenisierten infektiösen HCV-Genotyp 1a-Klone. Sowohl die Mutanten mit der Deletion des gesamten p7-Proteins als auch die Mutanten mit der Substitution von zwei hochkonservierten Aminosäuren in der zytoplasmatischen Schleife (Lysin 779 und Arginin 781) verursachten keine Virämie nach zwei unabhängigen Transfektionen (Sakai et al. 2003). Weiterhin hat eine Studie von mutierten p7-Varianten gezeigt, dass p7 an der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln beteiligt ist. Mutierte p7-Proteine und p7-Deletions-Mutanten verminderten die Virusfreisetzung in transfizierten Huh-7-Zellen beträchtlich (Steinmann et al. 2005).

1.4.2 Viroporine

Viroporine sind kleine, hydrophobe, viruskodierte Proteine, die mehrere Virus- und Zellfunktionen beeinflussen. Dazu gehören der Zusammenbau der Viruspartikel („assembly“), die Freigabe der Viruspartikel von der Zelle („release“), das zelluläre Vesikel-System und die Membranpermeabilität. Zu dieser Gruppe der Viroporine gehören unter anderem: das Poliovirus 2B, alpha-Virus 6K, HIV-1 Vpu und das Influenza A-Virus M2 Protein. Diese Virusproteine umfassen ca. 60 bis 120 Aminosäuren und enthalten hydrophobe transmembrane Domänen in Form von α -Helices. Der Einbau dieser Proteine in die doppelschichtigen Phospholipidmembranen führt zur Entstehung hydrophiler Poren und hierdurch zu einer Konzentrationsgradient-abhängigen

Passage von Ionen und kleinen Molekülen durch die Membranen. Eine Störung dieser Kanalaktivität durch verschiedene Substanzen vermindert die Virusproduktion und Virusinfektiosität. Diese Wirkung stellt ein attraktives Ziel in der Entwicklung neuer Methoden und Strategien in der antiviralen Therapie der Hepatitis C dar (Gonzalez und Carrasco 2003). Aufgrund der strukturellen Merkmale des HCV-p7-Proteins, seiner Lokalisation im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums sowie der Funktion als viruskodierter Ionenkanal kann es in die Gruppe der Viroporine eingeteilt werden (Griffin et al. 2003).

1.5 Therapie der chronischen Hepatitis C

Die aktuelle Standardtherapie der chronischen Hepatitis C ist die Kombination aus pegyliertem Interferon alfa und Ribavirin. Ziel der antiviralen Therapie ist ein anhaltendes Therapieansprechen, „sustained virological reponse“ (SVR), definiert durch eine nicht mehr nachweisbare HCV-RNA im Serum 24 Wochen nach Therapieende. Die HCV-RNA muss dabei im HCV-RNA Assay unterhalb der Nachweisgrenze eines sensitiven Assays liegen (<10-50 IU/ml) (NIH 2002).

Interferon alfa wurde erstmals im Jahr 1986 für die Behandlung der chronischen Non-A-Non-B Hepatitis eingesetzt und führte unter der Therapie zur Normalisierung der Transaminasen bei ca. 10 – 15% der Patienten (Hoofnagle 1999). Bei Interferonen handelt es sich um körpereigene Zytokine, die antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkungen besitzen. Diese Wirkungen werden über spezifische Rezeptoren vermittelt. Die beim Menschen vorkommenden vier Typen von Interferonen werden in zwei Hauptgruppen mit verschiedenen Rezeptoren und Wirkungsweisen unterteilt: Typ I (α und β), Typ II (γ) und Typ III (λ oder IL28/29) (Ank et al. 2006). Natürliches Interferon alpha wird von Monozyten und transformierten B-Zell-Linien als Antwort auf Virusinfektion und Antigenstimulation produziert. Die Wirkung von Interferon alpha besteht in der Induktion verschiedener direkter und indirekter antiviraler Mechanismen, wie intrazelluläre Degradation eingedrungener viraler RNA, Hemmung der viralen RNA-Translation und

Aktivierung einer zellulären und humoralen Immunantwort zur Erkennung infizierter Zellen (Guterman 1994). Nach der Erstbeschreibung des Hepatitis C Virus wurde in zahlreichen kontrollierten und randomisierten Studien die Wirksamkeit der Interferon alfa-Therapie bei chronischer Hepatitis C bestätigt, jedoch ließ sich eine dauerhafte Viruselimination bei maximal 25% der Patienten erreichen (Zeuzem et al. 1995). Eine Verbesserung der Ansprechraten gelang durch die Kombination von Interferon alfa mit Ribavirin (McHutchison und Poynard 1999).

Ribavirin (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid) ist ein Guanosin-Analogon, das vor mehr als 35 Jahren synthetisiert wurde und das *in vitro* eine antivirale Aktivität gegen mehrere RNA- und DNA-Viren aufweist (Sidwell et al. 1972). Im Jahre 1991 wurde gezeigt, dass eine Ribavirin-Monotherapie zu einer Abnahme der Aktivität der Alaninaminotransferase bei einem signifikanten Anteil an Patienten führt (Di Bisceglie et al. 1992). Bei der Mehrheit der Patienten, die eine Ribavirin-Monotherapie bekamen, wurde keine signifikante Reduktion der HCV-RNA Konzentration beobachtet, was darauf schließen lässt, dass eine Ribavirin-Monotherapie keine oder nur eine geringe Auswirkung auf das HCV hat (Pawlotsky et al. 2004). Eine dauerhafte Viruseradikation ließ sich mit einer Ribavirinmonotherapie in keinem Fall erreichen.

Bei der Kombinationstherapie über 48 Wochen mit 3 x 3 Mio. Einheiten Interferon alfa pro Woche subkutan in Kombination mit einer Dosierung von 1000-1200 mg Ribavirin pro Tag konnte dagegen eine Viruseradikation bei bis zu 41% der Patienten erreicht werden (McHutchison und Poynard 1999). Als Wirkmechanismus des Ribavirins werden eine Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und der viralen RNA-abhängigen Polymerase sowie immunmodulierende Eigenschaften und mutagene Effekte diskutiert (Sidwell et al. 1972). Einen weiteren Fortschritt in der Therapie der chronischen Hepatitis C Virus -Infektion bewirkte die Verwendung von Interferon alfa, das mit Polyethylenglykol (PEG) konjugiert ist. Durch diese Kopplung wurde eine bis zu 10-fache Verlängerung der Halbwertszeit erreicht, so dass eine einwöchentliche Injektion ausreicht, um einen relativ konstanten Wirkspiegel im

Serum aufrecht zu erhalten. Die Kombinationstherapie von Peginterferon alfa-2a bzw. 2b und Ribavirin wurde in mehreren Studien untersucht und zeigte dauerhafte Viruseliminationsraten bei Patienten mit einer Genotyp 1 Infektion in 40-50% der Fälle und bei Patienten mit einer Genotyp 2 oder 3 Infektion in 80-90% der Fälle (Manns et al. 2001). Aufgrund der nach wie vor unbefriedigenden Therapieerfolge bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion und wegen der Nebenwirkungen der verfügbaren Therapien wird kontinuierlich an der Optimierung der Behandlung der chronischen Hepatitis C gearbeitet.

1.5.1 Amantadin

Amantadin ist ein synthetisches trizyklisches Amin und wird nach oraler Gabe vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und unverändert mit dem Urin ausgeschieden, wobei geringe Mengen über den Stuhl eliminiert werden (Aoki und Sitar 1988). Bei der Therapie der Influenza A Infektion wird Amantadin seit langem eingesetzt und der antivirale Wirkmechanismus ist gut charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die antivirale Wirkung des Therapeutikums durch eine direkte Interaktion mit dem M2-Protein des Influenza A Virus vermittelt wird. Dieses Protein fungiert als ein viraler Protonenkanal (Duff und Ashley 1992; Pinto et al. 1992), indem es ein homotetrameres transmembranes α -Helix-Bündel formt (Sakaguchi et al. 1997), welches als H^+ -Kanal fungiert. Diese Aktivität spielt eine entscheidende Rolle im viralen Lebenszyklus. Durch die Aktivierung des M2-Kanals nach der endozytotischen Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle und Hämagglutinin-induzierter Fusion der Virushülle mit der Membran des Endosoms kommt es zur Ansäuerung des Virusinneren durch den Protonendurchtritt durch die Hülle. Im sauren Milieu lockert sich die Verbindung zwischen der viralen RNA und dem Nukleokapsid. Dies resultiert in der Freilegung der viralen Nukleinsäure („uncoating“) in der infizierten Zelle (Martin und Helenius 1991). Außerdem verhindert die Funktion des Protonenkanals durch die Regulation des pH-Wertes in den Golgi-Vesikeln die vorzeitige Induktion der Fusionsaktivität im Infektionszyklus (Sugrue et al. 1990). Es konnte gezeigt werden, dass der

Influenza M2 Ionenkanal durch Amantadin blockiert wird (Duff und Ashley 1992; Pinto et al. 1992). Mutationen einzelner Aminosäuren in der transmembranen Domäne des M2-Proteins verursachen eine Resistenzentwicklung gegenüber Amantadin (Hay et al. 1985). Der Stellenwert von Amantadin in der Therapie der chronischen Hepatitis C war lange Zeit umstritten. In vitro Studien beschreiben eine direkte Interaktion des Amantadin mit dem beschriebenen HCV p7-Protein, welches in vitro zu einem Ionenkanal homooligomerisiert. Amantadin blockiert in vitro die Leitfähigkeit dieses p7-Ionenkanals (Lin et al. 1994; Carrere-Kremer et al. 2002; Griffin et al. 2003; Griffin et al. 2004; StGelais et al. 2007; Griffin et al. 2008). Damit existiert theoretisch ein plausibler Wirkmechanismus für Amantadin gegenüber dem HCV. In einer Studie von Goff und Mitarbeitern, die die Effizienz einer Monotherapie mit einer konstanten Amantadindosis von 200 mg täglich über durchschnittlich 4,5 Monate bei 24 Hepatitis C infizierten Patienten evaluierte, konnte zwar ein Abfall des Virus-Titers bei 11 von 24 Patienten, jedoch eine vollständige Suppression des Virus bei keinem der Patienten beobachtet werden (Goff et al. 2000). Im Anschluss daran durchgeführte klinische Studien zum möglichen zusätzlichen Nutzen einer Amantadiningabe im Rahmen einer antiviralen Kombinationstherapie der chronischen Hepatitis C ergaben kontroverse Ergebnisse. So zeigten sich bei einigen Arbeitsgruppen mäßige Verbesserungen der dauerhaften Viruseliminationsraten (Caronia et al. 2001; Mangia et al. 2001; Tabone et al. 2001; Helbling et al. 2002), während eine Metaanalyse aus 6 kontrollierten Studien eine signifikant bessere Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus Amantadin und Interferon alfa im Vergleich zur Interferon alfa-Monotherapie nachweisen konnte (Mangia et al. 2004). Eine andere Metaanalyse aus 31 randomisierten kontrollierten Studien zeigte, dass bei Patienten mit Nicht-Ansprechen auf eine Interferon alfa basierte Therapie eine kombinierte antivirale Therapie mit Amantadin, Interferon alfa und Ribavirin zur signifikanten Verbesserung der dauerhaften Viruselimination führte (Deltenre et al. 2004). In einer Studie mit 400 vorher unbehandelten Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde eine Zunahme des Anteils an Patienten mit dauerhaftem virologischem Ansprechen unter dreifacher Therapie mit Interferon alfa/Ribavirin/Amantadin im Vergleich zur Therapie mit Interferon alfa /Ribavirin/Placebo festgestellt (Berg et al. 2003). Dagegen stehen jedoch

eine Studie von Zeuzem und Mitarbeitern und insbesondere die zuletzt durchgeführte größte randomisierte Placebo-kontrollierte Studie von von Wagner, die keine Vorteile einer zusätzlichen Amantadingabe für das dauerhafte virologische Ansprechen bei der Therapie der chronischen Hepatitis C nachweisen konnten (Zeuzem et al. 2000; von Wagner et al. 2008). In Anbetracht der Diskrepanz zwischen vorhandener Wirksamkeit in vitro und zweifelhafter antiviraler Effektivität in vivo, besteht die Möglichkeit, dass das HCV in vivo über Resistenzmechanismen gegenüber Amantadin verfügt. Präexistente oder während einer Therapie sich ausbildende Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 könnten, analog dem Resistenzmechanismus beim Influenza M2 Protein, eine Erklärung für eine Resistenz des HCV gegenüber Amantadin in vivo bieten. Interessanterweise wurde in einer Vorarbeit bei Patienten mit einer HCV-Subtyp 1b Infektion und einer Interferon alfa basierten antiviralen Kombinationstherapie mit Amantadin ein, wenn auch statistisch nicht signifikanter, Trend zum häufigeren Auftreten der Aminosäure-Substitution L20F bei fehlendem virologischem Ansprechen im Vergleich zu Patienten mit vorhandenem virologischem Ansprechen gefunden. Durch in silico Modellierung wurde gezeigt, dass sich die Position der Aminosäure 20 dem Kanallumen zugewandt befindet, und dass die L20F-Substitution die Interaktion mit Amantadin durch Veränderung von Größe und Form des p7-Ionenkanals abschwächen könnte (Mihm et al. 2006). Darüber hinaus wiesen in dieser Arbeit Patienten mit einer HCV 1b Infektion und Nichtansprechen auf eine antivirale Kombinationstherapie mit oder ohne Amantadin eine höhere Anzahl nicht-konservativer Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 auf als Patienten mit virologischem Ansprechen. Außerdem konnten in einer aktuellen Arbeit von StGelais und Mitarbeitern in vitro mögliche Resistenzmutationen des HCV p7 gegenüber dem Amantadin charakterisiert werden (StGelais et al. 2009).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die chronische Hepatitis C Virus - Infektion ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms. Die Behandlungserfolge mit der derzeitigen Standard-Therapie, einer Kombination aus pegyliertem Interferon alfa und Ribavirin sind nach wie vor unbefriedigend. Die dauerhaften Heilungsraten betragen 46-52% bei Patienten mit einer Hepatitis C Virus Genotyp 1 Infektion. In der jüngeren Vergangenheit wurde immer wieder versucht, diese Heilungsraten durch Hinzunahme von Amantadin zur Interferon alfa-basierten antiviralen Kombinationstherapie zu verbessern.

