

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg/Saar
mit den Schwerpunkten
Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie,
Diabetologie und Ernährungsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Zeuzem

Detektion von Varianten und Polymorphismen im Nicht-
Strukturprotein 5A des Hepatitis C Virusgenoms, die mit einer
gesteigerten Resistenz oder Sensitivität des Virus gegenüber
einer antiviralen Therapie mit Peg Interferon alfa-2a und
Ribavirin assoziiert sind.

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg/Saar 2007

vorgelegt von
Annika Ulrike Kau
geb. am 06.03.1981 in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	9
2 EINLEITUNG	14
2.1 GESCHICHTE UND EPIDEMIOLOGIE DER HEPATITIS C.....	14
2.2 MOLEKULARBIOLOGIE DES HEPATITIS C VIRUS	14
2.3 VIRUSREPLIKATION.....	18
2.4 INFektion UND KRANKHEIT.....	19
2.5 GENOTYPEN UND QUASISPEZIES	20
2.6 THERAPIE DER CHRONISCHEN HEPATITIS C.....	22
2.7 INTERFERONWIRKUNG UND RESISTENZ BEI HCV.....	24
2.7.1 <i>Interferone und Interferonsignalweg</i>	24
2.7.2 <i>Interferonwirkung bei einer Hepatitis C Virus-Infektion</i>	25
2.7.3 <i>Interferonresistenz bei HCV</i>	26
2.8 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DIESER ARBEIT	28
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 GERÄTE	29
3.2 EINWEGMATERIALIEN.....	30
3.3 CHEMIKALIEN	30
3.4 REAGENZIEN	31
3.4.1 <i>Fertige Reagenzien-Sets</i>	31
3.4.2 <i>DNA-Längenstandards</i>	31
3.4.3 <i>Enzyme</i>	31
3.4.4 <i>Oligonukleotide</i>	31
3.5 PRIMER	32
3.5.1 <i>Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des NS5A-Abschnittes</i>	32
3.5.2 <i>Primer zur Sequenzierungs-PCR der Klone direkt vom TOPO[®]-Vektor</i>	32
3.6 PATIENTEN.....	33
3.7 SEREN	34
3.8 EXTRAKTION VIRALER RNA AUS SERUM.....	34
3.9 AMPLIFIKATION DES SPEZIFISCHEN GENOMABSCHNITTES	35
3.9.1 <i>Herstellung von RNase-freiem Wasser (DMPC-Wasser)</i>	35
3.9.2 <i>Herstellung eines dNTP-Mix</i>	35
3.9.3 <i>Reverse Transkription</i>	35
3.9.4 <i>Polymerase Kettenreaktion</i>	36

3.9.5	<i>Herstellung von Puffern und Lösungen zur Gelelektrophorese</i>	40
3.9.6	<i>Aufreinigen von PCR-Produkten</i>	40
3.9.7	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	40
3.10	SEQUENZIERUNG.....	42
3.10.1	<i>Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion</i>	42
3.10.2	<i>Aufreinigung vor der Sequenzanalyse</i>	43
3.10.3	<i>Sequenzanalyse im Sequenzierautomaten</i>	43
3.11	BEARBEITUNG UND SICHERUNG DER SEQUENZEN.....	44
3.12	MUTATIONSANALYSE NS5A.....	45
3.12.1	<i>Erstellung der Konsensus-Sequenzen</i>	45
3.12.2	<i>Analyse konservierter und nicht-konservierter Bereiche</i>	46
3.12.3	<i>Konformative und phylogenetische Analyse</i>	46
3.12.4	<i>Lokale statistische Datenanalyse</i>	46
3.13	KLONIERUNG VON QUASISPEZIESVARIANTEN.....	48
3.13.1	<i>Ligation</i>	48
3.13.2	<i>Transformation</i>	48
3.13.3	<i>Herstellung der Kandamycin/ Ampicillin-Agarplatte zur Klonierung</i>	49
3.13.4	<i>Kultivierung</i>	50
3.13.5	<i>Sequenzierung der Klone</i>	51
3.14	STATISTISCHE METHODEN DER QUASISPEZIES-AUSWERTUNG.....	53
3.14.1	<i>Variantenentwicklung unter Kombinationstherapie</i>	53
3.14.2	<i>Berechnung der Komplexität der Quasispezies</i>	53
3.14.3	<i>Berechnung der Diversität der Quasispezies</i>	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	PATIENTENCHARAKTERISTIKA.....	55
4.2	VERGLEICHSANALYSE DES INITIALEN ANSPRECHENS UND DES THERAPIEERFOLGS.....	57
4.3	ANALYSE DER DIREKTSEQUENZEN DES C-TERMINALEN NS5A-PROTEINS DES HCV (AS 2303-2393)	59
4.4	MUTATIONSANALYSE ZUM VIROLOGISCHEN THERAPIEERFOLG.....	62
4.4.1	<i>Korrelation lokaler und globaler Sequenzheterogenität anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens</i>	62
4.4.2	<i>Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit anhand des dauerhaften virologischen Therapieansprechens</i>	63
4.4.3	<i>Allgemeine Mutationsanalyse vorhergesagt verdeckter und oberflächlich liegender Regionen anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens</i>	65
4.4.4	<i>Geglättete Mutationshäufigkeit vorhergesagt verdeckter oder oberflächlich liegender Regionen anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens</i>	66
4.4.5	<i>Konservierte versus nicht-konservierte Mutationen in Bezug auf den Therapieerfolg</i>	67
4.5	ANALYSE ENTSPRECHEND DES INITIALEN THERAPIEANSPRECHENS NACH VIER WOCHEN KOMBINATIONSTHERAPIE.....	69

4.5.1	<i>Korrelation lokaler und globaler Heterogenität anhand des initialen Therapieansprechens ..</i>	69
4.5.2	<i>Geglättete Mutationshäufigkeits-Analyse anhand des initialen Therapieansprechens</i>	71
4.5.3	<i>Mutationsanalyse vorhergesagt verdeckter und oberflächlich gelegener Regionen anhand des initialen Therapieansprechens.....</i>	72
4.5.4	<i>Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit konservierter gegenüber nicht-konservierter AS-Mutationen anhand des initialen Therapieansprechens.....</i>	76
4.6	ERGEBNISSE DER PHYLOGENETISCHEN ANALYSE DER SEQUENZEN.....	77
4.7	ERGEBNISSE DER HCV-QUASISPEZIESENTWICKLUNG UNTER THERAPIE.....	80
4.7.1	<i>Auswertung der Variantenentwicklung</i>	80
4.7.2	<i>Berechnung der Hamming-Distanz und Shannon-Entropie</i>	81
4.7.3	<i>Aufstellung der Quasispezies-Varianten.....</i>	82
5	DISKUSSION	84
6	LITERATURVERZEICHNIS	94
7	PUBLIKATIONEN/DANK	106
8	LEBENS LAUF	108

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter [= 10 ⁻⁶ Liter]
α	alpha
AA	Amino acids
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Barometer
BP	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Core
ca.	circa
CD 81	Cluster of Differentiation 81
CD4 ⁺ , CD8 ⁺	CD 4 und 8 positive T-Lymphozyten
c-DNA	komplementäre DNA
C-terminal	Carboxy-terminal
dest.	distilled
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
E1, E2	Envelope 1, Envelope 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF 2α	eucaryotic Initiation Factor 2α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Etidiumbromid
ETR	End-of-Treatment Response

Abkürzungsverzeichnis

FPR	Flat Partial Responder
g	Gramm
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HVR1	Hypervariable Region 1
IL4, IL10	Interleukin 4, Interleukin 10
IFN	Interferon
ISGs	IFN-stimulated genes
ISDR	Interferon sensitivity determining region
ISRE	Interferon stimulated response elements
IRF-7	Interferon regulatory factor 7
i.v.	intravenös
ITT	Intended to treat
IU	International Unit
JAK	Janus activating kinase
kB	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
log	Logarithmus
m	männlich
mA	Miliampere [=10 ⁻³ Ampere]
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesium Chlorid
min.	Minute
ml	Milliliter [= 10 ⁻³ Liter]
mM	Milimol [= 10 ⁻³ Mol]
n	number
NC	Non-coding
N-terminal	Amino-terminal
5`NTR	5` Nicht translatierte Region

Abkürzungsverzeichnis

NaAc, NaCl	Natriumacetat, Natrium Chlorid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n-PCR	nested PCR
NR	Nonresponse
NUR	Nullresponse
NS2- NS5B	Nichtstrukturproteine 2-5B
2',5'-OAS	2',5'-Oligoadenylatsynthetase
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PCR	Polymerase Chain Reaction
PePHD	PKR/eIF2 α -Phosphorylierungs-Homologie-Domäne
pH	pondus hydrogenii, lat.
PKR	Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase
PP	Per Protocol
REL	Relapse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
RT	Reverse Transkription
RVR	Rapid Viral Response
s	sense
SD	Standardabweichung der Differenz
seq.-	sequenzierungs-
Seq.	Sequenzen
SPR	Slow Partial Response
SR	Strukturproteine
SVR	Sustained Virologic Response
STAT	Signaltransducer and activator of transcription-proteins
STAT-C	specifically targeted antiviral therapy in hepatitis C
Taq	Thermophilus aquaticus