In vitro Studien beschreiben eine direkte Interaktion des Amantadin mit dem HCV p7-Protein. Amantadin blockiert in vitro die Leitfähigkeit dieses p7-Ionenkanals (Lin et al. 1994; Carrere-Kremer et al. 2002; Griffin et al. 2003; Griffin et al. 2004; StGelais et al. 2007; Griffin et al. 2008). Damit existiert theoretisch ein plausibler Wirkmechanismus für Amantadin gegenüber dem HCV. Dennoch liefern klinische Studien zum möglichen Benefit einer Amantadinegabe im Rahmen einer antiviralen Kombinationstherapie der chronischen Hepatitis C kontroverse Ergebnisse und eine aktuelle große randomisierte Placebo-kontrollierte Studie konnte keine Steigerung der dauerhaften virologischen Ansprechraten unter der Hinzunahme von Amantadin zur bisherigen Standardtherapie bei der Behandlung von therapie-naiven Patienten mit chronischer Hepatitis C Genotyp 1 Infektion nachweisen (Berg et al. 2003; Deltenre et al. 2004; Mangia et al. 2004; Maynard et al. 2006; von Wagner et al. 2008). In Anbetracht der Diskrepanz zwischen vorhandenem plausiblen Wirkmechanismus in vitro und zweifelhafter antiviraler Effektivität in vivo, scheint das HCV in vivo über Resistenzmechanismen gegenüber dem Amantadin zu verfügen.

Bei einer anderen Viruserkrankung, der Influenza Virus Infektion, wird die antivirale Wirkung des Amantadin über eine Interaktion mit dem Influenza M2 Protein vermittelt (Hay et al. 1985; Duff und Ashley 1992). Das Influenza M2 Protein ist ein Ionenkanal und Viroporin und scheint funktionell mit dem HCV p7-Protein verwandt zu sein. Mutationen im Influenza M2 Protein führen zu

einer Resistenz des Virus gegenüber Amantadin in vitro und in vivo (Hay et al. 1985; Suzuki et al. 2003).

Präexistente oder während einer Therapie sich ausbildende Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7, wie beispielsweise der Trend zum häufigeren Auftreten der Aminosäure-Substitution L20F in Korrelation mit einem fehlenden virologischen Ansprechen (Mihm et al. 2006), könnten eine Erklärung für eine Resistenz des HCV in vivo gegenüber Amantadin bieten, analog dem Resistenzmechanismus beim Influenza M2 Protein.

Um die Relevanz der oben geschilderten L20F Substitution und möglichen anderen Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 für virologisches Nichtansprechen auf eine Amantadin-haltige antivirale Kombinationstherapie weiter zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit HCV p7-Sequenzen eines großen und homogenen Kollektivs von HCV Genotyp 1 infizierten Patienten, die eine antivirale Therapie mit Amantadin oder Placebo in Kombination mit pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin erhielten, untersucht.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Die in dieser Arbeit verwendeten Seren stammen von 221 konsekutiven bisher nicht vorbehandelten Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Genotyp 1 – Infektion, die als Studienpatienten an einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Multicenterstudie teilnahmen (PRAMA-Studie, (von Wagner et al. 2008)). Alle Patienten unterzeichneten eine schriftliche Einwilligungserklärung vor Studieneinschluß. Die Studie 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 erhöhter Transaminasen an mindestens einem Bestimmungszeitpunkt innerhalb der 56-tägigen Screeningphase vor Einnahmebeginn der Medikation, eines histologischen Nachweises einer Entzündungsaktivität in der Leber, und aufgrund positiver HCV-RNA gesichert. Eine Koinfektion mit dem HBV oder HIV wurde bei allen Patienten serologisch ausgeschlossen.

In der PRAMA Studie erhielten therapienaive Patienten Amantadinsulfat 400mg/Tag p.o. oder Placebo in Kombination mit PEG Interferon alfa-2a 180µg einmal wöchentlich s.c., plus Ribavirin 1000 bis 1200mg/Tag p.o. je nach Körpergewicht (<75kg versus ≥75kg). Vor Beginn der Kombinationstherapie mit PEG Interferon alfa-2a und Ribavirin, wurden Amantadin/Placebo innerhalb von zwei Wochen in wöchentlichen 100mg Schritten eskaliert bei einer Startdosis von 200mg/Tag. Patienten ohne frühes virologisches Therapieansprechen (<2 log Abfall der HCV RNA in den ersten 12 Wochen der Kombinationstherapie) wurden als Non-responder (NR) betrachtet und die Behandlung wurde abgebrochen. Patienten mit frühem virologischen Ansprechen setzten die antivirale Kombinationstherapie für insgesamt 48 Wochen fort. Das dauerhafte virologische Therapieansprechen (SVR) wurde definiert als negative HCV RNA (< 50 IU/ml im HCV RNA Assay) zum Behandlungsende und 24 Wochen danach. Patienten mit negativer HCV RNA zum Behandlungsende aber erneut positivem HCV RNA Nachweis innerhalb der 24-wöchigen Nachbeobachtung

galten als end-of-treatment responder (ETR) mit anschließendem Rückfall (Relapse).

Die in dieser Arbeit untersuchten Seren wurden vor Einnahme der ersten Medikation entnommen. In der zugrunde liegenden Studie (PRAMA-Studie) wurden insgesamt 704 Patienten eingeschlossen. Für die vorliegende Arbeit war von 221 der 704 Patienten Serum von vor Therapiebeginn verfügbar. Aus diesen 221 konsekutiven Serumproben wurde die HCV RNA extrahiert und das HCV p7-Gen sequenziert. Nach Entblindung der Studie stellte sich heraus, dass insgesamt 41 Patienten die Studie vorzeitig abgebrochen hatten, so dass diese Sequenzen nicht mit einem Therapieansprechen auf der Grundlage einer vollständig durchgeführten Behandlung korrelierbar waren. Diese Patienten werden als „Drop out“ (DO) bezeichnet und sind in Tabelle 1 der Vollständigkeit wegen mit aufgeführt.

Tabelle 1: Patiententabelle

	Therapieregime mit Amantadin (n=111)				Therapieregime ohne Amantadin (n=110)			
	Genotyp 1a (n=12)		Genotyp 1b (n=99)		Genotyp 1a (n=21)		Genotyp 1b (n=89)	
	DO (n=3)	IFN+R+A (n=9)	DO (n=21)	IFN+R+A (n=78)	DO (n=7)	IFN+R (n=14)	DO (n=10)	IFN+R (n=79)
SR (n=114)		3		50		9		52
ETR (n=47)		4		19		4		20
NR (n=19)		2		9		1		7

Abkürzungen:

SR: sustained responder; ETR: end-of-treatment responder; NR: non-responder;
DO: drop out, diese Patienten haben die Studie abgebrochen, sodass die Aminosäuresequenz des HCV p7-Proteins bei diesen Patienten nicht ausgewertet wurde.

IFN+R+A: Diese Patienten erhielten in Woche 1: 200 mg Amantadin/Tag, in Woche 2: 300mg Amantadin /Tag und ab Woche 3: eine Dreifachkombination aus 400 mg Amantadin/Tag, 180 µg Interferon alfa/Woche und körperrgewichtsadaptiert 1000 – 1200 mg Ribavirin/Tag, über 48 Wochen.

IFN+R: Dies ist die Placebogruppe, die an Stelle von Amantadin ein Placebo erhielt. Die Dosierungen von Interferon alfa und Ribavirin sind mit der anderen Gruppe identisch.

2.2 Geräte und Einwegmaterialien

Chemikalienwaage:	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammer:	Whatman Biometra, Gibco BRL, Karlsruhe
Spannungsgeber:	Consort E 835 Keutz, Reiskirchen
Foto-Apparatur:	Polaroid, Cambridge, England
Laminar-Flow-System:	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellenofen:	Hettachi, Eschborn
Nitril-Handschuhe:	NOBA Verbandsmittel, Wetter
Pippettierhilfe:	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:	1,5 ml; 2,0 ml Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:	0,5 ml Perkin Elmer, Weiterstadt
Rotilab-Mini Zentrifuge:	Roth, Karlsruhe
Sequenzierautomat:	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler:	Vortex REAX 2000, Heidolph, Kehlheim
Sterilfilter-Pipettenspitzen:	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Thermocycler 9700:	Perkin Elmer, Weiterstadt
Tischzentrifuge 5417C:	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436:	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe FluoLink:	Biometra, Göttingen
Wasserheizbad 1083:	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Mikro 22R:	Hettich, Bäch, Schweiz

2.3 Allgemeine Chemikalien

Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B.Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT 0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
dATP-Lösung 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
dCTP-Lösung 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
dGTP-Lösung 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
dTTP-Lösung 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
10xconc. PCR Buffer mit MgCl ²	Roche, Mannheim
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
40xTAE-Puffer	193,82 g Tris, 65,62 g NaAcetat (Trihydrat), 29,78 g EDTA
1xTAE-Puffer	0,4 M Tris, 0,2 M NaAcetat, 10 mM EDTA
Ladungspuffer (loading buffer)	2 g Bromphenolblau, 60 g Saccharose, 2 mmol EDTA und 36 g Harnstoff in 100 ml Aqua bidest. lösen und autoklavieren

2.4 Enzyme

RNase OUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase 5 U/μl	Roche, Mannheim

2.5 Reagenzien-Sets

DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt

2.6 Primer

„Outer“ Sense-Primer 5´ - GTGGACGTGCAATACCTGTACGG – 3´ (Position 2418 bis 2440 entsprechend HCV-J)

„Outer“ Antisense-Primer 5´ - ATTGTAACCACCATATGAGCCTAG – 3´ (Position 2871 bis 2848 entsprechend HCV-J)

„Inner“ Sense-Primer 5´ - TGCCTGCTTGTGGATGATGCTGC – 3´ (Position 2525 bis 2547 entsprechend HCV-J)

„Inner“ Antisense-Primer 5´ - AACCGCGCCTCCGCACGATGC – 3´ (Position 2795 bis 2775 entsprechend HCV-J)

Die Nummerierung der Nukleotidpositionen aller Primer erfolgte nach dem HCV 1b Prototyp HCV-J (Kato et al.)

2.7 Seren

Als Ausgangsmaterial wurden Seren von Patienten vor der ersten Medikamenteneinnahme verwendet. Nach der Blutentnahme erfolgte umgehend eine Zentrifugation unter Kühlung. Alle Serumproben wurden anschließend zur Vermeidung von häufigen Auftau- und Einfrierprozessen unter einer Laminar Flow aliquotiert und bei -80°e eingelagert.

2.8 Quantitative HCV-RNA-Messung und HCV-Genotypisierung

Zur Beurteilung des virologischen Therapieansprechens wurde ein qualitativer HCV-RNA-Assay (HCV Amplicor 2.0, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit einer Nachweisgrenze von 50 IU/ml verwendet. Die HCV-Genotypisierung erfolgte entsprechend der Klassifikation von Simmonds (Simmonds et al. 1993) und wurde mit dem Reverse Hybridisation Assay von der Firma INNO LiPa HCV-II, Innogenetics (Gent, Belgium) durchgeführt.

2.9 HCV – RNA – Extraktion

Für gentechnologische Untersuchungen des Hepatitis C Virus ist es erforderlich die virale RNA den für die geplanten Reaktionen notwendigen Enzymen und Reagenzien zugänglich zu machen. In der Regel ist die RNA von den Wirtszellmembranen, der Virushülle und dem Nukleokapsid umgeben. Um die RNA zu isolieren, werden spezielle Detergenzien, die die Lipidhülle zerstören, verwendet. Nach der Zerstörung der Hülle wird auch das Kapsid instabil und die Nukleinsäure tritt aus. Nach der Freisetzung der RNA ist diese viel anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen und kann schneller abgebaut werden. Dies gilt insbesondere für höhere Temperaturen (>65°C) und basische pH-Werte, wobei RNA sehr empfindlich gegenüber dem Abbau durch alkalische Hydrolyse ist. Die größte Gefahr stellen RNA-abbauende, ubiquitär vorkommende Enzyme (RNasen) dar. Der Einsatz von nukleasefreien Materialien und Reagenzien sowie das Arbeiten unter möglichst keimfreien Bedingungen und bei niedrigen Temperaturen (Eisbad) hilft eine Degradation der RNA zu vermeiden. Darüber hinaus müssen während der Probenaufarbeitung alle Hemmsubstanzen (z.B. Proteine oder genomische DNA), die die anschließende Umschreibung in cDNA und die Amplifikationsreaktion behindern könnten, entfernt, inaktiviert oder stark verdünnt werden.

Die durchgeführte RNA-Extraktion basierte auf dem Prinzip einer selektiven Bindung der Nukleinsäure an eine Siliziumverbindung, die als eine Silicogel-

Membran in Zentrifugensäulchen integriert wurde. Das Waschen der an die Siliziumverbindung gebundenen Nukleinsäure erfolgte mit einem Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration (alkalische Lösung). Im alkalischen Milieu tritt die RNA als Polyanion auf und bindet an die Filtermembran, während Proteine den Filter passieren. Nach dem Waschen wurde die RNA mit einem wässrigen Elutionspuffer mit niedrigem Salzgehalt (saure Lösung) vom Silica-Trägermaterial eluiert.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Mini Spin Kits der Firma QIAGEN. Hierfür standen folgende Komponenten zur Verfügung:

- Puffer AVL mit Carrier-RNA (Lysis- und Bindepuffer)
- Puffer AW1 mit chaotropem Salz (Waschpuffer)
- Puffer AW2 mit Natriumazid (Waschpuffer)
- QIAamp-Säule mit integrierter Silicogel-Membran
- Puffer AVE mit Natriumazid (Eluierpuffer)
- Ethanol 96-100%
- 2 ml Auffanggefäße
- 1,5 ml Reaktionsgefäße

Die Nukleinsäuren werden in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an die Silicogel-Membran gebunden. Der Lysis- und Bindepuffer enthielt PolyA als Carriersubstanz, um die Gewinnung von Nukleinsäuren aus niedrigkonzentrierten Proben zu verbessern. Ein anschließender Waschvorgang entfernt die Verunreinigungen.