Abkürzungsverzeichnis

TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Tris-Acetat-EDTA
Th.	Therapie
TMA	Transcription Mediated Amplification
UV	Ultraviolett
V3	Variable Region 3
vs.	versus, lat.
vT	vor Therapie
w	weiblich
w2	nach 2 Therapiewochen
Wo.	Woche
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Zusammenfassung/Summary

Einleitung:

Die Hepatitis C Virus (HCV)-infektion ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) assoziiert ist. Die Standardtherapie, unter der mehr als 60% der Patienten ein dauerhaftes virologisches Ansprechen zeigen, besteht zurzeit aus der Kombination von Ribavirin und pegyliertem Interferon alfa. Ein anhaltender Therapieerfolg ist am stärksten vom Genotyp abhängig, so dass HCV-Infizierte mit dem Genotyp 2 oder 3 nur für 24 Wochen (SVR: >80%) und Genotyp-1-infizierte Patienten für 48 Wochen therapiert werden müssen (SVR: 33-52%).^{44,78} Seit Enomoto et al. 1995 eine Region innerhalb des Nichtstrukturproteins 5A (NS5A) des HCV-Genoms aufzeigten, welche mit dem Therapieansprechen in direkten Zusammenhang gebracht werden konnte, beschäftigten sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Suche nach Zusammenhängen zwischen Therapieansprechen und Virusgenomveränderungen. Dabei fanden sich verschiedene Regionen mit gesteigerter Heterogenität innerhalb des NS5A-Proteins. Ausgehend von einer Publikation von Sarrazin et al. 2002 wird in dieser Arbeit prospektiv an einem homogenen Patientenkollektiv nicht vortheraPIierter HCV-Genotyp-1-Patienten der Zusammenhang zwischen der Mutationshäufigkeit und dem Therapieansprechen innerhalb einer definierten Region des NS5A (AS 2303-2393) unter Anwendung eines neuen mathematischen Modells untersucht.

Patienten/Methoden:

Untersucht wurden 82 nicht antiviral vortheraPIierte Patienten, die im Rahmen der multizentrischen DITTO-Studie Ribavirin (1000-1200 mg/die) und Peginterferon alfa-2a (180µg/die) für 48 Wochen erhielten. Nach vier Therapiewochen konnten sie anhand des initialen virologischen Ansprechens in jeweils vier Gruppen („rapid“-, „slow“-, „flat“- und „null“-Responder), sowie nach dem abschließenden Therapieerfolg in „Sustained Virologic Responder“ (SVR), „End-of-Treatment Responder“ (ETR) und „Nonresponder“ (NR) eingeteilt werden. Mittels nested-PCR wurden aus Serumproben vor Einleitung der Kombinationstherapie 78 Direktsequenzen mit einer Länge von 270 Basenpaaren amplifiziert. Aus ihnen konnte eine Konsensussequenz bestehend aus 90 Aminosäuren erstellt werden. Dabei wurden lokale und generelle

Variationshäufungen mittels eines nichtparametrischen binominalen Regressionsmodells analysiert. Zum Vergleich der Anzahl aller Variationen wurde der Kruskal Wallis oder Mann-Whitney U Test verwendet. Ein spezifisches Testsystem, basierend auf der geglätteten Mutationshäufigkeit, wurde angewandt um zu untersuchen, ob lokale oder globale Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen vorliegen, die mit dem Therapieansprechen in direktem Zusammenhang stehen. Weiterhin wurde an elf Patienten vor und nach zwei Wochen Therapie durch Klonierung und Sequenzierung die Entwicklung der Quasispeziesvarianten untersucht und ihre Komplexität und Diversität berechnet.

Ergebnisse:

Die Untersuchung der allgemeinen Mutationsanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Patientengruppen zu beiden Therapiezeitpunkten. Die Analyse anhand der geglätteten Mutationshäufigkeit des dauerhaften virologischen Ansprechens zeigte für den ganzen untersuchten Abschnitt signifikant mehr Mutationen bei Patienten mit einem Therapieansprechen (SVR, ETR) im Gegensatz zu Patienten ohne Therapieansprechen (NR). Unter den Genotyp-1a-Sequenzen konnte ein Fokus an Sequenzheterogenität im Bereich der Aminosäure 2320 und damit innerhalb einer vorbeschriebenen SH3-bindenden Domäne, dokumentiert werden. Unter den Genotyp-1b-Sequenzen konnte für den Bereich zwischen den Aminosäuren 2350-2370, welcher innerhalb der V3-Region liegt, eine erhöhte Mutationshäufigkeit verzeichnet werden. Weiterhin zeigte sich, dass Patienten mit einem schnellen Virusabfall innerhalb der ersten vier Therapiewochen auch ein signifikant höheres anhaltendes Therapieansprechen aufweisen als Patienten mit einem langsamen Abfall der Viruslast. Die Berechnung der Diversität und Komplexität der HCV-Quasispezies zeigte eine gesteigerte Variabilität in den ersten beiden Therapiewochen.

Diskussion:

Die genauen Ursachen des Ansprechens bzw. Nichtansprechens auf Interferon in der Therapie der chronischen Hepatitis C sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Neben wirtseigenen Ursachen scheinen Resistenzmechanismen des Virus selbst in direktem Zusammenhang mit dem Therapieansprechen zu stehen. Die Untersuchungen am ausgewählten NS5A-Abschnitt konnten eine signifikante Korrelation zwischen der

geglätteten Mutationshäufigkeit und dem anhaltenden Therapieansprechen zeigen, wobei in beiden Subgenotypgruppen zwei unterschiedliche Fokusse festgestellt werden konnten. Für die betroffenen Proteinbereiche (Genotyp 1b: Aminosäuren 2350-2370 und Genotyp 1a: 2320) wurden bereits Interaktionen mit wichtigen Signalproteinen der Virusinfektion beschrieben. Eine veränderte Aminosäure-Abfolge des NS5A-Proteins könnte seine Funktion beeinflussen und die Interaktion mit dem Interferon-Pathway so verändern, dass eine erhöhte Mutationshäufigkeit zur Resistenz gegenüber der Interferontherapie führt. Diese Beobachtungen könnten einen Teil der Erklärung zur Interferonresistenz des Hepatitis C Virus liefern. Zur Überprüfung der Ergebnisse sind weiterer Untersuchungen anhand des HCV-Replikons abzuwarten.

Detection of variations and polymorphisms of the Hepatitis C-NS5A protein, which are associated with a higher resistance or sensitivity to antiviral therapy with Ribavirin and Peg-Interferon alfa 2a

Summary

Introduction:

Hepatitis C virus (HCV) infection is a common cause of chronic liver disease associated with an increased risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The current standard of care for HCV infection is pegylated (PEG) Interferon (IFN) plus Ribavirin. More than 60% of patients achieve a sustained virologic response under this treatment regimen. Sustained virologic response is dependent on HCV genotype. Treatment duration should be 48 weeks for patients infected with genotype 1 (SVR: 33-52%) whereas for genotype 2 and 3 infected patients early discontinuation after 24 weeks of treatment has been recommended (SVR: >80%).^{44,78} Since Enomoto et al. found a region within the non-structure protein 5A (NS5A) of the virus genome that was closely associated with response to antiviral therapy many research groups have focused on viral mutations associated with treatment response. Following a publication by Sarrazin et al. 2002 we prospectively evaluated a homogenous group of treatment-naïve HCV genotype 1-infected patients receiving PEG IFN plus Ribavirin. Correlation of mutational frequency and local mutations within a fragment of the NS5A (AA 2303-2393) with treatment response was calculated by using a new mathematical model.

Patients/Methods:

In the present study 82 HCV genotype 1-infected patients, who had not received prior treatment, were prospectively analyzed for number and location of viral mutations within the NS5A and response to antiviral therapy. All patients participated in the DITTO international multicenter-trial and received PEG IFN alfa-2a (180µg) plus ribavirin (1000-1200mg/day) for 48 weeks. After four weeks of treatment they were classified as “rapid”, “slow”, “flat” or “null” responders depending on the viral-load-decline. Upon completing therapy patients were classified as “sustained virologic responders” (SVR), “end-of-treatment responders” (ETR), and “nonresponders” (NR). In 78 patients the C-terminal part of NS5A (270 base pairs) was amplified and results were depicted in one consensus-sequence for each genotype. Local accumulations of differences from consensus sequences were analyzed on the basis of a nonparametric binomial regression model, assuming independent amino acid exchanges. For comparison of the total number of variations of all or specific sequences the Kruskal Wallis and the Mann-Whitney U test were applied. A specific testing procedure based on smoothed mutational frequencies was applied in order to determine if there were local or global differences between patient groups directly associated with treatment response. Finally, the development of quasispecies variants was analyzed within 11 patients before and after 2 weeks of treatment duration.