Entsprechend der Originalanleitung des QIAamp Viral RNA Mini Spin Kits wurde die HCV-RNA extrahiert. Dafür wurde der AVL-Puffer mit Carrier-RNA in einem Wasserbad auf 80°C erhitzt und anschließend vermischt, um ausgefallene Salze wieder in die Lösung zu bringen. Vor Benutzung wurde der Puffer jedoch wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Serumproben wurden vor Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt und kurz geschüttelt.

Danach wurden 400 µl Puffer AVL mit Carrier-RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 100 µl Serum zugegeben und mit einem

elektrischen Schüttler gut gemischt. Danach wurde der Isolierungsansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl reinen Ethanols zur Probe hinzugefügt und alles gut gemischt. Der Alkohol bewirkt eine Denaturierung und führt zum Ausfallen der freigesetzten Nukleinsäuren, so dass diese bei der Zentrifugation von der Silicogel-Membran gebunden werden kann. Die QIAamp-Säule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gegeben und mit 630 µl des Probenansatzes beladen. Die Extraktionssäule wurde bei 8000 Umdrehungen pro Minute (rpm) eine Minute lang zentrifugiert und der Durchfluss danach verworfen. Anschließend wurde der verbliebene Rest an Probenansatz auf die QIAamp-Säule gegeben und wiederum bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, der Durchfluss und das Auffanggefäß wurden verworfen. Im nächsten Schritt musste der Filter ausgewaschen werden, um den Alkohol zu entfernen und die in der Membran befindliche RNA wieder in Lösung zu bringen. Dazu wurden 500 µl Puffer AW1 auf die QIAamp-Säule pipettiert und bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, der Durchfluss und das Auffanggefäß wurden erneut verworfen. Es folgten die Zugabe von 500µl AW2 Waschpuffer und drei Minuten Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit, mit anschließender einminütiger Zentrifugation ohne Pufferzugabe, um jeden Rest von Flüssigkeit aus der Membran zu extrahieren. Im letzten Schritt wurde die QIAamp-Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Eluieren der RNA wurden 60µl Puffer AVE auf die Mitte der Membran pipettiert und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnene RNA in Lösung wurde bei -20°C eingefroren.

2.10 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine in vitro Technik zur Vermehrung (Amplifikation) eines spezifischen Genomfragmentes aus Desoxyribonukleinsäure (DNA), das zwischen zwei Genomregionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt. Soll RNA in der PCR amplifiziert werden, muss mit Hilfe der Reversen Transkriptase zuerst eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dieser Schritt wird als Reverse Transkription (RT) und der Vorgang mit anschließender cDNA-Amplifikation mittels PCR als RT-PCR bezeichnet.

2.10.1 Prinzip der Reversen Transkription

Zum Umschreiben der RNA in eine cDNA benötigt die Reverse Transkriptase, neben anderen Substanzen, Primer oder Hexamere in Form eines kurzen Oligonukleotids. Durch Anlagerung des Primers bzw. der Hexamere an die mRNA erhält man eine freie 3'-OH-Primergruppe, an der die Reverse Transkriptase durch Anlagerung von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) mit der cDNA-Synthese starten kann. Dabei entstehen RNA-DNA-Heteroduplexe, die als Ausgangsmaterial für die Nukleinsäureamplifikation mittels PCR dienen. Um die Effizienz der Reversen Transkription zu erhöhen wird die Reverse Transkriptase mit deletierter RNaseH-Funktion eingesetzt. Die RNase H ist eine Endonuklease, die spezifisch die Phosphodiester-Bindungen der RNA hydrolisiert, welche an DNA hybridisiert ist. Mit Hilfe dieser Endonuklease würde es zu einem Abbau der RNA kommen, sobald ein cDNA-Strang erstellt wurde. In dieser Arbeit wurde die Super Script II RNase H⁻ Reverse Transkriptase von der Firma Invitrogen verwendet. Aufgrund der Hitzeinstabilität der Reversen Transkriptase kann der Ansatz nicht auf die Hybridisierungstemperatur spezifischer Primer erhitzt werden. Um dieses Problem zu umgehen, wird in einem vorbereitenden Schritt Primer und RNA-Extrakt gut gemischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um eine Entfaltung der Nukleinsäure und die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Anschließend

wird dieser Ansatz wieder abgekühlt, und die übrigen Reagenzien können hinzugefügt werden.

2.10.2 Durchführung der Reversen Transkription

Der Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription (RT) wurde aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt:

- dNTP Mix 10 mM – Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Dithiothreitol (DTT 0,1 M) –zur Erhöhung der Aktivität des RNase-Inhibitors
- 5 x First Strand Buffer – 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei Raumtemperatur), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- RNase OUT Inhibitor
- Super Script II RNase H⁻ Reverse Transkriptase
- RNA-Extrakt
- „Outer“ Antisense-Primer

Tabelle 2: Zusammensetzung des RT-Mastermix 1

Reagenzien	Volumen (µl)
DTT(0,1M)	1
dNTP Mix 10 Mm	1
5xFirst Stand Buffer	4
RNaseOUT Inh.40 U/µl	1
Super Script II 200 U/µl	1

Der RT-Mastermix 1 wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Vortexer gut gemischt und in ein Eisbad gestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des RT-Mastermix 2

Reagenzien	Volumen (μ l)
RNA-Extrakt	9
„Outer“AS-Primer	2

Der RT-Mastermix 2 wurde in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert und danach sofort in einem Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 9 μ l vom RT-Mastermix 1 zum Mastermix 2 gegeben und gut gemischt. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte bis zur Entnahme aus dem Gerät eine Kühlung der Proben im Thermocycler bei 4°C.

2.10.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Eine PCR ist durch eine wiederholte Abfolge von Zyklen aufgebaut und besteht aus mehreren Schritten.

1. *Trennung des DNA-Doppelstranges („Denaturierung“):*

Durch Erhitzen auf eine Temperatur um 95°C werden die beiden Stränge der DNA (Produkt der Reversen Transkription) voneinander getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen durch die Hitze aufgebrochen werden.

2. *Anlagerung („Annealing“):*

Zwei synthetisch hergestellte Primer lagern sich über die Wasserstoffbrückenbindungen an den DNA-Einzelsträngen an. Die Primer werden so ausgewählt, dass sie komplementär zum 5´- bzw. zum 3´-Ende der Zielstränge sind, wobei sie die zu vermehrende Region begrenzen. Die Primer

werden relativ zur Menge an Ziel-DNA im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben, so dass sich die beiden komplementären Zielstränge vorrangig mit den Primern und nicht untereinander verbinden. Die Anlagerungstemperatur liegt normalerweise zwischen 40°C und 60°C und ist abhängig von der Basenzusammensetzung des Primers und der sich daraus ergebenden Schmelztemperatur.

3. Verlängerung („*Extension*“)

Die Primer dienen als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die die matrixabhängige Synthese des komplementären zweiten Stranges katalysiert. Mit dem Einsatz thermostabiler Polymerasen war die Voraussetzung für eine automatische Durchführung der PCR gegeben, ohne dass nach jedem Denaturierungszyklus neue DNA-Polymerase zum Reaktionsansatz zugesetzt werden musste. Die thermostabilen Polymerasen wurden ursprünglich aus Mikroorganismen (z.B. *Thermus aquaticus*) isoliert, mittlerweile ist auch eine gentechnische Herstellung möglich. Sie unterscheiden sich bezüglich der Thermostabilität, der Prozessivität und der Endo- bzw. Exonuklease-Funktion, die einer Korrekturaktivität entspricht und damit eine deutlich verringerte Fehlerrate ermöglicht. Die DNA-Polymerase arbeitet immer in 5'→3' Richtung ausgehend von 3'-Hydroxylenden der an die DNA gebundenen Primer. Sie ergänzt die einzelsträngige Matrize durch den Einbau der vier Nukleotide, im Sinne einer komplementären Basenpaarung, zu einem Doppelstrang. Die optimale Aktivitätstemperatur der DNA-Polymerase liegt typischerweise bei ca. 70°C.

Die Zyklen werden etwa 25 bis 45 Mal wiederholt. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Anzahl amplifizierter Fragmente, so dass eine exponentielle Vermehrung der DNA erreicht wird. Die gesamte Reaktion erfolgt in einem Cycler, welcher mit hoher Präzision und in kurzer Zeit die gewünschten Temperaturen in den Reaktionsgefäßen herstellen kann.

Um Sensitivität und Spezifität der Reaktion zu erhöhen wurde in dieser Arbeit die so genannte „nested“-PCR-Methode durchgeführt. Dieses Vorgehen basiert auf dem Prinzip zweier ineinander verschachtelter Polymerase-Kettenreaktionen. Das Reaktionsprodukt der ersten PCR wird in die zweite PCR eingesetzt. Das Primerpaar der zweiten PCR liegt dabei zwischen den Primern der ersten Reaktion. Dadurch werden falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert.

Um mögliche Kontaminationen erkennen zu können, wurden in dieser Arbeit bei jedem RT-PCR-Ansatz bereits mit Beginn der Probenvorbereitung zwei Negativkontrollen mit sterilem Wasser mit bearbeitet.

2.10.4 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Ein Reaktionsansatz für die PCR wurde aus folgenden Reagenzien zusammengesetzt, und bei 20° auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt:

- 10 x konzentrierter PCR-Reaktion-Puffer mit $MgCl^2$
- 100 mM Tris-HCl
- 15 mM $MgCl^2$
- 500 mM KCl

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

Kaliumchlorid wird zur Steigerung der PCR-Reaktion zugesetzt. Magnesiumionen sind die wichtigsten Kofaktoren der DNA-Polymerase und stimulieren ihre Aktivität. Die Magnesiumionen bilden zusammen mit den Nukleotiden einen löslichen Komplex, der für den Nukleotid-Einbau entscheidend ist, darüber hinaus beeinflussen sie die Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge und die Denaturierungstemperatur des DNA-Doppelstranges.

Abbildung 3: « nested »-PCR Protokoll

PCR I		PCR II	
Reagenzien	Menge (µl)	Reagenzien	Menge (µl)
10xPCR-Buffer mit 15 mM MgCl ₂	5,0	10xPCR-Buffer mit 15mM MgCl ₂	5,0
„Outer“S-Primer	0,5	„Inner“S-Primer	0,5
“Outer”AS-Primer	0,5	“Inner”AS-Primer	0,5
dNTP Mix 10 mM	1,0	dNTP Mix 10 mM	1,0
Aqua	21,75	Aqua	31,75
Taq-Polymerase	0,25	Taq-Polymerase	0,25
DMSO	1,0	DMSO	1,0
RT-Produkt	20,0	Amplikon PCR I	10,0
GESAMT	50,0	GESAMT	50,0

Cycler-Programm

Schritt	Temp.	Zeit	
Denaturierung	95°C	2 min	} 4 5 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	53°C	1 min	
Extension	72°C	2 min	
Extension	72°C	10 min	
Abbruch	4°C	∞	

Cycler-Programm

Schritt	Temp.	Zeit	
Denaturierung	95°C	2 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	59°C	1 m in	
Extension	72°C	2 min	
Extension	72°C	10 min	
Abbruch	4°C	∞	

Die Durchführung der PCR erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip und alle Pipettierschritte wurden unter Kühlung auf Eis durchgeführt. An erster Stelle der PCR I bzw. PCR II steht die Erstellung eines Mastermixes. Dieser wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß hergestellt, indem man als Erstes das Wasser, und anschließend nacheinander 10xPCR-Buffer, DMSO, die beiden „Outer“ Primer, den dNTP Mix, und zum Schluss die Taq-Polymerase hinein pipettiert und anschließend gut vermischt. Als nächsten Schritt gibt man pro Patient 30 µl des Mastermixes in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß und pipettiert 20 µl des zugehörigen RT-Produktes dazu. Der fertiggestellte PCR I – Mix wird entsprechend dem

angegebenen Cycler-Programm bei verschiedenen Temperaturstufen inkubiert. Bis zur Entnahme aus dem Gerät erfolgte eine Kühlung der Proben im Thermocycler bei 4°C.

Für die PCR II gilt die gleiche Vorgehensweise. Der einzige Unterschied besteht in der Verwendung der beiden „Inner“ Primer und an Stelle des RT-Produktes werden hier 10 µl des PCR I-Produktes verwendet. Die Inkubation erfolgt wiederum anhand des angegebenen Cycler-Programmes. Auch hier erfolgt bis zur Entnahme aus dem Gerät eine Kühlung der Proben im Thermocycler bei 4°C. Das fertige PCR II-Produkt wird bis zur Weiterverarbeitung der Proben in einem Kühlraum bei –10°C aufbewahrt.

2.11 Agarosegel-Elektrophorese

2.11.1 Prinzip der Agarosegel-Elektrophorese

Das Produkt der PCR-Reaktion besteht aus den amplifizierten DNA-Fragmenten mit spezifischer Länge und Sequenz.. In einem Agarosegel werden die DNA-Fragmente nach Anlage einer elektrischen Spannung nach der Größe aufgetrennt. Wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen wandern die DNA-Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die verschiedenen Faktoren wie die Molekülgröße, den verwendeten Puffer, die angelegte Spannung und die Agarosekonzentration im Gel beeinflusst. Die DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wandern im elektrischen Feld entsprechend der Anzahl ihrer Basenpaare unterschiedlich schnell. Je nach Länge der erwarteten Fragmente werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen gewählt. Beim Wandern der DNA durch das Gel wird der dem Agarosegel zugegebene fluoreszierende Farbstoff, Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀BrN₃), gebunden, wodurch die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar werden. Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀BrN₃) ist ein ebenes Molekül, wodurch es zwischen den Basen der DNA-Doppelhelix eingelagert werden kann. Dieser Komplex zeigt im UV-Licht eine typische orangefarbene Fluoreszenz. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 2-4 ng DNA.

2.11.2 Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese

Zur Darstellung und Beurteilung der cDNA-Amplifikate wurden in dieser Arbeit 5 µl des PCR-Produktes auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Für das Agarosegel und die Elektrophoresekammer wurde 1xTAE-Puffer eingesetzt (Zusammensetzung des TAE-Puffers (1x): 0,4 M Tris, 0,2 M NaAcetat, 10 mM EDTA). Der Puffer wurde als eine 40fach-konzentrierte Vorratslösung zubereitet. Die Zusammensetzung des TAE-Puffers (40x) besteht aus 193,82 g Tris, 65,62 g NaAcetat und 29,78 g EDTA. Die einzelnen Reagenzien wurden eingewogen und in 800 ml Wasser unter ständigem Rühren aufgelöst. Anschließend wurde mit Essigsäure (Eisessig, 100%) der pH-Wert auf 8,3 eingestellt. Zur Verdünnung auf 1-fache Konzentration wurden 25 ml 40xTAE auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt. Weiterhin wurde 2g Agarose Broad Range (Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 100 ml 1xTAE-Puffer eingerührt und in der Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Flüssigkeit entstand. Dann wurden ca. 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung in einen Elektrophorese-Schlitten mit einem Kamm für die Geltaschen luftblasenfrei gegossen. 5 µl PCR-Produktes wurden mit ca. 1 µl blaugefärbtem Ladungspuffer (Bromphenolblau, Glycerin, EDTA-Puffer) vermischt. Dieser Puffer erfüllt zwei Aufgaben. Erstens kommt es durch den hohen Glycerin-Anteil zum Absinken der Proben in die Geltaschen und dadurch wird das Abdiffundieren in den umgebenden Puffer verhindert. Zweitens wird durch das Farbmittel Bromphenolblau die Front der Elektrophorese optisch gekennzeichnet. Die mit dem Ladungspuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. In die äußere Kammer wurde parallel ein Größenmarker aufgetragen. Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 120 V und die Stromstärke von 400 mA über eine Stunde angelegt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden mit dem interkalierenden Ethidiumbromid unter UV-Licht deutlich sichtbar und konnten zur Dokumentation fotografiert werden (Abb.4).

Abbildung 4: Beispiel einer Elektrophorese mit typischem Bandenmuster nach Ethidiumbromid-Färbung. 1-14 Proben, 15-16 Negativkontrollen



2.12 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach abgelaufener Polymerase-Kettenreaktion und positivem Bandennachweis im Agarosegel müssen die DNA-Moleküle von den Resten des Reaktionsansatzes (Primer, dNTPs, Enzyme, Salze, DMSO) gereinigt werden. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des QIAquick Spin PCR Purification Kits von der Firma QIAGEN. Bei dieser Methode werden, ähnlich wie bei der RNA-Isolierung aus dem Serum, die DNA-Stücke in Anwesenheit eines chaotropen Salzes in hoher Konzentration an eine im

Reaktionssäulchen integrierte Silicogel-Membran gebunden. Die DNA-Adsorption an die Siliziumverbindung ist stark abhängig von dem pH-Wert des Bindepuffers (Puffer PB) und erreicht typischerweise 95% bei einem $\text{pH} \leq 7,5$. In diesem Schritt wurden 40 μl des PCR-Produktes mit der fünffachen Menge (200 μl) an PB-Puffer im Zentrifugensäulchen versetzt und mittels Vortexer gut gemischt. Dieses Gemisch wurde dann bei 13000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei dieser Methode mit 13000 rpm durchgeführt. Die unerwünschten Verunreinigungen konnten die Membran passieren und wurden mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer (Puffer PE) aus der Lösung entfernt. Dafür wurden 750 μl PE-Puffer auf die Säulenmembran aufgetragen und noch einmal zentrifugiert. Auch nach dieser Zentrifugation wurde das Eluat verworfen. Der Rest des Puffers wurde durch eine Leerzentrifugation aus der Membran ausgepresst. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit einem alkalischen Puffer (Puffer EB: 10 mM TrisCl, pH 8,5) wieder eluiert. Dafür wurde die Säule auf ein frisches Reaktionssäulchen ohne Membran aufgesetzt, 50 μl des EB-Puffers vorsichtig auf die Mitte der Membran pipettiert, eine Minute lang inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Eluat konnte direkt zur Sequenz-PCR benutzt oder bei 4°C über mehrere Tage aufbewahrt werden.

2.13 Probenaufbereitung vor DNA-Sequenzierung

Um eine große Menge des in der DNA-Sequenzierung verwendeten ddNTP-versetzten Reaktionsprodukts bekommen zu können, muss vor Beginn der DNA-Sequenzierung eine Sequenz-PCR und im Anschluss eine Aufreinigung der Reaktionsprodukte mittels Gelsäulenfiltration durchgeführt werden.

2.13.1 Sequenz-PCR


Die Sequenz-PCR basiert auf drei Teilschritten, die bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen ablaufen und deren Zyklus vielfach wiederholt wird. Die Sequenz-PCRs wurden mit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits 1.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt, die bereits fertig gemischte PCR-Ansätze mit vier unterschiedlich markierten Terminator-Dyes enthalten. Dem Ansatz wurden 3 µl aufgereinigte cDNA und die Primer aus der letzten PCR, die den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt abgrenzen, zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vermischt.

Tabelle 4: Sequenz-PCR Protokoll

PCR sense	Volumen (µl)	PCR antisense	Volumen (µl)
Seq. Kit	4,0	Seq. Kit	4,0
Sense-Primer	0,5	Antisense-Primer	0,5
Wasser	12,5	Wasser	12,5
Gesamt	17,0	Gesamt	17,0

Anschließend wurde im Thermocycler folgendes Schema verwendet:

Abbildung 5: Arbeitsschema im Thermocycler bei Sequenz-PCR

Schritt	Temp.	Zeit	
Denaturierung	96°C	2 min	 30 Zyklen
Denaturierung	96°C	10 sec	
Annealing	50°C	15 s ec	
Extension	60°C	4 mi n	
Extension	72°C	10 mi n	
Kühlung auf 4°C			

2.13.2 Gelsäulenfiltration

Nach abgelaufener Sequenz-PCR müssen die nicht eingebauten Terminator-Dyes vor der Kapillarelektrophorese im Sequenzier-Gerät aus der Lösung entfernt werden. Zu diesem Zweck wird eine Gelsäulenfiltration durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Lösung durch eine spezielle Gel-Matrix mit Poren gepresst. Dabei bleiben die kurzen Moleküle im Gel gebunden, während die langen DNA-Fragmente das Gel passieren können. Dadurch entspricht bereits das erste Eluat dem aufgereinigten Produkt.

Diese Methode wurde mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kits von der Firma QIAGEN durchgeführt. Nach der Homogenisierung des Gels durch das Vortexen wurde die Gelsäule bei 2700 rpm drei Minuten lang zentrifugiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule auf ein frisches Cup aufgesetzt. Anschließend wurde das PCR-Produkt vorsichtig auf das Gel pipettiert, ohne dessen Oberfläche zu berühren. Die Säule wurde ein weiteres Mal bei 2700 rpm drei Minuten lang zentrifugiert. Das Eluat konnte dann direkt zur Sequenzierung benutzt werden.

2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der genauen Nukleotid-Abfolge eines Nukleinsäurestranges. Die Methode wurde 1975 von Frederik Sanger entwickelt und wird auch „Kettenabbruch-Synthese“ genannt (Sanger et al. 1977). Das Prinzip entspricht der DNA-Amplifikation mit der PCR und wird mit den zu sequenzierenden, DNA-Abschnitt-einschließenden Primern durchgeführt. Zu dem Nukleotidgemisch aus Desoxynukleotidtriphosphaten mit den Basen Adenosin, Cytosin, Guanosin und Thymidin werden noch vier Didesoxynukleotidtriphosphate, ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP beigemischt, 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, kommt es zum vorzeitigen Abbruch des synthetisierten DNA-Stranges, da bei fehlender 3'-OH

-Gruppe kein weiteres Nukleotid eingefügt werden kann. So resultiert ein Gemisch von unterschiedlich langen DNA-Abschriften, die immer mit ddATP, ddCTP, ddGTP, oder ddTTP enden. Durch Auftrennung der Fragmente kann der Sequenzer die DNA-Sequenzen in einem farbkodierten Wellenmuster darstellen, wobei jeder Peak einem ddNTP am Ende eines Stranges entspricht, welches durch sein Absorptionsmaximum identifiziert werden kann.

In dieser Arbeit wurden Sequenzierungen auf einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Dieses Gerät besitzt 2x 8 Gel-gefüllte Kapillaren, die in zwei Kolonnen angeordnet sind. Die aufgereinigte Sequenz-PCR-Lösung wird kolonnenweise in die 96-Loch-Platte pipettiert. Die Platte wird anschließend mit einer Gummidecke verschlossen und im Gerät platziert. Die Kapillaren aus einem Isolatormaterial werden mit einem Ende in die PCR-Lösung getaucht und mit dem anderen in ein Puffersystem. Nach der Anlage elektrischer Spannung wandern die DNA-Fragmente in das Gel ein. Durch eine Detektionskammer kann mit einem Laser-Photospektrometer die Absorption der sich vorbeibewegenden Moleküle gemessen werden. Für jedes markierte ddNTP wird eine spezifische Wellenlänge gemessen, die seinem Absorptionsspektrum entspricht. Da die kürzeren Fragmente im Gel schneller wandern als die längeren, werden die Basen aufsteigend in der Reihenfolge ihrer Position geordnet. Als Gel kam das Applied Biosystems 3100 Pop-6 zum Einsatz.

2.15 Qualitative Sequenz-Analyse

Die durch den Sequenzer produzierten Nukleotid-Sequenzen wurden mittels eines Computerprogrammes, Finch-TV Version 1.4.0 des Geospiza Research Teams, als farbkodierte Wellenmuster dargestellt und bearbeitet. In diesem Programm konnten die Sequenzen gelesen, korrigiert und in Aminosäure-Sequenzen umgeschrieben werden. Anschließend wurden die Aminosäuresequenzen aus Finch-TV in ein weiteres Computerprogramm, Genedoc, ein „multiple Sequence Alignment Editor and Shading Utility“, Version 2.6.003, transferiert, in welchem die Sequenzen in Fasta-Dateien

umgeschrieben und als Liste (alignment) angeordnet wurden. Die Kalkulationen der Konsensus-Sequenzen und die phylogenetischen Analysen wurden, wie bereits in der Arbeit von Sarrazin et al. 2000 vorbeschrieben, ausgeführt. Die isolierten HCV-p7-Sequenzen wurden mit den Konsensus-Sequenzen (consensus sequence) von allen HCV-1b (con 1b) bzw. HCV-1a (con1a) Vortherapie-Isolaten verglichen. Die Patienten mit HCV Subtypen 1a und 1b wurden bei dieser Untersuchung getrennt analysiert.

Zur Evaluierung der biologischen Relevanz der identifizierten Aminosäure-Substitutionen wurde eine Analyse ihrer funktionellen Eigenschaften durchgeführt. Ein Austausch durch Aminosäuren mit gleichen biologischen Eigenschaften führt zu keinen funktionellen oder konformationellen Änderungen im resultierenden Protein und wird deswegen als konservative Aminosäuresubstitutionen (conserved) betrachtet. Die Analyse der Aminosäuresubstitutionen entsprechend ihren funktionellen Eigenschaften (conserved versus non-conserved mutations) basierte auf sechs verschiedenen Aminosäureklassen: positive (R und K), negative (D und E), aromatische (H, F, W und Y), polare (N, Q, S und T), alifatische (A, I, L, M, V und C) und Aminosäuren mit speziellen konformationellen Eigenschaften (G und P) (Mirny und Shakhnovich 1999).

2.16 Statistische Analyse

Für die Datenanalyse wurden der Kruskal-Wallis- und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Alle verwendeten Tests waren zweiseitig. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 HCV-1a-infizierte Patienten

In der Gruppe der Patienten mit einer HCV Genotyp 1a Infektion (n=33) erwiesen sich insgesamt 3 als Non-Responder (HCV RNA zu Woche 24 der Therapie nachweisbar), 12 als Sustained Responder (dauerhaftes virologisches Ansprechen), 8 als End-of-treatment-Responder (Patienten mit negativem HCV-RNA-Test nach Therapieabschluss und Rückfall im Verlauf), und 10 brachen die Therapie vorzeitig ab (Drop out).

Innerhalb der Dreifachkombinations-Gruppe mit Amantadin gab es 2 Non-Responder, 3 Sustained-Responder, 4 End-of-treatment-Responder und 3 Patienten mit Drop out.

Unter den Placebopatienten beendete nur ein Patient die Studie als Non-Responder, 9 Patienten beendeten sie als Sustained-Responder, 4 als End-of-treatment-Responder und 7 Patienten brachen die Studie ab.

Da die Gruppe der Non-Responder der HCV-1a-infizierten Patienten sehr klein und die statistische Auswertung deshalb wenig aussagekräftig ist, wurde die weitere Auswertung auf Patienten mit einer HCV-1b Infektion beschränkt.

3.2 HCV-1b-infizierte Patienten

In der Gruppe der Patienten mit einer HCV Genotyp 1b Infektion (n=188) erwiesen sich insgesamt 16 als Non-Responder (HCV RNA zu Woche 24 der Therapie nachweisbar), 102 als Sustained Responder (dauerhaftes virologisches Ansprechen), 39 als End-of-treatment-Responder (Patienten mit negativem HCV-RNA-Test nach Therapieabschluss und Rückfall im Verlauf), und 31 brachen die Therapie vorzeitig ab (Drop out). Zur besseren Übersicht siehe Tabelle 1 (S. 29).

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinischen Charakteristika der eingeschlossenen Patienten dieser Studie im Vergleich zum Patientenkollektiv der gesamten PRAMA Studie (Tab. 5).

Tabelle 5: Gegenüberstellung klinischer Charakteristika der Patienten dieser Studie und der gesamten PRAMA-Studie

	PRAMA Studie	Patienten dieser Studie	davon Genotyp 1a	davon Genotyp 1b
Anzahl Patienten (männlich/weiblich)	704 (368/336)	221 (113/108)	33 (23/10)	188 (90/98)
Alter (Jahre)	45,9 ± 12,1	46,9 ± 11,0	46,1 ± 9,8	47,0 ± 11,2
Gewicht (kg)	75,4 ± 14,9	74,4 ± 14,3	75,0 ± 12,9	74,3 ± 14,6
<i>Body Mass Index</i> (kg/m ²)	25,5 ⁺	25,5 ± 4,2	24,5 ± 3,7	25,7 ± 4,3
ALT (x <i>ULN</i>) [*]	2,6 ± 1,8	2,4 ± 1,8	2,5 ± 1,3	2,4 ± 1,9
Viruslast Log ₁₀ (IE/ml) Median (Min – Max)	5,9 (2,5 - 7,9)	5,9 (2,5 - 7,7)	6,0 (3,8 – 7,3)	5,9 (2,5 – 7,7)
Fibrosegrad	1,6 ± 1,3	1,8 ± 1,6	1,8 ± 1,5	1,9 ± 1,6

^{*} *ULN*, upper limit of normal: Werte zeigen den Multiplikator des oberen Grenzwertes (50IE/ml).