Results:

Overall mutational analysis showed no significant difference between patient groups after both 4 weeks of treatment and treatment completion. Analysis of smoothed mutational frequencies revealed a significantly higher heterogeneity in patients with treatment response (SVR, ETR) compared to patients without treatment response (NR). Among HCV genotype 1a-infected patients a major focus of heterogeneity was observed around the amino acid position 2320. In HCV genotype 1b-sequences a focus of high mutational frequencies was found between amino acid 2350 and 2370. Our studies also suggest that a rapid viral decline leads to a significantly higher sustained virologic response (SVR) opposed to slow response within the first four weeks of antiviral treatment. Calculation of diversity and complexity of HCV quasispecies showed a higher variability within the first two weeks of antiviral treatment.

Discussion:

Patient response and nonresponse to interferon-based treatment of chronic hepatitis C is still not fully understood. Individual host mechanisms as well as viral resistance seem to play a major role in treatment response.

Our studies of a fragment within the carboxy terminal part of NS5A showed significant correlation between smoothed mutational frequencies and sustained virologic response, yet different mutational foci were observed in genotype 1a (AA 2320) and genotype 1b (AA 2350-2370) infected patients, respectively. Interactions with key signal proteins of viral infection have been described for these regions elsewhere. A higher mutational frequency may be responsible for interferon resistance in HCV infected patients.

The functional role of these mutational foci on viral replication and interferon resistance has yet to be fully understood and should be further evaluated in the replicon system.

2 Einleitung

2.1 Geschichte und Epidemiologie der Hepatitis C

Bis zur Entdeckung des Hepatitis C Virus (HCV) Ende der 1980er Jahre wurden Hepatitiden, bei denen kein bis damals bekannter hepatotroper Erreger als Auslöser gefunden wurde, als „Non-A-Non-B-Hepatitis“ bezeichnet.^{29,76} Aufgrund des gehäuftten Auftretens dieser Hepatitiden nach Bluttransfusionen wurden sie auch als „Posttransfusionshepatitis“ bezeichnet.⁶¹

Nachdem es Choo et al. 1989 gelungen war, das Hepatitis C Virus aus einem infizierten Schimpansen durch Klonierung und Sequenzierung zu identifizieren, wurde dieses neue Virus aus der Familie der Flaviviridae als eigenes Genus mit der Bezeichnung Hepatitis C Virus den bis dahin bekannten Hepaciviren zugeordnet.^{16,84} 60-80% aller Posttransfusionshepatitiden erwiesen sich im Nachhinein als eine Infektion mit HCV.⁶¹

Das Hepatitis C Virus kommt überall auf der Welt vor. Es bestehen regionale Unterschiede, was Prävalenz und Verteilung der Genotypen betrifft.⁵

Nach Berechnung der WHO sind weltweit mehr als 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Dies entspricht einer Prävalenz von 1-3% der Weltbevölkerung.¹ In Europa wird das Vorkommen der HCV-Infektion in nordeuropäischen Ländern mit 0,5% und in den Mittelmeerländern mit ca. 2% angegeben. In Deutschland beträgt die Prävalenz 0,4-0,7%, gemessen am positiven Nachweis von HCV-Antikörpern.^{85,139}

Bei einer Chronifizierungsrate von 50-80% muss demnach in Deutschland mit 350-500 Tausend Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion gerechnet werden. Im Jahr 2003 betrug die Anzahl der HCV-Neuinfektionen in Deutschland ca. 7000.¹⁰⁷

2.2 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus ist ein im Durchmesser 50 nm großes RNA-Virus und wird zur Gruppe der Flaviviridae gezählt. Das Genom von ca. 9600 Basen Länge besteht aus einem (+)-Einzelstrang.³² Es besitzt ein zusammenhängendes offenes Leseraster, welches von zwei nicht translatierten Regionen eingefasst wird.¹⁷

Das offene Leseraster kodiert für ein Vorläuferprotein von ungefähr 3000 Aminosäuren (AS) Länge, welches durch zelluläre Signalpeptidasen am Endoplasmatischen

Retikulum und viruseigene Proteasen (NS2 und NS3, NS4A) in 3 Strukturproteine (SR) und 7 Nichtstrukturproteine (NS) gespalten wird.^{109,123} Die Abspaltung der strukturellen Proteine erfolgt durch wirtseigene Signalpeptidasen. (Abbildung 2.1)

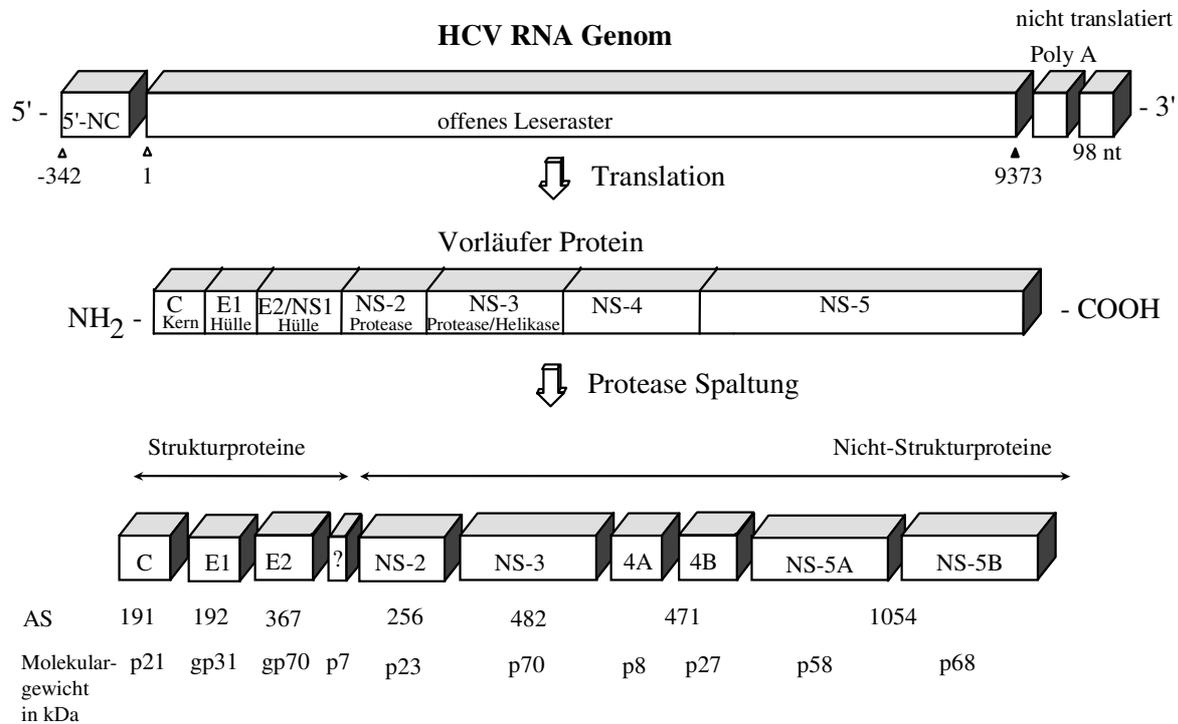


Abbildung 2.1: Darstellung des HCV-Genoms, des Ablaufs der Translation und der Aufteilung der viralen Proteine

Am äußersten N-Terminus wird als Hauptbestandteil des Nukleokapsids das Coreprotein mit einem Molekulargewicht (MG) von 21 Kilodalton (kDa) abgespalten.¹⁵¹ Durch Verschiebung des Leserahmens innerhalb der für das Coreprotein kodierenden Sequenz erfolgt die Expression eines weiteren HCV Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa, das so genannte F-Protein.^{143,150} Nachfolgend werden die Hüllproteine E1, und E2 (ca. 70 kDa bzw. 31 kDa) abgespalten.⁴¹ Im Bereich des N-terminalen Abschnitts von E2 befindet sich eine 27 Aminosäuren umfassende sogenannte „Hypervariable Region“ (HVR1).¹⁴⁶ Diese Region soll eine wichtige Rolle bei der Bindung des HCV durch neutralisierende Antikörper spielen.⁸² Bei p7 handelt es sich um ein stark hydrophobes Polypeptid mit einem Gewicht von 7 kDa, das eng assoziiert mit den Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) vorliegt.¹⁴ In experimentellen Versuchen zeigte das Protein eine Ausbildung von Ionenkanälen.⁹³

Die Noncoding-Regionen (NC) dienen vermutlich sowohl der Initialisierung von Transkription und Translation, als auch dem Schutz des Genoms vor

Exonukleaseaktivität.¹⁴⁴

Die Abspaltung der Nichtstrukturproteine (NS) erfolgt durch virale Signalpeptidasen. Am N-terminalen Ende werden das NS2- und NS3-Protein, mit einem Molekulargewicht von 23 kDa bzw. 70 kDa, abgespalten. Das integrale Membranprotein NS2 und die N-terminale Domäne von NS3 kodieren für eine Autoproteinase, die die Spaltung zwischen NS2 und NS3 katalysiert.⁴⁷ Bei NS3 handelt es sich um ein bifunktionelles Protein, dessen N-terminaler Bereich für eine Proteinase kodiert, die die verbleibenden Proteine vom Polyprotein abspaltet (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A, NS5A/5B).^{4,21} Die C-terminalen zwei Drittel von NS3 kodieren für eine Helikase, die unter ATP-Verbrauch die RNA binden und entwinden kann und somit eine wichtige Rolle bei der Replikation der viralen RNA spielt.⁴³