⁺ Standardabweichung nicht angegeben.

Es wurde eine Alignierung der Aminosäuresequenzen und Kalkulation der Konsensussequenz von allen HCV-1b Sequenzen (n=188) vor Behandlungsbeginn vorgenommen. Die Aminosäuresequenzen des HCV p7 wurden mit der Konsensussequenz (con1b) verglichen, um Aminosäurevariationen festzustellen. Dabei fanden sich lokale Akkumulationen von Aminosäurevarianten innerhalb der transmembranen Domänen, während die übrigen Teile des HCV p7 hoch konserviert erschienen (Abb. 7). Deshalb wurden die transmembranen Domänen 1 und 2 (TM1 und TM2) zusätzlich zur Analyse der kompletten Aminosäuresequenz des HCV p7 separat untersucht.

In der vorliegenden Arbeit war in keinem einzigen Isolat Phenylalanin in all den bei StGelais beschriebenen drei Positionen (F22/F25/F26) durch eine andere Aminosäure ersetzt (StGelais et al. 2009). Ein gleichzeitiges Abweichen von der Aminosäure Leucin in allen sechs Positionen (L50-55) oder auch nur in mehr als einer dieser Positionen lag in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei keinem einzigen Isolat vor. L57 war komplett konserviert (Abb 6).

3.2.1 Dreifachkombinations-Gruppe mit Interferon alpha, Ribavirin und Amantadin

Innerhalb der Patientengruppe, die Amantadin in einer Dreifachkombination mit pegyliertem Interferon alfa und Ribavirin bekamen (n=99), erwiesen sich 9 Patienten als Non-Responder, 50 Patienten als Sustained-Responder, 19 als End-of-treatment-Responder, und 21 Patienten mussten als Drop out verzeichnet werden.

Die Analyse der kompletten HCV p7-Sequenz (aa 1-63) ergab keine signifikanten Unterschiede bei den Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten zwischen Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die antivirale Therapie (NR: $1,89 \pm 0,309$, ETR: $2,68 \pm 0,375$; SR: $2,54 \pm 0,188$; $p = 0,346$). Auch der Vergleich ausschließlich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen

Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen auf die antivirale Therapie (NR: $1,44 \pm 0,242$, ETR: $1,58 \pm 0,289$; SR: $1,60 \pm 0,131$; $p = 0,735$).

Innerhalb der TM1 (aa 13-32) ergab weder der Vergleich aller Mutationen (NR: $1,00 \pm 0,333$, ETR: $1,47 \pm 0,280$; SR: $1,24 \pm 0,142$; $p = 0,675$), noch der Vergleich nicht-konservativer Mutationen (NR: $0,67 \pm 0,289$, ETR: $0,89 \pm 0,215$; SR: $0,80 \pm 0,125$; $p = 0,810$) eine Assoziation von Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten mit dem Therapieansprechen. Auch die Aminosäuresubstitution L20F innerhalb der TM1 ist in den vorliegenden Auswertungen in allen Patientengruppen weitgehend gleichmäßig vorhanden (NR: 1/9 [11,11%], ETR: 2/19 [10,53%]; SR: 5/50 [10,00%]; $p = 0,994$).

Auch in der zweiten transmembranen Domäne, TM2 (aa 39-58) konnte weder im Vergleich aller Mutationen (NR: $0,67 \pm 0,167$, ETR: $0,95 \pm 0,143$; SR: $0,98 \pm 0,101$; $p = 0,454$), noch im Vergleich nicht konservativer Mutationen (NR: $0,67 \pm 0,167$, ETR: $0,68 \pm 0,134$; SR: $0,78 \pm 0,072$; $p = 0,694$) eine signifikante Assoziation von Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten mit dem Therapieansprechen festgestellt werden. Die in diesem Sequenzabschnitt befindliche vorbeschriebene Aminosäuresubstitution L44F ist innerhalb der untersuchten Patientengruppen durchschnittlich zu 50% vorhanden (NR: 4/9 [44,44%], ETR: 11/19 [57,89%]; SR: 25/50 [50,00%]; $p = 0,766$).

3.2.2 Kombinationstherapie-Gruppe mit Interferon alfa, Ribavirin und Placebo

Unter den Placebopatienten ($n=89$) beendeten 7 Patienten die Studie als Non-Responder, 52 Patienten beendeten sie als Sustained-Responder, 20 als End-of-treatment-Responder und 10 Patienten brachen die Studie ab.

Ähnlich wie in der Dreifachtherapie-Gruppe verhalten sich die Ergebnisse der Placebo-Gruppe. In keiner der verschiedenen Auswertungen konnte eine Assoziation von Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten mit dem Therapieansprechen festgestellt werden. Im Folgenden sind die Aminosäuresubstitutionen mit Sequenzabschnitten und Therapieansprechen korreliert.

a) komplette HCV p7-Sequenz (aa 1-63), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: NR: $2,14 \pm 0,553$, ETR: $2,15 \pm 0,335$; SR: $2,60 \pm 0,230$, $p = 0,435$.

b) komplette HCV p7-Sequenz (aa 1-63), Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen : NR: $1,57 \pm 0,369$, ETR: $1,25 \pm 0,190$; SR: $1,73 \pm 0,196$, $p = 0,475$.

c) TM1 (aa 13-32), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: NR: $1,14 \pm 0,459$, ETR: $1,35 \pm 0,233$; SR: $1,21 \pm 0,144$, $p = 0,765$.

d) TM1, Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen: NR: $0,86 \pm 0,340$, ETR: $0,65 \pm 0,150$; SR: $0,79 \pm 0,124$, $p = 0,883$.

e) Aminosäuresubstitution L20F: NR: 0/7 [0%], ETR: 0/20 [0%]; SR: 6/52 [11,54%], $p = 0,185$.

f) TM2 (aa 39-58), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: mit NR: $0,57 \pm 0,429$, ETR: $0,60 \pm 0,134$; SR: $0,98 \pm 0,118$, $p = 0,095$

g) TM2, Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen : NR: $0,43 \pm 0,297$, ETR: $0,55 \pm 0,114$; SR: $0,81 \pm 0,103$, $p = 0,211$.

h) Aminosäuresubstitution L44F: NR: 5/7 [71,43%], ETR: 10/20 [50,00%]; SR: 24/52 [46,15%]; $p = 0,454$.

Die oben beschriebenen Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Darstellung der verschiedenen Aminosäuresubstitutionshäufigkeiten innerhalb verschiedener Regionen der HCV p7-Sequenz

	a) Trippeltherapiegruppe				b) Kombitherapiegruppe			
	NR	ETR	SR	p	NR	ETR	SR	p
aa 1-63: alle AS-Substitutionen	1,89 ± 0,309	2,68 ± 0,375	2,54 ± 0,188	0,346	2,14 ±0,553	2,15 ±0,335	2,60 ±0,230	0,435
aa 1-63: nicht-konservative AS-Substitutionen	1,44 ± 0,242	1,58 ± 0,289	1,60 ± 0,131	0,735	1,57 ±0,369	1,25 ±0,190	1,73 ± 0,196	0,475
TM1: alle AS-Substitutionen	1,00 ± 0,333	1,47 ± 0,280	1,24 ± 0,142	0,675	1,14 ± 0,459	1,35 ± 0,233	1,21 ± 0,144	0,765
TM1: nicht-konservative AS-Substitutionen	0,67 ± 0,289	0,89 ± 0,215	0,80 ± 0,125	0,810	0,86 ± 0,340	0,65 ± 0,150	0,79 ± 0,124	0,883
TM1: L20F-Substitution	1/9 [11,11%]	2/19 [10,53%]	5/50 [10,00%]	0,994	0/7 [0%]	0/20 [0%]	6/52 [11,54%]	0,185
TM2: alle AS-Substitutionen	0,67 ± 0,167	0,95 ± 0,143	0,98 ± 0,101	0,454	0,57 ±0,429	0,60 ±0,134	0,98 ± 0,118	0,095
TM2: nicht konservative AS-Substitutionen	0,67 ± 0,167	0,68 ± 0,134	0,78 ± 0,072	0,694	0,43 ±0,297	0,55 ±0,114	0,81 ± 0,103	0,211
TM2: L44F-Substitution	4/9 [44,44%]	11/19 [57,89%]	25/50 [50,00%]	0,766	5/7 [71,43%]	10/20 [50,00%]	24/52 [46,15%]	0,454

Gesamte HCVp7-Sequenz : aa 1-63; TM1: aa 13-32; TM2: aa 39-58;
(TM: transmembrane Domäne)

3.2.3 Vergleich der beiden Behandlungsarme

Signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten aller bzw. nur nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen zwischen Patienten mit Nichtansprechen bzw. mit Therapieansprechen (SR+ETR) der beiden verschiedenen Behandlungsarme (Amantadin vs. Placebo) fanden sich ebenfalls nicht:

a) komplette HCV p7-Sequenz (aa 1-63), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,66$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,59$.

b) komplette HCV p7-Sequenz (aa 1-63), Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,65$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,70$ (Abb. 7).

c) TM1 (aa 13-32), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,82$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,87$.

d) TM1, Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,65$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,66$ (Abb. 8).

e) Aminosäure-Substitution L20F: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,36$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,71$ (Abb. 8).

f) TM2 (aa 39-58), Vergleich aller Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,29$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,30$.

g) TM2, Vergleich nicht-konservativer Aminosäuresubstitutionen: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,29$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,59$ (Abb. 9).

h) Aminosäure-Substitution L44F: NR Amantadine vs. NR Placebo $p=0,28$; SR+ETR Amantadine vs. SR+ETR Placebo $p=0,56$ (Abb. 9).

Abbildung 6 A: Alignment der Aminosäuren 1-63 des HCV p7 von Patienten mit Placebothherapie

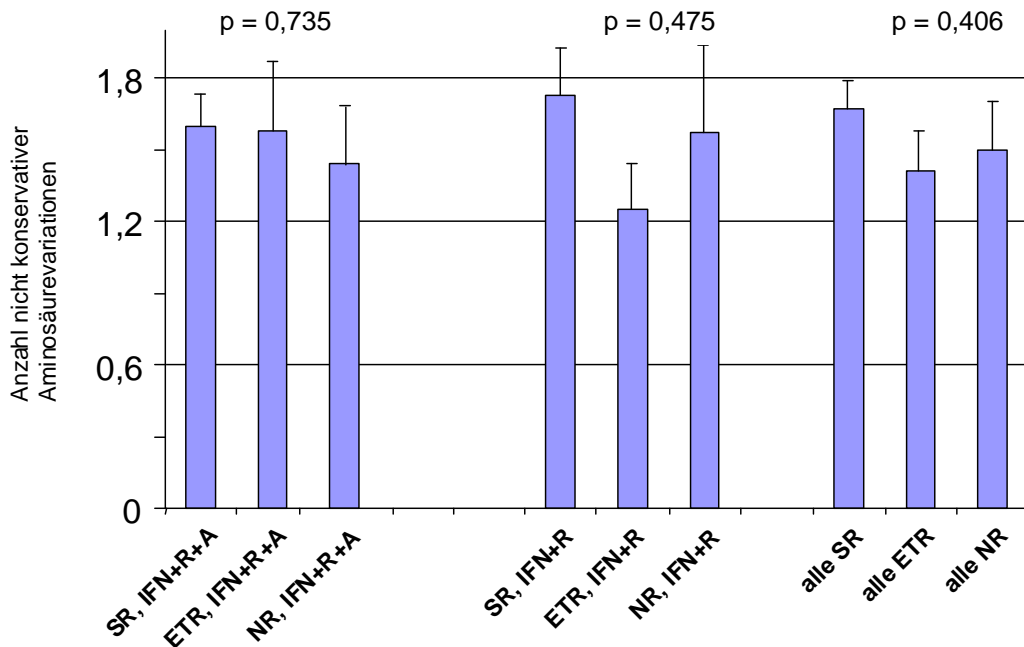
	TM1			TM2		
con1b	ALENLVVLNAAS	VAGAHGILSFLVFFCAAWYIK	GRGLVPG	GAAYAFYGVWPL	LLLLLALP	PRAYA
36bSR2P0		FF		L		
37bSR2P0				L		
39bSR2P0	L	V		L		
40bSR2P0	L			L	A	
43bSR2P0			K	L		
46bSR2P0		TF		L		
54bSR2P0	L	T	L	VI	S	
60bSR2P0						
61bSR2P0						
63bSR2P0			K	T	I	S
70bSR2P0				V		
71bSR2P0		T	K			H
73bSR2P0				L		
77bSR2P0		T				M
78bSR2P0						
92bSR2P0		T	L	K		F
94bSR2P0	M		L			
97bSR2P0						
98bSR2P0		P	K	L		
104bSR2P0		T	I		S	M
108bSR2P0	E	T	P	T	L	S
112bSR2P0		M	FA	L	A	L
114bSR2P0	R	M	L	S		V
115bSR2P0			T			
124bSR2P0		L		L		
130bSR2P0			FF	L		F
133bSR2P0			TQ	V		
141bSR2P0			M			
143bSR2P0		L		L		F
145bSR2P0			P	F	K	T
146bSR2P0	I				L	I
149bSR2P0		T				
150bSR2P0			IL	K	A	
151bSR2P0						
152bSR2P0						F
153bSR2P0	L		T	V		F
156bSR2P0	T					Q
160bSR2P0		T	P	L		
181bSR2P0	L			L		
182bSR2P0				K	V	
183bSR2P0			V			
192bSR2P0			FI	L		F
195bSR2P0	L			L		
196bSR2P0						
200bSR2P0		T		L		
206bSR2P0		T	FP	V	I	
208bSR2P0		T				
213bSR2P0		V	T	T	L	
215bSR2P0		T	V		L	
227bSR2P0	L		F		L	M
228bSR2P0			F			F
229bSR2P0		T		K	L	
41bETR2P0		N	P			
44bETR2P0	L		T			
49bETR2P0	V	L	T		L	
58bETR2P0	L		T			
75bETR2P0					L	
80bETR2P0	L		T			
83bETR2P0	L		T	A		M
113bETR2P0						S
135bETR2P0				L		
142bETR2P0			V	P		
165bETR2P0					L	
171bETR2P0			F		L	
173bETR2P0	I	L	T	L		S
179bETR2P0			A	L		
187bETR2P0			V	P		L
207bETR2P0	L				L	
209bETR2P0	L		V		L	
218bETR2P0	L				L	
219bETR2P0				K		
223bETR2P0						
59bNR2P0						
62bNR2P0		T	V	K		H
100bNR2P0				V	V	S
118bNR2P0			Y	L		L
161bNR2P0				F		
166bNR2P0		T	V	L		
210bNR2P0		T				