Das NS4A bildet mit einem Molekulargewicht von ca. 8 kDa einen Komplex mit der NS3-Proteinase und stellt dadurch einen essentiellen Kofaktor für die korrekte Prozessierung des Polyproteins dar. Zudem verstärkt NS4A die proteolytische Aktivität von NS3 und erhöht dessen metabolische Stabilität.²⁷

Über NS4B ist bisher nur wenig bekannt. Bei diesem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 27kDa handelt es sich um ein integrales Membranprotein des ER mit hydrophobem Charakter und multiplen Ankerdomänen, das an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt sein soll.⁷³

Der folgende C-terminale Abschnitt des Vorläuferproteins wird vom NS5A gebildet. Mit einer Größe von 446 Aminosäuren liegt das Protein im HCV-J-Prototyp zwischen der Aminosäureposition 1973 und 2419.^{86,96} Posttranskriptionelle Phosphorylierung und Hyperphosphorylierung lassen NS5A-Proteine mit einem Molekulargewicht von 56kDa (p56) und 58kDa (p58) entstehen. Die exakte Rolle dieser beiden Phosphorylierungszustände ist nicht geklärt, wobei die hyperphosphorylierte Form als Bestandteil des NS3-5A-Polyproteins vorkommt und damit an der Replikation beteiligt ist.^{60,94} Die verschiedenen Halbwertszeiten beider Proteine lassen vermuten, dass sie unterschiedliche Rollen in der Virusreplikation spielen.⁷⁵ Bisher konnte die molekulare Struktur des NS5A-Proteins nur zum Teil erforscht werden. Aus vorwiegend hydrophilen Anteilen bestehend, besitzt das Protein am N-terminalen Ende eine amphipathische α -Helix.⁷⁵ Kernspintomographische-Untersuchungen konnten die Struktur dieses Proteinanteils in Form eines Membranankers beschreiben.^{10,99} Der nachfolgende Abschnitt des NS5A-Proteins lässt sich in drei Domänen unterteilen (DI,

DII, DIII). Molekulare Oberflächenanalysen der Domäne I (AS-Position 1973-2185 im HCV-J), bestehend aus den Untereinheiten Ia und Ib, liefern Erkenntnisse zur Struktur dieses Proteinbereiches.¹³⁵ Dabei konnte unter Berücksichtigung der Ladungsverhältnisse eine Dimerbildung zweier Ia-Domänen und dadurch eine Interaktion des Proteins mit der Zellmembran vermutet werden. Einzelne oder mehrere NS5A-Proteine könnten dabei in verschiedenster Weise mit Einzel- oder Doppelstrang-RNA interagieren.^{23,99,134,135} Demnach wird für das Protein ein wesentlicher Einfluss auf Proteinsynthese und Virusreplikation vermutet.

Weiter konnten bisher verschiedene funktionelle Abschnitte des NS5A-Proteins in direktem Zusammenhang mit dem Therapieansprechen auf eine Interferontherapie gebracht werden. Neben der von Enomoto beschriebenen „Interferon sensitivity determining region“ (ISDR; AS 2209-2248) konnten in den folgenden Jahren die PKR-bindende Domäne (AS 2209-2275) und die variable Region V3 (AS 2356-2379) mit angrenzenden Bereichen als Teilabschnitte des NS5A-Proteins beschrieben werden.^{25,38,53,90,119} Weiterhin findet sich in dieser Proteinregion ein prolinreicher Abschnitt mit einer SH-3-bindenden Domäne (AS 2321-2327), welche auch in zellulären Signalmolekülen vorkommen. Über diesen Bereich konnte eine Bindung zwischen dem NS5A und dem Wachstumsfaktor-Grb2-Adaptorprotein beschrieben werden, wodurch eine Interaktion mit diversen Signaltransduktionsmolekülen ermöglicht wird.^{46,132}

Im Polyprotein des Hepatitis C Virus folgt weiter C-terminal als letztes Nichtstrukturprotein das NS5B mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. Es kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die die Synthese von Positiv- und Negativstrang-RNA katalysiert.^{6,72} In diesem Zusammenhang konnten Interaktionen mit Kinasen der Src-family, der JAK1-Kinase und eine Aktivierung des STAT3 beschrieben werden.^{74,113}

2.3 Virusreplikation

Der Nachweis von Virus-RNA und -Proteinen in Hepatozyten sowie eine Erhöhung der GPT und histologische Zeichen einer Hepatitis führten zu der Annahme, dass die Replikation des Virus nach Infektion mit dem Erreger vor allem in Leberzellen stattfindet.⁹ Daneben werden periphere Blutmonozyten (PBMC) als möglicher Replikationsort in Betracht gezogen. Diesbezügliche Untersuchungen führten allerdings bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen.^{67,70}

Die Adsorption des Virus an der Zelloberfläche erfolgt über eine Bindung an zelluläre Rezeptoren. Dabei spielt der CD81-Rezeptor eine wichtige Rolle. Weitere Rezeptoren sind als mögliche Interaktionspartner des HCV beschrieben worden.^{39,122,138}

Induziert durch die Rezeptorbindung werden die Virionen über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Anschließend wird die RNA in das Zytoplasma freigegeben. Diese kann danach aufgrund ihrer positiven Orientierung direkt an den Ribosomen abgelesen und in die Proteinsequenz umgeschrieben werden. Nachfolgend stellt die RNA die für die Replikation notwendigen Enzyme bereit. Nach der Translation eines einzigen langen Polyproteins erfolgt die Spaltung in die 10 Einzelproteine durch zelluläre und virale Peptidasen. Untersuchungen ergaben, dass sich die im Verlauf der Prozessierung freiwerdenden Nichtstrukturproteine zu einem Replikationskomplex zusammenlagern, der eng assoziiert mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vorliegt und innerhalb dessen die Replikation stattfinden soll.²²

Im Verlauf der Virusreplikation wird der Positivstrang in einen Negativstrang umgeschrieben, der wiederum als Matrize für die Synthese von weiteren RNA-Strängen positiver Orientierung dient. Die synthetisierten Positivstränge können einerseits direkt in die viralen Proteine translatiert werden, stehen andererseits aber auch für die Bildung neuer Virionen durch Knospung der Viruspartikel in das Lumen des ER zur Verfügung. Während des Transports durch die Golgi-Vesikel werden Membranproteine glykosyliert und die Viruspartikel über Endozytose aus der Zelle ausgeschleust.

Über den Mechanismus der RNA-Initiation im Verlauf der Virusreplikation durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase, werden unterschiedliche Mechanismen in Betracht gezogen. Es wird neben einer Primer-abhängigen Initiation der RNA-Synthese auch eine de-novo-Synthese der viralen RNA, wie sie bereits bei anderen Vertretern der Flaviviridae beschrieben wurde, diskutiert.^{55,91,160}

Ein Nachweis von HCV-DNA in vivo gelang bisher nicht, so dass kein Hinweis auf eine reverse Transkription des Hepatitis C Virus ähnlich dem HI-Virus, dem Erreger von AIDS, besteht.

2.4 Infektion und Krankheit

Neben dem Menschen ist der Schimpanse der einzige natürliche Wirt des Hepatitis C Virus. Nach Infektion befällt das Virus die Leber und führt dort zu einer Entzündung des Gewebes. Neben der Leber als Hauptreplikationsort soll sich das Virus auch in lymphozytären Zellen vermehren.⁶⁵ Die Ansteckung mit dem Virus erfolgt zumeist über direkten oder indirekten Blutkontakt. Risikogruppen stellen aufgrund des parenteralen Übertragungsweges vor allem Personen dar, welche kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte erhalten haben (Dialysepatienten, etc.) oder in Kontakt mit Spritzenmaterial gekommen sind (i.v.-Drogenabusus, etc.). Bis zu 80% der i.v.-Drogenabhängigen sind anti-HCV positiv. Dialysepatienten sind in 10-30% mit HCV infiziert.³

Seit Einführung des Blutspenderscreenings auf HCV-Antikörper bzw. HCV-RNA konnte das Infektionsrisiko bei einer Blutproduktübertragung deutlich gesenkt werden.¹⁵⁵ Eine Infektion durch Mikrolutübertragungen mit kontaminierten Instrumenten (Tätowierung, Piercing, Akupunktur, etc.) oder durch eine Nadelstichverletzung bei medizinischem Personal konnte belegt werden. In 30-40% der Fälle lässt sich jedoch keiner der bisher bekannten Risikofaktoren eruieren und der Übertragungsmechanismus kann nicht eindeutig geklärt werden.⁶⁸

Die Diagnose einer Hepatitis C Virus-Infektion erfolgt mittels Nachweis von HCV-RNA im Serum. Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als sensitives molekulares Nachweisverfahren kann innerhalb einer Woche nach Exposition bereits RNA durch direkte Virusamplifikation im Blut nachgewiesen werden.⁹⁵

Bei vielen Patienten führt ein Anstieg der Transaminasen zu einer weiterführenden Diagnostik mit einem Suchtest auf Anti-HCV-Antikörper. Diese sind aber meist erst 2-4 Monate nach der Infektion nachweisbar. Bei einem Teil der Patienten liegen im Verlauf der Erkrankung dauerhaft normale Leberwerte vor. Bei diesen Patienten wird die Diagnose häufig zufällig, z.B. bei einer Einstellungsuntersuchung oder während eines Krankenhausaufenthaltes gestellt.

Außer im Blut kann Virusmaterial mittels molekularer Techniken (z.B. PCR, TMA) auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel oder Sperma nachgewiesen werden.¹⁰⁸

Das Risiko einer sexuellen Übertragung ist dabei ausgesprochen niedrig und beträgt 0-2% pro Jahr.¹³⁶ Die vertikale Hepatitis C Virus-Übertragung von der Mutter auf das Kind tritt ebenfalls selten auf und wird in der Literatur mit 4-7% angegeben.¹⁰⁸

Die Klinik einer akuten, wie auch einer chronischen Hepatitis C verläuft in der Mehrzahl der Fälle inapparent. Die Inkubationszeit liegt im Mittel zwischen 6 und 12 Wochen, mit Extremwerten von 2 bis 24 Wochen. Bei symptomatischen Patienten zeigen sich häufig unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Leistungsabfall, Übelkeit oder Gelenk- und Muskelschmerzen. Lediglich bei etwa 30% der Patienten mit einer akuten HCV-Infektion zeigt sich ein ikterischer Verlauf. Das Auftreten einer fulminanten Hepatitis bei einer akuten Infektion ist selten und wird in der Literatur mit unter 1% angegeben.¹⁵⁵

Nach einer akuten HCV-Infektion kommt es in 55-85% der Fälle zu einer chronischen Viruspersistenz mit Nachweis der HCV-RNA über mehr als 6 Monate.⁵² Damit lässt sich die Diagnose einer chronischen Hepatitis C stellen. Bei diesen Patienten liegt das Risiko, in den nächsten 10-20 Jahren eine Leberzirrhose zu entwickeln bei ca. 20-30%.⁵⁰ Bei Patienten mit einer HCV-Infektion und dem Vorliegen einer Leberzirrhose beträgt das Risiko für die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) 1-5% pro Jahr.

Die Hepatitis C-induzierte Leberzirrhose stellt heute die häufigste Indikation zur Lebertransplantation dar.^{79,154}

2.5 Genotypen und Quasispezies

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des HCV besitzt wie die meisten RNA-Viren eine hohe Mutationsrate von durchschnittlich $1,5-2,0 \times 10^{-3}$ Mutationen pro Basenposition und Jahr.¹³ Im Gegensatz zu zellulären DNA-Polymerasen kann sie die Lesegenauigkeit nicht überprüfen. Dabei kommt es aufgrund dieses fehlenden „proof-readings“ zu hohen Mutationsraten und zur Entstehung einer großen Sequenzheterogenität.

Aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb des 5B-Proteins erfolgte die Einteilung in mindestens 6 Genotypen mit einer Genomhomologie von 66-70%.¹²⁷ Innerhalb eines Genotyps können weitere Subtypen (Genomhomologie 77-80 %) und einzelne Isolate (Genomhomologie 91-95%) unterschieden werden.^{127,128} Die Genomhomologie zwischen den einzelnen Genotypen verteilt sich unterschiedlich über das Genom, wobei die NC-Regionen und die Core-Region hoch konserviert sind, während die

Hüllproteine eine gesteigerte Variabilität aufweisen.⁴⁵

In Deutschland ist die überwiegende Mehrzahl der Patienten mit chronischer Hepatitis C mit dem Virus-Genotyp 1 infiziert. Der Subtyp 1b dominiert in der Häufigkeit dabei über dem Subtyp 1a. Die beiden HCV-Genotypen 3 und 2 weisen in absteigender Reihenfolge eine geringere Prävalenz auf.⁵² Andere Genotypen sind in Europa nur selten anzutreffen.¹¹⁰ In Nordamerika ähneln die Häufigkeiten denen in Europa mit dem Unterschied, dass in den USA der Typ 1a noch vor 1b die häufigste Variante darstellt.^{8,80} Der Genotyp 4 findet sich gehäuft in Afrika, sowie im Nahen Osten. Genotyp 5 herrscht in Südafrika und Genotyp 6 in Südostasien vor.^{81,89,129,152}

Innerhalb eines infizierten Patienten entstehen durch die hohe Mutationsrate in Verbindung mit der Produktion von annähernd 10^{10} bis 10^{12} viraler Genome pro Tag eine Vielzahl von unterschiedlichen Virusvarianten.⁸⁷ Die dabei entstehende Subpopulation unterscheidet sich in den Sequenzen nur an wenigen Basenpositionen (Homologie > 98%) und wird als „Quasispezies“ bezeichnet.^{55,124}

Die Variante mit dem höchsten Anteil an der Gesamtpopulation wird als „Majorvariante“, die weiteren werden als „Minorvarianten“ bezeichnet.¹⁴⁹ Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei dem HI-Virus (HIV) gemacht.¹⁴⁵ Neben relativ konstanten Abschnitten innerhalb der viralen Sequenz (5'NTR), gibt es variable und hypervariable Regionen, die eine relativ hohe Heterogenität aufweisen.

2.6 Therapie der chronischen Hepatitis C

Schon vor der Isolierung und Charakterisierung des Hepatitis C Virus wurden Therapieversuche bei Patienten mit einer Posttransfusionshepatitis unter Verwendung verschiedener antiviraler Substanzen wie Immunsuppressiva, Ursodesoxycholsäure, Steroide und Nicht-steroidale Antirheumatika unternommen.^{7,76} Doch erst durch die Verwendung von Interferon-alfa (IFN- α) konnte eine Normalisierung der Leberwerte bzw. eine dauerhafte Elimination der HCV-RNA im Blut bei ca. 10-15 % der Patienten erzielt werden.⁵¹

Von den Virostatika hat einzig das Guanosinanalogon Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamid) in der Kombination mit IFN- α zu einer Therapieoptimierung geführt.¹² Ribavirin wird in hohem Maße von eukaryotischen Zellen aufgenommen und entwickelt nach Phosphorylierung seine virostatische Aktivität. Es besitzt eine antivirale Potenz gegen zahlreiche DNA- und RNA-Viren.¹²⁵ Als Wirkmechanismen werden eine Hemmung viraler Polymerasen und der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase sowie immunmodulierende Eigenschaften diskutiert.^{88,125} Kürzlich konnte auch eine mutagene Wirkung von Ribavirin auf das Hepatitis C Virus-Genom beschrieben werden. Diese Wirkung konnte in der Kombination mit Interferon nicht gezeigt werden.⁴⁸

Bei der Monotherapie der chronischen Hepatitis C-Infektion mit Ribavirin fand sich bislang kein relevanter Abfall der HCV-RNA im Serum. Es konnte aber ein signifikanter Abfall der GPT im Serum unter Therapie festgestellt werden.^{76,104}

Im Jahr 1994 zeigte erstmal eine Pilotstudie den günstigen Effekt der Kombination von IFN- α plus Ribavirin.¹² Sie steigert signifikant den Anteil der Patienten, bei denen auch 6 Monate nach Therapieende das Virus nicht nachweisbar bleibt (anhaltendes virologisches Ansprechen bzw. Sustained Virologic Response, SVR).¹⁵³ Das initiale Ansprechen ist aber vergleichbar einer IFN- α -Monotherapie.^{12,64,105} Inzwischen haben umfangreiche kontrollierte Studien die Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der IFN- α -Monotherapie belegt.^{103,157}

Durch den Einsatz von pegyliertem Interferon konnte die Ansprechrate um 20-40% gegenüber dem Standard-Interferon erhöht werden, da durch eine veränderte Pharmakokinetik ein gleichmäßigerer Wirkspiegel im Serum erzielt wird.¹⁵⁷ Die Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon (180 μ g alfa 2a oder 1,5 μ g/kg KG

alfa 2b einmal wöchentlich subcutan) und Ribavirin (gewichtsadaptiert 800-1200mg/Tag) ist seit 2000 in Deutschland zugelassen und stellt heute die Standardtherapie der chronischen Hepatitis C dar. Unter dieser kombinierten Therapie kann in 54-63% der Fälle ein anhaltendes virologisches Ansprechen erreicht werden.^{33,78}

Bei bis zu 50% der Patienten, die unter der antiviralen Therapie keine nachweisbare HCV-RNA mehr aufweisen, kommt es nach Therapieende erneut zu einer messbaren HCV-Viruslast. In diesen Fällen spricht man von einem Rückfall („Relapse“).⁴⁴

Patienten, die zu Therapiewoche 12 einen Abfall der Viruslast von weniger als 2 log-Stufen zeigen, bezeichnet man als „Nonresponder“ (NR). Ihr Anteil liegt bei 10-20% der behandelten Patienten.