Abbildung 6 B: Alignment der Aminosäuren 1-63 des HCV p7 von Patienten mit Amantadintherapie plus pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin

	TM1			TM2		
cons1b	A	L	E	G	A	A
	1	2	3	4	5	6
51bSR3A0	-	-	-	F	-	I
53bSR3A0	M	-	T	-	L	-
56bSR3A0	-	T	-	-	-	M
64bSR3A0	-	-	-	-	-	-
65bSR3A0	L	-	S	T	-	-
66bSR3A0	-	-	-	-	L	-
74bSR3A0	-	T	-	L	-	V
82bSR3A0	-	-	T	-	L	-
85bSR3A0	S	-	-	-	-	L
93bSR3A0	-	T	-	V	-	L
95bSR3A0	I	-	V	-	-	L
96bSR3A0	A	-	S	-	I	-
99bSR3A0	-	L	-	-	-	V
101bSR3A0	T	-	-	-	K	-
105bSR3A0	-	L	-	-	-	L
106bSR3A0	-	-	L	-	-	V
107bSR3A0	-	-	-	-	-	L
109bSR3A0	-	-	-	-	-	S
117bSR3A0	-	-	-	-	-	-
120bSR3A0	-	T	-	F	P	-
122bSR3A0	-	-	-	-	-	F
125bSR3A0	-	-	L	-	-	-
129bSR3A0	-	-	-	-	-	L
131bSR3A0	-	A	-	L	-	-
132bSR3A0	-	T	-	-	-	-
134bSR3A0	-	-	-	-	-	L
140bSR3A0	L	-	F	-	-	A
148bSR3A0	-	-	-	-	-	L
155bSR3A0	-	-	P	-	I	-
157bSR3A0	-	T	-	L	-	T
158bSR3A0	-	T	-	-	-	-
159bSR3A0	-	-	-	-	K	-
164bSR3A0	-	T	-	T	-	L
168bSR3A0	A	-	L	-	-	T
175bSR3A0	L	-	-	-	-	-
178bSR3A0	L	-	-	-	-	S
184bSR3A0	-	S	-	-	-	L
188bSR3A0	-	F	-	-	-	K
190bSR3A0	-	T	-	F	-	-
193bSR3A0	L	-	-	-	-	L
194bSR3A0	-	-	F	P	-	-
201bSR3A0	L	-	-	-	H	-
205bSR3A0	-	-	-	-	-	K
212bSR3A0	-	T	-	-	-	-
214bSR3A0	-	-	F	-	-	-
216bSR3A0	-	S	-	-	-	-
217bSR3A0	-	T	-	V	-	P
221bSR3A0	L	-	F	-	-	-
225bSR3A0	-	T	-	-	-	-
230bSR3A0	I	-	T	-	-	I
42bETR3A0	-	-	-	-	-	K
67bETR3A0	-	T	-	V	-	P
68bETR3A0	L	-	F	-	-	-
72bETR3A0	V	L	-	T	-	-
76bETR3A0	-	T	-	-	-	-
84bETR3A0	-	-	-	-	-	K
87bETR3A0	-	V	-	-	-	-
90bETR3A0	-	F	-	-	-	V
137bETR3A0	L	-	-	-	-	-
138bETR3A0	L	-	I	-	-	-
144bETR3A0	-	T	-	-	-	-
154bETR3A0	-	T	-	T	-	-
162bETR3A0	L	-	V	-	-	I
163bETR3A0	-	-	-	L	-	-
172bETR3A0	-	T	-	-	-	-
174bETR3A0	-	-	-	-	-	K
186bETR3A0	-	-	-	-	-	-
203bETR3A0	-	T	-	T	-	P
220bETR3A0	-	T	-	-	-	-
57bNR3A0	-	T	-	F	-	-
79bNR3A0	-	-	-	-	-	-
88bNR3A0	-	T	-	-	-	P
123bNR3A0	-	-	-	-	-	-
167bNR3A0	-	-	-	-	-	-
180bNR3A0	L	-	L	-	-	-
199bNR3A0	-	-	-	-	-	-
202bNR3A0	-	-	P	-	-	-
222bNR3A0	I	-	V	-	T	-

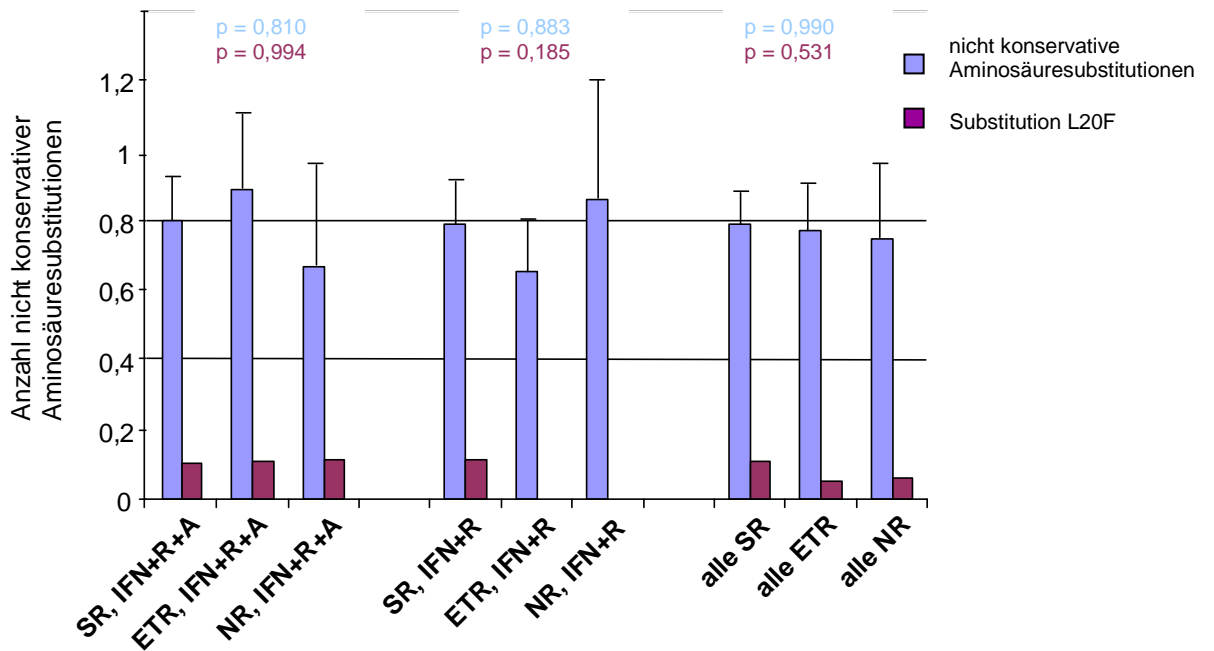
Striche zeigen eine Übereinstimmung mit der Konsensussequenz, vertikale Linien die transmembranen Domänen 1 und 2 (TM1, TM2) an. SR sustained response, ETR end-of-treatment response, NR non-response.

Abbildung 7: Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen in der kompletten HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen



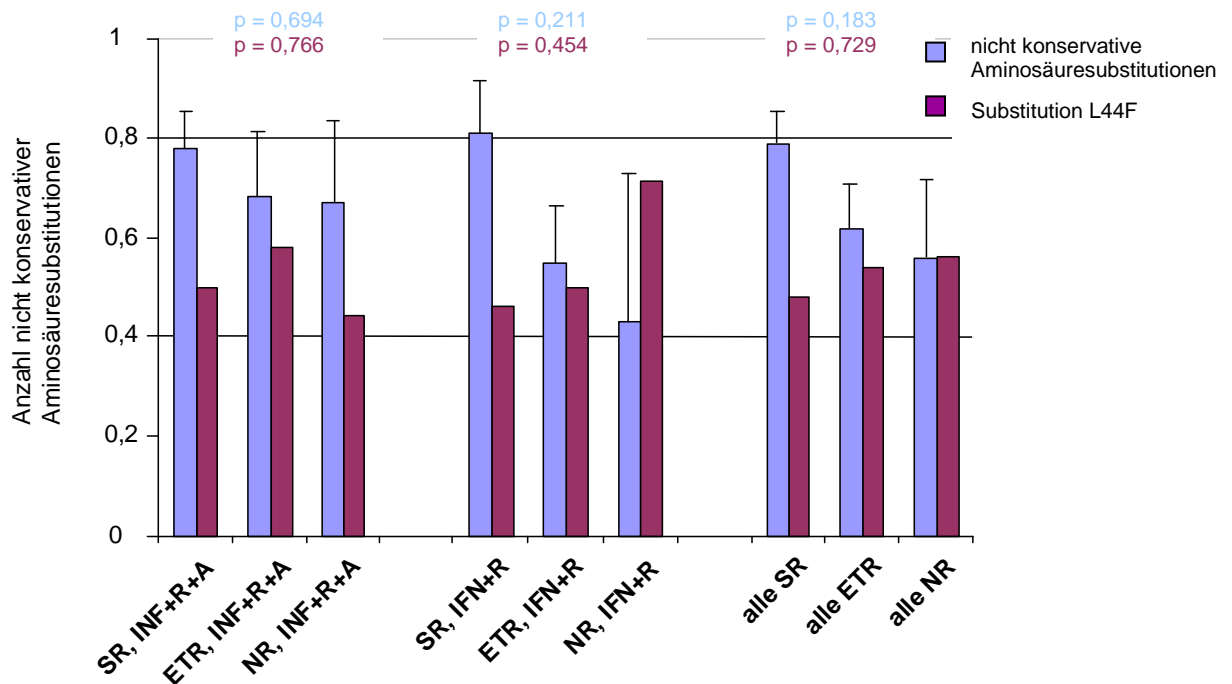
Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 8: Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen im TM1 Abschnitt (AS 13-32) der HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen



Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 9: Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen im TM2-Abschnitt (AS 39-58) der HCV-1b-p7-Sequenz mit dem virologischen Therapieansprechen



Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Abbildungen 7,8 und 9 zeigen die Assoziation nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen im HCV p7 mit dem virologischen Therapieansprechen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für die Anzahl nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen in Isolaten vor Behandlungsbeginn von Patienten mit einer HCV Genotyp 1b Infektion und sustained response (SR), end-of-treatment response (ETR), oder non-response (NR) auf eine antivirale Kombinationstherapie innerhalb der kompletten p7-Sequenz (Abb. 7) bzw. innerhalb der transmembranen Domänen 1 und 2 (TM1: Abb. 8 und TM2: Abb. 9). 99 Patienten (SR n=50, ETR n=19, NR n=9, DO n = 21) erhielten hierbei Amantadin (A), 89 Patienten (SR n=52, ETR n=20, NR n=7, DO n = 10) Placebo zusätzlich zu pegyliertem Interferon alfa 2a (IFN) und Ribavirin (R). Die jeweiligen p zeigen den Vergleich SR versus ETR versus NR bezüglich der Anzahl nicht konservativer Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Therapiegruppen (INF+R+A, bzw. IFN+R) und beider Therapiegruppen zusammengefasst (alle SR, ETR, NR).

4. Diskussion

Mit der bisher für die Behandlung der chronischen Hepatitis C zugelassenen Standardtherapie aus pegyliertem IFN-alfa und Ribavirin können bei dem in Deutschland häufigsten HCV Genotyp 1 nur unbefriedigende Heilungsraten von 46-52% erzielt werden (Manns et al. 2001; Fried et al. 2002; Hadziyannis et al. 2004). Neuere Substanzen scheinen vielversprechend, dennoch wird eine antivirale Kombinationsbehandlung erforderlich sein, um dem Problem der viralen Resistenzentwicklung zu begegnen (Forestier et al. 2007; Kieffer et al. 2007; Rodriguez-Torres et al. 2007; Sarrazin et al. 2007). HCV p7-Inhibitoren könnten möglicherweise Bestandteil einer solchen antiviralen Kombinationstherapie sein. Die in diesem Zusammenhang am besten untersuchte Substanz ist das Amantadin. Im Jahr 2003 beschrieben Griffin und Mitarbeiter erstmals einen möglichen Mechanismus für eine antivirale Aktivität von Amantadin gegenüber dem HCV. Sie beobachteten in vitro eine Ausbildung von Ionenkanälen durch das HCV p7. Die Leitfähigkeit der HCV p7-Ionenkanäle konnte durch Amantadin blockiert werden (Griffin et al. 2003; Griffin et al. 2004; StGelais et al. 2007; Griffin et al. 2008; StGelais et al. 2009).

Aber obwohl die oben genannten in vitro Studien einen plausiblen Mechanismus für eine antivirale Aktivität von Amantadin gegenüber dem HCV aufzeigen, sind die Ergebnisse klinischer Studien zum möglichen zusätzlichen Benefit einer Amantadingabe im Rahmen einer antiviralen Therapie der chronischen Hepatitis C kontrovers. Beispielsweise ergaben sich bei klinischen Studien bei Therapie-naiven Patienten, bei denen eine Interferon-Monotherapie einer Interferon-Amantadin-Kombinationstherapie gegenüber gestellt wurde, keine bis nur mäßige Verbesserungen der dauerhaften Viruseliminationsraten (Zeuzem et al. 2000; Caronia et al. 2001; Helbling et al. 2002). Bei Caronia et al. oder Helbling et al. hatte sich eine mäßig erhöhte dauerhafte Viruseliminationsrate bei Patienten mit Interferon alfa plus Amantadin (18% bzw. 21%) gegenüber Interferon-Monotherapie (15% bzw. 14%) gezeigt, wobei der Unterschied zwischen beiden Therapiearmen nicht statistisch signifikant war (Caronia et al. 2001; Helbling et al. 2002). Tabone und Mitarbeiter konnten ebenfalls 2001 in einer ähnlich angelegten Studie mit Interferon versus

Interferon plus Amantadin eine signifikant erhöhte frühe Therapieansprechrates, definiert als negative HCV RNA PCR (mit einer unteren Nachweisgrenze von 1000 Kopien/ml) zu Therapiemonat drei, mit 61% in der Kombitherapiegruppe versus 46% in der Monotherapiegruppe ($p < 0,05$) darstellen. Auch in dieser Studie unterschieden sich aber beide Therapiegruppen nicht signifikant hinsichtlich des Langzeittherapieansprechens (Tabone et al. 2001).