Auffällig ist ein unterschiedliches Ansprechen der einzelnen Genotypen auf die Therapie. Nahezu alle Patienten mit den Genotypen 2 und 3 zeigen ein initiales Ansprechen und ein dauerhaftes Ansprechen wird in mehr als 80% der Fälle erreicht.⁷⁸ Patienten mit einer Genotyp-1-Infektion zeigen hingegen nur in 33-52% ein anhaltendes virologisches Ansprechen.^{44,78}

In mehreren aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit dem Genotyp 2 oder 3 eine Therapiedauer von 16-24 Wochen ausreichend ist, wobei Patienten mit dem Genotyp 1 von einer Kombinationstherapie über 24-72 Wochen profitieren.^{33,44,77,78,141,156}

2.7 Interferonwirkung und Resistenz bei HCV

2.7.1 Interferone und Interferonsignalweg

Interferone sind Proteine, die den Zytokinen zugeordnet werden und eine antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung zeigen.¹⁰¹

Der antivirale Effekt der Interferone wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt.^{54,71} Man unterteilt die Interferone in alpha-, beta- und gamma-Interferone, die sich strukturell, biochemisch und in ihrer antigenen Eigenschaft unterscheiden. Dabei wird das gamma-Interferon von T-Lymphozyten und beta-Interferon von Fibroblasten gebildet. Als Antwort auf eine Virusinfektion oder Antigenstimulation produzieren Monozyten und transformierte B-Zell-Linien alpha-Interferon.⁹²

Bisher wurden verschiedene Gene auf Chromosom 9 lokalisiert, die als Kodierung für das menschliche Alpha-Interferon identifiziert werden konnten. Dabei liegt das Molekulargewicht des natürlichen Alpha-Interferons zwischen 16 und 27 kDa.¹⁴⁷

Interferone besitzen keine direkte biologische Aktivität innerhalb der Zelle, in der sie gebildet werden, sondern binden nach ihrer Sezernierung an ihre spezifischen membranständigen Rezeptoren.^{100,140} Alpha- und Beta-Interferon wirken über den Rezeptor Typ I, Gamma-Interferon über den Rezeptortyp II. Nach Bindung an den jeweiligen Rezeptor wird der Interferon-Rezeptorkomplex rasch durch rezeptorvermittelte Endozytose ins Zellinnere aufgenommen.^{2,26}

Innerhalb der Zelle wird die Interferonwirkung über sogenannte „Second Messenger“ vermittelt. Im Verlauf kommt es zur direkten und indirekten Induktion antiviraler, antiproliferativer, immunstimulierender und immunmodulierender Mechanismen.⁴²

Am besten untersucht ist die Signalkaskade durch Bindung von IFN-alpha am spezifischen Rezeptor. Durch die IFN- α -Rezeptor-Interaktion kommt es zu einer Aktivierung des Jak-STAT-Pathways in der Zelle. Durch Phosphorylierung von Signaltransduktions- und Transkriptionsfaktoren kommt es durch Bindung an bestimmten Zielsequenzen der DNA („Interferon- α stimulated response elements“, ISRE) zur Stimulation so genannter „IFN-stimulated genes“ (ISGs). Dies induziert und verstärkt die Expression zahlreicher Effektorproteine. Zu den durch IFN- α -induzierten Proteinen zählt die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-OAS). Dieses Enzym führt über 2',5'-Oligoadenylat zur Aktivierung einer Ribonuklease, die bevorzugt virale Einzelstrang-RNA abbaut und somit die Virusreplikation hemmt.³⁴

Ein weiteres wichtiges Protein stellt die durch Bindung an Doppelstrang-RNA autophosphorylierte Proteinkinase (PKR) dar. Sie phosphoryliert als RNA-abhängige Proteinkinase einen weiteren Transkriptionsfaktor, den „eucaryotic initiation factor 2 α “ (eIF2 α). Dieser Faktor ist maßgeblich an der Initiierung der Translation beteiligt. Die PKR-abhängige Phosphorylierung des eIF2 α führt zur Bildung eines inaktiven Komplexes und bewirkt eine selektive Hemmung der viralen Translation. Somit scheint durch die Aktivierung des eIF2 α eine Blockierung der Proteinbiosynthese und damit der Virusreplikation zu erfolgen.¹³¹ Ein weiteres wichtiges Genprodukt der ISG-Expression ist der „Interferon regulatory factor 7“ (IRF-7), der in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zu einem positiven Feedback innerhalb des IFN-Pathways führt.⁴⁹ Die immunstimulierende Wirkung von alpha-Interferon entsteht unter anderem durch Expression von Histokompatibilitäts-Antigenkomplexen der Klasse I (HLA-I), bestehend aus einer α -Kette und dem β 2-Mikroglobulin. Durch sie werden virusspezifische Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert. Hierdurch wird eine Erkennung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen (CD8-T-Zellen) ermöglicht, die wiederum diese Zellen abtöten.^{42,58}

2.7.2 Interferonwirkung bei einer Hepatitis C Virus-Infektion

Welche Effekte der Interferon- α -Therapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C im Vordergrund stehen, ist nicht bekannt. Erkenntnisse über die mögliche IFN- α -Wirkung bei chronischer Hepatitis C wurden durch mathematische Berechnungen der Hepatitis C-Viruskinetik unter IFN- α -Therapie abgeleitet. Nach IFN- α -Applikation kommt es mit einer Latenz von ca. 8 h bei nahezu allen Patienten zu einem raschen Abfall der Hepatitis C Virämie (Phase 1). Die Phase-1-Kinetik ist IFN- α -dosisabhängig und offenbar das Resultat einer direkten IFN- α -vermittelten HCV-Replikationshemmung, induziert durch die oben genannten Effektor-Proteine.¹⁹ Der Abfall der HCV-RNA im Serum in der Phase 2 (Beginn ca. 24-48 h nach Therapieeinleitung) verläuft deutlich langsamer und reflektiert die Abnahme der produktiv infizierten Hepatozyten.^{42,66,87}

2.7.3 Interferonresistenz bei HCV

Auffällig in Bezug auf die Interferontherapie bei Hepatitis C sind die unterschiedlichen Ansprechraten der verschiedenen Genotypen auf die Kombinationstherapie. Die Ursache für dieses unterschiedliche Responseverhalten bleibt bisher ungeklärt. Die Resistenz der einzelnen Genotypen lässt virologische Ursachen wahrscheinlich erscheinen.

Untersuchungen der letzten Jahre lassen vermuten, dass das Hepatitis C Virus in der Lage ist, sich gegenüber der antiviralen Wirkung von Interferon zu schützen. Bisher wurden vor allem die drei HCV-Proteine NS5A, E2 und die Serinprotease NS3/4A in Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung von HCV-Isolaten gegenüber einer IFN- α /Ribavirin-Therapie diskutiert.

Im Jahr 1995 identifizierten Enomoto und Mitarbeiter HCV-genomische Regionen, die mit dem Ansprechen auf IFN- α korrelieren.^{24,25,112} Es konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von mehr als 4 Aminosäure-Mutationen innerhalb des carboxyterminalen Bereichs des NS5A-Proteins (= so genannte „mutant type“, im Gegensatz zur HCV-1b Prototyp-Sequenz [HCV-J = Wildtyp]), signifikant mit einem anhaltenden Ansprechen bei HCV-Genotyp 1b-infizierten Patienten korrelierten.^{24,25,62,112} Diese Region wurde daraufhin „Interferon-Sensitivitäts-determinierende Region“ („interferon sensitivity determining region“, ISDR) genannt und liegt zwischen der Aminosäureposition 2209 bis 2248.^{24,25}

Gale und Mitarbeiter konnten auf der Suche nach einer Erklärung für die oben genannten Beobachtungen von Enomoto zeigen, dass das Wildtyp-ISDR-Protein die PKR funktionell hemmen kann, jedoch Mutationen innerhalb der ISDR diese Interaktion aufheben.^{35,37,38} In der gleichen Studie konnten die Autoren weiter zeigen, dass die ISDR zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Interaktion zwischen NS5A und der Doppelstrang-RNA abhängigen Proteinkinase (PKR) ist. Die Region zwischen Kodon 2209 und 2274 konnte im Folgenden als die komplette PKR-bindende Region des NS5A-Proteins identifiziert werden. Durch die Interaktion des NS5A mit der PKR soll das Protein an der Interferonresistenz beteiligt sein.³⁵

Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Japan konnte durch Mutationsanalysen an HCV-Patienten aus Nordamerika und Europa zunächst kein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR und dem Therapieansprechen gefunden werden.^{116,117,120} In Folgestudien an größeren

Patientenkollektiven aus westlichen Ländern konnten Sarrazin und Mitarbeiter eine Korrelation von Mutationen im Bereich der ISDR mit dem Therapieansprechen nachweisen.^{115,116,120} Der Fokus lag dabei nicht ausschließlich innerhalb der ISDR, sondern es wurden vermehrt Mutationen weiter C- und N-terminal dokumentiert (AS-Positionen 2188-2318).¹¹⁹ Mit Hilfe eines neuen mathematischen Modells konnte dabei ein neuer Bereich an gehäuften Mutationen innerhalb des NS5A bei HCV-Genotyp-1b-Patienten beschrieben werden, der mit dem virologischen Therapieansprechen korreliert. Er liegt zwischen den Aminosäurepositionen 2350 und 2370.¹¹⁹

Neben dem NS5A wurde auch für E2 in vitro eine Interaktion mit der IFN- α stimulierten PKR nachgewiesen werden.³⁸

Kürzlich wurde als drittes Protein die NS3/4A Serinprotease als weiterer möglicher Inhibitor des IFN- α -vermittelten antiviralen Effektes in Betracht gezogen. Die Wirkung soll durch einen hemmenden Einfluss auf die Translation von Typ I Interferon beruhen.³¹

2.8 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Interferon- α (IFN- α) führt in der Therapie der chronischen Hepatitis C nur bei ca. 20-40% der Patienten zu einer dauerhaften Viruselimination und Normalisierung der Transaminasen. In der Kombination mit Ribavirin liegt die Langzeitan sprechrate fast doppelt so hoch.⁵² Die genauen antiviralen Wirkmechanismen dieser Medikamente sind bislang nur zum Teil aufgeklärt, ebenso wie die Mechanismen mit denen sich das Virus der Elimination durch das Immunsystem entzieht.

Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem virologischen Ansprechen auf eine Interferontherapie und der Sequenzheterogenität des Hepatitis C Virus besteht.^{114,116,121}

Vorarbeiten zu diesen Untersuchungen konnten zeigen, dass Veränderungen innerhalb des Genabschnittes, welcher für das Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) kodiert, mit dem Therapieansprechen in direktem Zusammenhang stehen.^{118,119}

Ein gehäuftes Auftreten von Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz konnte bereits für verschiedene Bereiche des NS5A-Proteins detektiert werden.²⁵

Mittels eines neuen mathematischen Modells wurde ein Fokus an Mutationshäufungen bei HCV-1b-infizierten Patienten in einer Region zwischen den Aminosäurepositionen 2350 bis 2370 entdeckt, der mit dem virologischen Ansprechen assoziiert ist.¹¹⁹

Ziel dieser Arbeit war die Sequenzanalyse eines zuvor festgelegten Abschnitts innerhalb des NS5A bei unbehandelten HCV-Genotyp-1-infizierten Patienten vor und nach Interferontherapie. Dabei sollte der Zusammenhang zwischen Sequenzvariabilität und Therapieansprechen untersucht werden.

Weiterhin sollte an einem Teil der untersuchten Patienten die Quasispezies-Variantenentwicklung innerhalb der ersten zwei Wochen der antiviralen Therapie im Zusammenhang mit dem Therapieansprechen genauer analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL, Karlsruhe
Analysenwaage	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Foto-Apparatur	Polaroid, Cambridge, GB
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich
Mikrowellenofen	Hettachi, Eschborn
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761, Essen
Präzisionswaage Basic MCBB100	Sartorius, Göttingen
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Sequenzierautomat, Genetic Analyser 3100	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler Gene Amp [®] 9700	Applied System, Singapur
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Rotilab [®] -Mini Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Heraeus, Hanau

3.2 Einwegmaterialien

Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York, USA
Sterilfilter Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products, California, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Petrischalen (Ø 10 cm)	Falcon, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Tubes (50 µl)	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Chemikalien

Agar	Sigma, Taufkirchen
Agarose peq Gold Universal	PeqLab, Erlangen
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Aqua dest. (Reinstwasser)	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
Hefe Extrakt	Sigma, Taufkirchen
Kandamycin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 25 mM	Perkin Elmer/ABI, Weiterstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
dNTPs (250 µM je dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roche, Mannheim
PCR Reaction Buffer	Roche, Mannheim
RNase freies Wasser (DMPC)	Fluka, Neu-Ulm
Tris-Base	United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA
Trypton (Bakterienmedium)	Sigma, Taufkirchen

3.4 Reagenzien

3.4.1 Fertige Reagenzien-Sets

BigDye Terminator Cycle Kit 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
DyeEx 2.0. Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Extaction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
TOPO XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad
AMPLICOR HCV MONITOR™ v2,0	Roche Diagnostics, Branchburg, New Jersey, USA
INNO LiPA HCV-II	Innogenetics, Ghent, Belgien

3.4.2 DNA-Längenstandards

DNA-Längenstandard XIV (100-1500 BP)	Roche-Applied-Science, Mannheim
--------------------------------------	------------------------------------

3.4.3 Enzyme

Ampli Taq Gold-Polymerase®	Perkin Elmer, Weiterstadt
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Gibco BRL, Karlsruhe

3.4.4 Oligonukleotide

Random Hexamere	Invitrogen, Karlsruhe
-----------------	-----------------------

3.5 Primer

3.5.1 Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des NS5A-Abschnittes

Nukleotidsequenz (5'-3') ^a	Name	Primer	Position ^b	Genotyp
TGCCCATATGGGCACGCCCG	32s	Außen-Primer	7183 nach HCV-J	1b
GTCGCTGAGGTCGGGGTCCCCTGGCTC	33as	Innen-Primer	7509 nach HCV-J	1b
GGTAGACCAAGACCCGTGCTGAG	32as	Außen-Primer	7527 nach HCV-J	1b
TGGGCACGCCCGGATTACAACCCTC	33s	Innen-Primer	7191 nach HCV-J	1b
GCGGAGGAGGACGAGCGGGAG	15s	Außen-Primer	7121 nach HCV-1	1a
GTACCCGCAGAAATCCTGC	16s	Innen-Primer	7149 nach HCV-1	1a
TGGA CTCTTCGATCCGCTTG	34s	Außen-Primer	7099 nach HCV-1	1a
GGACGAGCGGGAGATCTCC	35s	Innen-Primer	7130 nach HCV-1	1a

Tabelle 3.1: Primer für die Sequenzierung des NS5A-Abschnittes

Erklärung zur Tabelle 3.1:

^a Die Nukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Richtung der HCV-Genoms angegeben

^b Die Nukleotidpositionen bezeichnen das carboxyterminale Ende des Primers innerhalb des Hepatitis C Virus-Genoms

3.5.2 Primer zur Sequenzierungs-PCR der Klone direkt vom TOPO[®]-Vektor

Nukleotidsequenz pCR [®] -XL-TOPO [®] Vektor (5'-3') ^a	Primer	Position ^b
GTAAAACGACGGCCAGT	M13-forward	442
CAGGAAACAGCTATGAC	M13-reverse	205

Tabelle 3.2: Primerbindungspositionen zur Sequenzierungs-PCR nach der Klonierung direkt vom TOPO[®]-Vektor

Erklärung zur Tabelle 3.2:

^a Die Nukleotidsequenzen sind in 5'-3'-Richtung des pCR[®]-XL-TOPO[®] Vektors angegeben

^b Angabe als Basenposition innerhalb des Vektors gelesen in 5'-3'-Richtung

3.6 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden 82 nicht vorbehandelte Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus-Genotyp-1-Infektion untersucht, die als Studienpatienten an der internationalen multizentrischen DITTO-Studie (Dynamically Individualized Treatment of Hepatitis C Infection and Correlates of Viral/Host Dynamics) teilnahmen.¹⁵⁹ Alle untersuchten Patienten erhielten die gleiche Kombinationstherapie aus Peginterferon alfa 2a und Ribavirin für 48 Wochen.

Die Diagnose einer chronischen Hepatitis C wurde aufgrund erhöhter Transaminasen, einer Leberhistologie und wiederholtem Nachweis von HCV-RNA im Serum über den Zeitraum von mindestens 6 Monaten gesichert. Die Bestimmung der Viruslast zu Beginn und im Verlauf der Therapie wurde mittels des AMPLICOR HCV MONITOR™ v2,0 von Roche Diagnostics, als sensitive Nachweismethode mittels PCR, vorgenommen. Die untersuchten Patienten wiesen initial eine Viruslast >1000 IU/ml und positive anti-HCV-Antikörper auf. Bei allen Patienten konnte der Genotyp 1 bestimmt werden. Eine weitere Zuordnung in die Subtypen 1a und 1b erfolgte bei fast allen Patienten mittels des INNO LiPA-Tests. Eine Koinfektion mit HBV oder HIV wurde bei allen Patienten ausgeschlossen. Klinische, biochemische, serologische, und molekularbiologische Parameter der Patienten sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Die Patienten wurden nach vier Wochen Kombinationstherapie anhand ihres virologischen Ansprechens in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Dafür wurde die Viruslast an den Tagen 0, 1, 4, 7, 8, 15, 22 und 29 bestimmt. Entsprechend der zweiphasigen Viruskinetik des Hepatitis C Virus unter Interferon, erfolgte die Klassifizierung in „Rapid Viral Responder“ (RVR), „Slow Partial Responder“ (SPR), „Flat Partial Responder“ (FPR) und „Nullresponder“ (NUR).

Von einem „Rapid Viral Response“ wurde bei einem schnellen Abfall der Viruslast um zwei log-Stufen innerhalb der ersten vier Therapiewochen oder bei einem Abfall der Viruslast in der zweiten Phase von $\geq 0,09$ log-Stufen pro Tag gesprochen.

In die Gruppe der „Slow Partial Responder“ wurden Patienten eingeteilt, welche die Kriterien eines RVR nicht erfüllten und einen Abfall der Viruslast ≥ 1 log innerhalb der ersten vier Wochen und ein Abfall der Viruslast in der zweiten Phase von $\geq 0,09$ log-Stufen pro Tag aufwiesen. Zu dieser Gruppe zählten auch Patienten bei denen sich ein Rückgang der HCV-RNA um $\geq 0,6$ log-Stufen innerhalb der ersten vier Wochen und ein Abfall von $\geq 0,5$ log-Stufen innerhalb der ersten Phase der Therapie beobachteten

liess.