Dagegen konnten Mangia und Mitarbeiter in einer Studie mit insgesamt 200 Patienten eine signifikant erhöhte dauerhafte Viruseliminationsrate ($p = 0,036$) bei Therapie-naiven Patienten mit einer Interferon und Amantadin Kombitherapie (29,3%) im Vergleich zu einer Interferon-Monotherapie (16,8%) beobachten (Mangia et al. 2001). Eine Metaanalyse aus 6 kontrollierten Studien bestätigte der Kombination von Interferon und Amantadin eine Überlegenheit bei der dauerhaften Viruseradikation gegenüber einer Interferon-Monotherapie (Mangia et al. 2004). In einer anderen Metaanalyse aus 31 randomisierten kontrollierten Studien fand sich jedoch lediglich bei Patienten mit Therapieversagen auf eine Vorbehandlung ein zusätzliches Benefit hinsichtlich des dauerhaften virologischen Ansprechens für eine antivirale Kombinationstherapie mit Amantadin, während Therapie-naive Patienten oder solche mit erneutem Auftreten des HCV nach Ende einer Vortherapie (Relapser) nicht von einer zusätzlichen Gabe von Amantadin profitierten (Deltenre et al. 2004). In einer Studie mit 400 vorher unbehandelten Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde eine Zunahme des Anteils an Patienten mit dauerhaftem virologischem Ansprechen unter dreifacher Therapie mit Interferon alfa /Ribavirin/Amantadin im Vergleich zur Therapie mit Interferon alfa /Ribavirin/Placebo festgestellt (Berg et al. 2003). Dagegen steht jedoch insbesondere die zuletzt durchgeführte größte randomisierte Placebo-kontrollierte Studie von von Wagner et al., die keine Vorteile einer zusätzlichen Amantadindgabe zu pegyliertem Interferon alfa und Ribavirin für das dauerhafte virologische Ansprechen bei der Therapie der chronischen Hepatitis C bei Therapie-naiven Patienten nachweisen konnte (von Wagner et al. 2008).

Ähnlich kontrovers wie die Ergebnisse klinischer Studien zur antiviralen Wirksamkeit des Amantadin bei der chronischen Hepatitis C fielen auch neuere Untersuchungen zum Effekt der Substanz auf das HCV in vitro aus.

Nachdem Griffin und Mitarbeiter im Jahr 2003 erstmals in vitro eine Ausbildung von Ionenkanälen durch das HCV p7 und die Blockade dieser Ionenkanäle durch Amantadin in einem künstlichen Membransystem beschrieben hatten (Griffin et al. 2003), folgten zahlreiche weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung. Dabei bestätigten einige Arbeiten die Hemmung des HCV p7-Ionenkanals durch Amantadin (Griffin et al. 2003; Griffin et al. 2004; Clarke et al. 2006; StGelais et al. 2007; Griffin et al. 2008; StGelais et al. 2009), während sich in anderen Arbeiten auch in vitro kein antiviraler Effekt von Amantadin gegenüber dem HCV nachweisen ließ (Steinmann et al. 2007; Gottwein et al. 2009; Montserret et al. 2010).

In den neueren Untersuchungen wurden HCV Zellkultursysteme eingesetzt, die nicht nur eine Beurteilung der Auswirkungen von Amantadin auf die p7-Ionenkanalleitfähigkeit sondern auch auf die RNA Replikation und die Freisetzung und Infektiosität von HCV Partikeln erlauben (Steinmann et al. 2007; Griffin et al. 2008; Gottwein et al. 2009). So untersuchten Steinmann und Mitarbeiter den Effekt von Amantadin auf Zellkultursysteme von HCV Genotyp 1a (H77), 1b (Con1) und 2a(JFH-1, J6) Isolaten. Dabei fand sich kein antiviraler Effekt von Amantadin auf die RNA Replikation oder die Freisetzung und Infektiosität von HCV Partikeln.

Zusätzlich führten Steinmann und Mitarbeiter Untersuchungen an einem künstlichen Membransystem durch. Auch hierbei war keine Hemmung der Leitfähigkeit des p7-Ionenkanals durch Amantadin in Dosen bis 10,3 µg/ml zu beobachten, während bei Griffin et al. eine komplette Hemmung des p7-Ionenkanals bereits bei 0,188 µg/ml berichtet wurde (Griffin et al. 2003; Steinmann et al. 2007). Steinmann et al. diskutieren Unterschiede im verwendeten p7-Protein als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse: Griffin und Mitarbeiter verwendeten GST-p7 und GST-HIS-p7-Fusionsproteine, während sie selbst für die Untersuchungen am künstlichen

Membransystem ein authentisches in vitro synthetisiertes p7-Protein einsetzen (Steinmann et al. 2007). Darüber hinaus verwendeten Griffin und Mitarbeiter ein HCV Genotyp 1b (HCV J4, 1b) Isolat, während Steinmann und Mitarbeiter im künstlichen Membransystem mit einem p7-Protein des HCV Genotypa 1a (H77) arbeiteten (Griffin et al. 2003; Steinmann et al. 2007).

In einer neuen Arbeit von 2009 belegen Griffin und Mitarbeiter, dass sich die verschiedenen HCV Genotypen und Subtypen deutlich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Amantadin unterscheiden. Sogar verschiedene Isolate eines Subtyps können sich offenbar in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Amantadin unterscheiden, so dass also bereits geringe Unterschiede in der p7-Aminosäuresequenz eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Amantadin bedingen. Untersucht wurden dabei die Effekte von Amantadin in einem HCV Zellkultursystem und auch in einem Liposomen-basierten Assay. Während das HCV JFH-1 (Genotyp 2a) Isolat sowohl im Zellkultursystem als auch im Liposomen-basierten Assay gegenüber Amantadin unempfindlich war, reagierte das HCV J6, ebenfalls ein Genotyp 2a Isolat, empfindlich auf Amantadin. Neben dem HCV JFH-1 Isolat reagierte auch das HCV Con-1 Isolat im Zellkultursystem nicht Amantadin empfindlich. Diese Beobachtungen befinden sich in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Steinmann et al. bzw. Gottwein et al.. Allerdings zeigten sich bei Griffin et al. eine geringe Sensitivität von HCV H77 und eine ausgeprägte Sensitivität der HCV Isolate J6 und 452 gegenüber Amantadin im Zellkultursystem während bei Steinmann et al. bzw. Gottwein et al. die HCV Isolate J6 und H77 bzw. H77C und S52 nicht Amantadin empfindlich waren (Steinmann et al. 2007; Gottwein et al. 2009; Griffin et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte in Unterschieden bei der Durchführung der Untersuchungen liegen. So verwendeten Griffin et al. beispielsweise Huh7-Zellen während Steinmann et al. bzw. Gottwein et al. Huh7.5 und Huh7-Lunet Zelllinien einsetzen (Steinmann et al. 2007; Gottwein et al. 2009; Griffin et al. 2009).

Die Beobachtungen von Griffin und Mitarbeitern (Griffin et al. 2009), dass die Amantadinempfindlichkeit in Abhängigkeit vom HCV Genotyp und Subtyp bzw. sogar innerhalb eines Subtyps variiert, also stark von geringen Unterschieden in der Aminosäuresequenz des HCV p7-Proteins abhängt, bietet eine mögliche Erklärung für die kontroversen Ergebnisse klinischer Studien. Je nach Zusammensetzung des Studienkollektivs mit mehr oder weniger Amantadin empfindlichen HCV Varianten könnte es zu einem Benefit von Amantadin in Bezug auf das dauerhafte virologische Ansprechen kommen oder auch nicht. Darüber hinaus erscheint die rasche Ausbildung von Resistenzen gegenüber Amantadin möglich, wenn die Amantadinempfindlichkeit bereits von geringen Änderungen in der HCV p7-Aminosäuresequenz beeinflusst wird. Dieses Phänomen ist hinlänglich vom Influenza M2 Protein bekannt, einem funktionell dem HCV p7 verwandten Protein, das ebenfalls zu Ionenkanälen homooligomerisiert. Im Influenza M2 Ionenkanal interagiert Amantadin mit den Aminosäuren, die die Kanalpore ausbilden. Punktmutationen in diesem Bereich führen zu einer Resistenz der Influenza Viren gegenüber Amantadin (Hay et al. 1985; Pinto et al. 1997; Suzuki et al. 2003).

In einer aktuellen Untersuchung des HCV p7-Proteins und seiner Interaktion mit Amantadin mittels Magnetresonanztomographie (MRT) konnten Konformationsänderungen in bestimmten Bereichen des HCV p7 nach Zugabe von Amantadin beobachtet und somit die Aminosäuren des HCV p7 identifiziert werden, die mutmaßlich mit Amantadin interagieren. Das betraf einmal H17, welches an der Bildung der Ionenkanalpore beteiligt ist, und interessanterweise L51-57 mit Ausnahme von L53 (Cook und Opella 2009). Dieser C-terminal gelegene Part befindet sich außerhalb der Ionenkanalpore und scheint intermolekular mit anderen viralen oder zellulären Faktoren zu interagieren (Montserret et al. 2010). Mutationen im Bereich von H17 führen zu einer stark eingeschränkten Ionenkanalaktivität im Vergleich zum Wildtyp, so dass sie nicht für eine Resistenzentwicklung in Frage kommen (StGelais et al. 2009). Bemerkenswerterweise führte aber die Mutation L(50-55)A in neueren Untersuchungen von StGelais und Mitarbeitern nicht zu einer eingeschränkten Ionenkanalaktivität im Vergleich zum Wildtyp, wohl aber zu einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber Amantadin (StGelais et al. 2009). In

der gleichen Arbeit charakterisierten StGelais und Mitarbeiter einige Mutationen, die - in Kombination auftretend - zu einem, im Vergleich zum Wildtyp hyperaktiven Ionenkanal führten: F22A/F25A/F26A (StGelais et al. 2009). Dieser war zwar prinzipiell Amantadin empfindlich, aber dennoch könnte die Ausbildung hyperaktiver Kanäle zur Ausbildung einer Amantadin Resistenz beitragen. In der vorliegenden Arbeit war allerdings in keinem einzigen Isolat Phenylalanin in all diesen drei Positionen (F22/F25/F26) durch eine andere Aminosäure ersetzt. Ein gleichzeitiges Abweichen von der Aminosäure Leucin in allen sechs Positionen (L50-55) oder auch nur in mehr als einer dieser Positionen lag in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei keinem einzigen Isolat vor. L57 war komplett konserviert.

In einer Pilotstudie unserer eigenen Arbeitsgruppe mit einem im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kleineren und wesentlich inhomogeneren Patientenkollektiv schien die Aminosäuresubstitution L20F assoziiert mit einem virologischen Non-Response spezifisch gegenüber Amantadin, wenngleich der Effekt nicht statistisch signifikant war ($p = 0,099$) (Mihm et al. 2006). Darüber hinaus wiesen in dieser Arbeit Patienten mit einer HCV 1b Infektion und Nichtansprechen auf eine antivirale Kombinationstherapie mit oder ohne Amantadin eine höhere Anzahl nicht-konservativer Aminosäurevariationen innerhalb des HCV p7 auf, als Patienten mit virologischem Ansprechen (Mihm et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit fanden sich jedoch weder eine Assoziation zwischen der Anzahl an (nicht-konservativen) Aminosäurevariationen innerhalb des HCV-1b p7 und dem Therapieansprechen oder dem Behandlungsarm (Amantadin / Placebo), noch zeigte sich eine Assoziation zwischen der Substitution L20F und dem Therapieansprechen. Auch war kein Unterschied in der Häufigkeit der Substitution L20F zwischen Therapieansprechern und Therapieversagern der beiden Behandlungsarme zu beobachten. Insgesamt ließen sich somit in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise auf vor Therapiebeginn präexistente Aminosäurevariationen, die zu einer verminderten Amantadinempfindlichkeit führen könnten, finden.

In einer zukünftigen Arbeit wäre es aber unter Umständen interessant, nach Mutationen innerhalb des HCV p7 im Verlauf einer Amantadin haltigen Therapie zu suchen, optimalerweise im Verlauf einer Amantadinmonotherapie. Für einen solchen Ansatz sprechen verschiedene Beobachtungen, die sich in der Literatur zum Thema finden lassen. In einer Viruskinetikstudie beschreiben Chan und Mitarbeiter, einen HCV RNA Abfall nach drei Tagen mit einem Rebound an Tag 7 unter einer Amantadinmonotherapie (Chan et al. 2002). Auch Maynard und Mitarbeiter sowie Castelain und Mitarbeiter berichten von einem passageren positiven Effekt auf den Abfall der HCV RNA unter einer Dreifachkombination von Amantadin mit Interferon alfa und Ribavirin im Vergleich zur Zweifachtherapie mit Interferon alfa und Ribavirin (Maynard et al. 2006; Castelain et al. 2007). Ein solch passagerer Effekt auf den HCV RNA Abfall mit anschließendem Rebound wäre mit einer Ausbildung von Resistenzmutationen im Verlauf einer Amantadiningabe erklärbar. Darüber hinaus beobachteten Castelain und Mitarbeiter unter einer Amantadin haltigen Dreifachtherapie eine Abnahme der genetischen Diversität in den HCV Quasispezies von Patienten mit einer HCV Genotyp 1a Infektion (Castelain et al. 2007). Auch dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen Selektionsdruck des Amantadin sein. Die Identifizierung spezifischer Mutationen, die im Therapieverlauf zu einer Amantadinresistenz führen könnten, gelang jedoch auch in der genannten Arbeit nicht (Castelain et al. 2007). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Direktsequenzierung des HCV p7 bei 188 Patienten mit einer HCV Genotyp 1b Infektion und antiviralen Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon alfa-2a und Ribavirin plus/minus Amantadin keine vor Therapiebeginn präexistenten Aminosäurevarianten mit konsekutiver Amantadinresistenz identifizieren ließen. Da alle HCV p7-Isolate der vorliegenden Arbeit von Patienten mit einer Genotyp 1 Infektion stammen, sollte bedacht werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eventuell nicht auf andere HCV Genotypen übertragen werden können. Zur weiteren Klärung des Stellenwertes von Amantadin in der antiviralen Kombinationstherapie der chronischen Hepatitis C erscheinen sequentielle Analysen der HCV Quasispezies, möglichst von verschiedenen Genotypen und Subtypen, im Verlauf einer Amantadinmonotherapie sinnvoll.

5 Referenzen

- 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* 96:12766-12771
- 2 Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR (2006) Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* 80:4501-4509
- 3 Aoki FY, Sitar DS (1988) Clinical pharmacokinetics of amantadine hydrochloride. *Clin Pharmacokinet* 14:35-51
- 4 Bartenschlager R (1999) The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J Viral Hepat* 6:165-181
- 5 Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Toida T, Van Kuppevelt TH, Depla E, Von Weizsacker F, Blum HE, Baumert TF (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278:41003-41012
- 6 Berg T, Kronenberger B, Hinrichsen H, Gerlach T, Buggisch P, Herrmann E, Spengler U, Goeser T, Nasser S, Wursthorn K, Pape GR, Hopf U, Zeuzem S (2003) Triple therapy with amantadine in treatment-naive patients with chronic hepatitis C: a placebo-controlled trial. *Hepatology* 37:1359-1367
- 7 Bukh J, Miller RH, Purcell RH (1995) Genetic heterogeneity of the hepatitis C virus. *Princess Takamatsu Symp* 25:75-91
- 8 Caronia S, Bassendine MF, Barry R, Mills P, Naoumov NV, Fox R, Lowes J, Hollanders D, Murray-Lyon L, Irving WL, Goldin RD, Foster GR (2001) Interferon plus amantadine versus interferon alone in the treatment of naive patients with chronic hepatitis C: a UK multicentre study. *J Hepatol* 35:512-516
- 9 Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76:3720-3730
- 10 Castelain S, Bonte D, Penin F, Francois C, Capron D, Dedeurwaerder S, Zawadzki P, Morel V, Wychowski C, Duverlie G (2007) Hepatitis C Virus p7 membrane protein quasispecies variability in chronically infected patients treated with interferon and ribavirin, with or without amantadine. *J Med Virol* 79:144-154

- 11 Chan J, O'Riordan K, Wiley TE (2002) Amantadine's viral kinetics in chronic hepatitis C infection. *Dig Dis Sci* 47:438-442
- 12 Chemello L, Alberti A, Rose K, Simmonds P (1994) Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N Engl J Med* 330:143
- 13 Chew CF, Vijayan R, Chang J, Zitzmann N, Biggin PC (2009) Determination of pore-lining residues in the hepatitis C virus p7 protein. *Biophys J* 96:L10-12
- 14 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* 244:359-362
- 15 Clarke D, Griffin S, Beales L, Gelais CS, Burgess S, Harris M, Rowlands D (2006) Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *J Biol Chem* 281:37057-37068
- 16 Cook GA, Opella SJ (2009) NMR studies of p7 protein from hepatitis C virus. *Eur Biophys J* 39:1097-1104
- 17 Deltentre P, Henrion J, Canva V, Dharancy S, Texier F, Louvet A, De Maeght S, Paris JC, Mathurin P (2004) Evaluation of amantadine in chronic hepatitis C: a meta-analysis. *J Hepatol* 41:462-473
- 18 Di Bisceglie AM, Shindo M, Fong TL, Fried MW, Swain MG, Bergasa NV, Axiotis CA, Waggoner JG, Park Y, Hoofnagle JH (1992) A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 16:649-654
- 19 Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM (1994) Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68:6147-6160
- 20 Duff KC, Ashley RH (1992) The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology* 190:485-489
- 21 El-Serag HB (2002) Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology* 36:S74-83
- 22 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* 446:801-805
- 23 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* 292:767-770

- 24 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* 46:640-648
- 25 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* 347:975-982
- 26 Goff JS, Reveille RM, Johnson J (2000) Treatment of chronic hepatitis C with amantadine. *Dig Dis Sci* 45:1389-1391
- 27 Gonzalez ME, Carrasco L (2003) Viroporins. *FEBS Lett* 552:28-34
- 28 Gottwein JM, Scheel TK, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J (2009) Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 49:364-377
- 29 Griffin J, Singh AK, Senapati D, Lee E, Gaylor K, Jones-Boone J, Ray PC (2009) Sequence-specific HCV RNA quantification using the size-dependent nonlinear optical properties of gold nanoparticles. *Small* 5:839-845
- 30 Griffin S, Stgelais C, Owsianka AM, Patel AH, Rowlands D, Harris M (2008) Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel. *Hepatology* 48:1779-1790
- 31 Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535:34-38
- 32 Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ (2004) A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 85:451-461
- 33 Gutterman JU (1994) Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1198-1205
- 34 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* 140:346-355

- 35 Haqshenas G, Mackenzie JM, Dong X, Gowans EJ (2007) Hepatitis C virus p7 protein is localized in the endoplasmic reticulum when it is encoded by a replication-competent genome. *J Gen Virol* 88:134-142
- 36 Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH (1985) The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 4:3021-3024
- 37 Helbling B, Stamenic I, Viani F, Gonvers JJ, Dufour JF, Reichen J, Cathomas G, Steuerwald M, Borovicka J, Sagmeister M, Renner EL (2002) Interferon and amantadine in naive chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 35:447-454
- 38 Hoofnagle JH (1999) Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J Hepatol* 31 Suppl 1:264-268
- 39 Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36:S21-29
- 40 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* 172:261-264
- 41 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* 87:9524-9528
- 42 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* 46:631-639
- 43 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* 244:362-364
- 44 Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM (1994) Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 68:5063-5073
- 45 Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth P, Jr., Dwek RA, Biggin PC, Venien-Bryan C, Zitzmann N (2009) The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12712-12716

- 46 Mangia A, Minerva N, Annese M, Leandro G, Villani MR, Santoro R, Carretta V, Bacca D, Giangaspero A, Bisceglia M, Ventrella F, Dell'Erba G, Andriulli A (2001) A randomized trial of amantadine and interferon versus interferon alone as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 33:989-993
- 47 Mangia A, Leandro G, Helbling B, Renner EL, Tabone M, Sidoli L, Caronia S, Foster GR, Zeuzem S, Berg T, Di Marco V, Cino N, Andriulli A (2004) Combination therapy with amantadine and interferon in naive patients with chronic hepatitis C: meta-analysis of individual patient data from six clinical trials. *J Hepatol* 40:478-483
- 48 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* 358:958-965
- 49 Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67:117-130
- 50 Maynard M, Pradat P, Bailly F, Rozier F, Nemoz C, Si Ahmed SN, Adeleine P, Trepo C (2006) Amantadine triple therapy for non-responder hepatitis C patients. Clues for controversies (ANRS HC 03 BITRI). *J Hepatol* 44:484-490
- 51 McHutchison JG, Poynard T (1999) Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 19 Suppl 1:57-65
- 52 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* 11:507-519
- 53 Mirny LA, Shakhnovich EI (1999) Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *J Mol Biol* 291:177-196
- 54 Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K (1994) Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol* 68:6215-6222
- 55 Mizushima H, Hijikata M, Tanji Y, Kimura K, Shimotohno K (1994) Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2. *J Virol* 68:2731-2734

- 56 Montserret R, Saint N, Vanbelle C, Salvay AG, Simorre JP, Ebel C, Sapay N, Renisio JG, Bockmann A, Steinmann E, Pietschmann T, Dubuisson J, Chipot C, Penin F (2010) NMR structure and ion channel activity of the p7 protein from hepatitis C virus. *J Biol Chem*
- 57 Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007) Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5:453-463
- 58 NIH (2002) NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consens State Sci Statements* 19:1-46
- 59 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* 88:3392-3396
- 60 Palitzsch KD, Hottentrager 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* 11:1215-1220
- 61 Patargias G, Zitzmann N, Dwek R, Fischer WB (2006) Protein-protein interactions: modeling the hepatitis C virus ion channel p7. *J Med Chem* 49:648-655
- 62 Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6104-6108
- 63 Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, Hezode C, Germanidis G, Lonjon I, Castera L, Dhumeaux D (2004) Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126:703-714
- 64 Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39:5-19
- 65 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* 282:938-941
- 66 Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69:517-528
- 67 Pinto LH, Dieckmann GR, Gandhi CS, Papworth CG, Braman J, Shaughnessy MA, Lear JD, Lamb RA, DeGrado WF (1997) A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11301-11306

- 68 Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457:882-886
- 69 Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett* 557:99-103
- 70 Reed KE, Rice CM (2000) Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:55-84
- 71 Rodriguez-Torres M, Rodriguez-Orengo JF, Rios-Bedoya CF, Fernandez-Carbia A, Gonzalez-Lassalle E, Salgado-Mercado R, Marxuach-Cuetara AM (2007) Efficacy and safety of peg-IFN alfa-2a with ribavirin for the treatment of HCV/HIV coinfecting patients who failed previous IFN based therapy. *J Clin Virol* 38:32-38
- 72 Sakaguchi T, Tu Q, Pinto LH, Lamb RA (1997) The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5000-5005
- 73 Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11646-11651
- 74 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- 75 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* 132:1767-1777
- 76 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* 21:5017-5025
- 77 Seeff LB (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36:S35-46
- 78 Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK (1972) Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177:705-706

- 79 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 (Pt 11):2391-2399
- 80 Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A (2005) Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973
- 81 Steinmann E, Koutsoudakis G, Kallis S, Zitzmann N, Saint N, Penin F, Pietschmann T, Bartenschlager R. Analysis of amantadine and iminosugar derivatives as potential inhibitors of the HCV life cycle. 12th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Montreal, Canada; 2005.
- 82 Steinmann E, Whitfield T, Kallis S, Dwek RA, Zitzmann N, Pietschmann T, Bartenschlager R (2007) Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus. *Hepatology* 46:330-338
- 83 StGelais C, Tuthill TJ, Clarke DS, Rowlands DJ, Harris M, Griffin S (2007) Inhibition of hepatitis C virus p7 membrane channels in a liposome-based assay system. *Antiviral Res* 76:48-58
- 84 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* 83:7970-7981
- 85 Sugrue RJ, Bahadur G, Zambon MC, Hall-Smith M, Douglas AR, Hay AJ (1990) Specific structural alteration of the influenza haemagglutinin by amantadine. *EMBO J* 9:3469-3476
- 86 Suzuki H, Saito R, Masuda H, Oshitani H, Sato M, Sato I (2003) Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother* 9:195-200
- 87 Tabone M, Laudi C, Delmastro B, Biglino A, Andreoni M, Chieppa F, Bonardi R, Cariti G, Cusumano S, Brunello F, Calleri G, Manca A, Della Monica P, Sidoli L, Rizzetto M, Pera A (2001) Interferon and amantadine in combination as initial treatment for chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 35:517-521
- 88 Takeuchi K, Lamb RA (1994) Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J Virol* 68:911-919
- 89 Tan SL, Pause A, Shi Y, Sonenberg N (2002) Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov* 1:867-881

- 90 von Wagner M, Hofmann WP, Teuber G, Berg T, Goeser T, Spengler U, Hinrichsen H, Weidenbach H, Gerken G, Manns M, Buggisch P, Herrmann E, Zeuzem S (2008) Placebo-controlled trial of 400 mg amantadine combined with peginterferon alfa-2a and ribavirin for 48 weeks in chronic hepatitis C virus-1 infection. *Hepatology* 48:1404-1411
- 91 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* 32:91-96
- 92 Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C (2007) Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20:23-38
- 93 Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G (1995) [Viral hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 33:117-132
- 94 Zeuzem S, Teuber G, Naumann U, Berg T, Raedle J, Hartmann S, Hopf U (2000) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alfa2a with and without amantadine as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 32:835-841

6. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Sarrazin möchte ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung sowohl während der Laborarbeiten, als auch bezüglich der Korrekturen danken.

Außerdem möchte ich meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. med. Ulrike Mihm danken, die mir bei Unklarheiten stets zur Seite stand, viel Geduld zeigte und mir die Arbeit durch ihren fachlichen Rat oft erleichterte.

Für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit im Labor der Gastroenterologie der Universitätsklinik Homburg möchte ich dem ehemaligen Laborteam und insbesondere Dr. rer. nat. Simone Susser, Dr. rer. nat. Annette Wohnsland und Tanja Sonntag danken.

Herrn Dr. med. Michael von Wagner möchte ich für die freundliche Überlassung von klinischen Daten der PRAMA-Studie danken.

Als Korrekturlesern möchte ich mich bei Frau Dr. med Annika Vermehren und bei meinem Mann bedanken.

7. Lebenslauf

Ulrike Elisabeth Elsler

Persönliche Informationen

- Geburtsdatum: 23.11.1982
- Geburtsort: Tübingen
- Familienstand: verheiratet
- Geburtsname: Plieninger

Ausbildung

Schule: 1989 – 1993 Grundschule Gerolfing
1993 – 2002 Reuchlin - Gymnasium Ingolstadt
Abitur im Juni 2002

Studium: 2002 - 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät Homburg / Saar
Staatsexamen und Approbation als Ärztin im Dezember 2008

Praktika

Famulaturen:

- 02/2005 – 03/2005 Praxisfamulatur im Fachgebiet HNO
- 08/2005 – 09/2005 Praxisfamulatur im Fachgebiet HNO
- 08/2006 – 09/2006 Famulatur im Fachbereich Dermatologie an der Universitätsklinik des Saarlandes
- 02/2007 – 03/2007 Famulatur im Fachbereich Gastroenterologie an der Universitätsklinik des Saarlandes

Praktisches Jahr:

- 08/2007 – 12/2007 Innere Medizin in Gastroenterologie und Kardiologie der Winterbergkliniken Saarbrücken
- 12/2007 – 02/2008 Chirurgie in der Klinik für Allgemeinchirurgie des Kantospitals St. Gallen (CH)
- 02/2008 – 04/2008 Chirurgie in der Klinik für Unfallchirurgie der Winterbergkliniken Saarbrücken
- 04/2008 – 07/2008 Radiologie in den Winterbergkliniken Saarbrücken

Weiterbildung

03/2009 – 06/2010 Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin des Knappschaftskrankenhauses Püttlingen
seit 09/2010 Assistenzärztin im Gesundheitswesen der Audi AG