Als „Flat Partial Responder“ wurden Patienten bezeichnet, die keine RVR- oder SPR-Kriterien erfüllten, aber in der ersten Phase einen Abfall der Viruslast um $\geq 0,5$ log Stufen zeigten und damit insgesamt einen flachen Abfall der Viruslast aufwiesen. Patienten die in den ersten 4 Therapiewochen nur einen Abfall der Viruslast von $< 0,5$ log-Stufen aufzeigten und bei denen sich damit kein ausreichender Abfall der HCV-RNA im Serum nachweisen liess, wurden als Nullresponder bezeichnet.¹⁵⁹

3.7 Seren

Nach der Blutentnahme wurde das Blut umgehend unter Kühlung abzentrifugiert. Anschließend konnte das gewonnene Serum unter einer sterilen Laminarflow-Arbeitsbank aliquotiert und bei -80°C eingelagert werden. Die Patientenserum wurden der Serumbank der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie der gemeinsamen Serumbank der multizentrischen DITTO-Studie im Hôpital Henri Mondor der Universität Paris (Leiter: Prof. J. M. Pawlotsky) zugeführt.

3.8 Extraktion viraler RNA aus Serum

Zur Gewinnung viraler RNA aus dem Serum wurde das „QIAamp Viral RNA Mini Spin“-Protokoll mit den entsprechenden Fertig-Reagenzien angewandt.

Zuerst wurden $100\ \mu\text{l}$ des Patientenserums auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden $400\ \mu\text{l}$ des AVL-Puffers inklusive Carrier-RNA hinzu gegeben und durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten war die Lyse der Virusbestandteile erfolgt. Durch Einsatz von $400\ \mu\text{l}$ von 100%igem Ethanol kam es zum Ausfällen der RNA. Die hergestellte Lösung wurde nach ausgiebigem Durchmischen in die mitgelieferte „QIAamp spin column“ pipetiert und anschließend bei 8000 rpm mehrmals zentrifugiert. Durch Verwendung zweier Waschpuffer (AW1, AW2) wurden überschüssige Zell-Bestandteile entfernt. Die Virus-RNA befand sich anschließend in der Filtersäule und konnte durch Verwendung von $50\ \mu\text{l}$ AVE-Puffer und erneuter Zentrifugation aus dem Filter in ein neues Tube ausgewaschen werden. Die hierbei gewonnenen $50\ \mu\text{l}$ RNA-haltige Lösung konnten bis zur Weiterverwendung bei -80°C eingefroren werden. Es erwies sich aber, aufgrund der Instabilität der RNA als vorteilhaft, direkt mit der reversen Transkription der RNA fortzufahren.

3.9 Amplifikation des spezifischen Genomabschnittes

3.9.1 Herstellung von RNase-freiem Wasser (DMPC-Wasser)

Um Verluste während des Arbeitens mit der RNA zu vermeiden, musste mit RNase-freiem Wasser gearbeitet werden. Aus diesem Grund wurde das Wasser vor Verwendung mit DMPC behandelt. Für die Herstellung von einem Liter 0,1%igem DMPC Wasser wurden 50 ml Aqua dest. mit 50 ml Ethanol (100%) und 1 ml DMPC vermengt und mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt. Der Ansatz wurde mindestens für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin autoklaviert.

3.9.2 Herstellung eines dNTP-Mix

Für die Durchführung der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion musste eine 10 mM dNTP-Lösung hergestellt werden. Dazu wurden jeweils 10 µl der vier verschiedenen Desoxy-Nukleotid-Lösungen (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) mit 60 µl DMPC-Wasser zusammen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipetiert. Nach Durchmischen in der Mini-Zentrifuge konnte der dNTP-Mix direkt weiter verarbeitet oder bei 4 °C gelagert werden.

3.9.3 Reverse Transkription

Da die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase DNA-abhängig arbeitet, war es notwendig, zunächst das virale RNA-Genom in einen DNA-Strang (c-DNA) zu übersetzen. Dieser als reverse Transkription bezeichnete Vorgang erfolgte durch den enzymatischen Einsatz der reversen Transkriptase des Humanen T-Lymphozyten Leukämie Virus 1,2. Der Transkriptionsansatz wurde aus Serum, dNTP's, Random Hexamere, MgCl₂, RNase-Inhibitor und einem Puffer erstellt (Tabelle 3.3).

Als Kontrolle einer eventuellen Kontamination wurde immer eine Probe aus DMPC-Wasser als Negativkontrolle mitverarbeitet. Ebenso wurde aus einer Hepatitis C Virus-RNA-haltigen Serumprobe eine Positivkontrolle erstellt.

Zur Inkubation wurden jeweils ca. 20 µl des Reaktionsansatzes in ein PCR-Tube pipetiert und für 30 Minuten bei 37 °C im Cycler inkubiert.

Extraktionsprodukt	8 µl
MgCl ₂	4 µl
10xPCR-Puffer	2 µl
dNTP-Mix	4 µl
Random Hexamere	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
DMPC Wasser	4 µl
Reverse Transkriptase	0,3 µl

Tabelle 3.3 Ansatz zur reversen Transkription

3.9.4 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation einzelner Genabschnitte des NS5A wurde eine nested-PCR verwendet (n-PCR). Dieses Protokoll erwies sich als vorteilhaft, da es zu einer Verbesserung sowohl der Amplifikatmenge als auch der Spezifität führte. Unter Verwendung der hitzebeständigen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq) und verschiedener Primer konnte das gewünschte DNA-Fragment exponentiell vervielfältigt werden. Aufgrund eines erhöhten Kontaminationsrisikos einer n-PCR wurden sorgfältig alle Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination eingehalten.⁶³

Die Sense- und Antisense-Außen-Primer des ersten PCR-Ansatzes lagen einige Basenpositionen weiter außen auf dem Amplifikat als die im zweiten PCR-Ansatz verwendeten Innen-Primer. Das dabei entstandene Amplifikationsprodukt war 270 Basen lang und lag zwischen den Basenpositionen 7239 und 7509. Nach Translation entsprach dies den Aminosäurepositionen 2303 bis 2393 des HCV-J. Für die beiden HCV-Subtypen 1a und 1b wurden verschiedene komplementäre Primer konzipiert. Häufig mussten unterschiedliche Innen- und Außen-Primer sowohl in der ersten als auch der zweiten PCR zur Optimierung kombiniert werden.

In den zwei aufeinander folgenden PCR-Abläufen (1. PCR und 2. PCR) wurde bei einer Temperatur von 95°C der aus der reversen Transkription gewonnene DNA-Strang denaturiert. Anschließend erfolgte bei einer Primer-spezifischen Annealing-Temperatur von 45-72°C die Anlagerung der Primer an die spezifische Region der als Einzelstrang vorliegenden DNA. Bei 72 °C erfolgte die Elongation der Primer. Durch die Taq-Polymerase folgte mittels Anbau der im Reaktionsansatz vorliegenden freien Desoxy-Nukleotide die Bildung eines komplementären Stranges.

In der ersten PCR wurden 25 Zyklen und in der zweiten PCR 45 Zyklen zur exponentiellen Vervielfältigung des jeweiligen Genomabschnitts (Amplifikate)

durchgeführt. Eine abschließende Extensionsphase von zehn Minuten bei 72°C ermöglichte eine Komplettierung verkürzter Amplifikatstränge.

Die gesamte Reaktion erfolgte in einem Thermocycler, welcher mit hoher Präzision und in kurzer Zeit die gewünschten Temperaturen in den Reaktionsgefäßen herstellen kann. Die anschließende Aufbewahrung der amplifizierten DNA-Fragmente in Lösung erfolgte bei 4°C, -20°C oder -80°C. Die verschiedenen PCR-Protokolle der 1. und 2. PCR sind in Tabelle 3.4 bis Tabelle 3.9 aufgeführt, die gemeinsamen Cycler-Protokolle in den Tabelle 3.10 und Tabelle 3.11.

DMPC Wasser	20,7 µl
10xPCR-Puffer	4 µl
1a/1b-NS5A-32s	0,5 µl
1a/b-NS5A-32as	0,5 µl
RT-Produkt	20 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
MgCl ₂	3µl
DMSO	1µl

Tabelle 3.4 : Ansatz zur 1. PCR der NS5A Region für den Genotyp 1a oder 1b

DMPC Wasser	20,7 µl
10x PCR-Puffer	4 µl
1a-NS5A-15s	0,5 µl
1a-NS5A-32as	0,5 µl
RT-Produkt	20 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
MgCl ₂	3µl
DMSO	1µl

Tabelle 3.5 : Ansatz für die 1. PCR, Genotyp 1a

DMPC Wasser	20,7 μ l
10x PCR-Puffer	4 μ l
1b-NS5A-34s	0,5 μ l
1b-NS5A-32as	0,5 μ l
RT-Produkt	20 μ l
Taq-Polymerase	0,3 μ l
MgCl ₂	3 μ l
DMSO	1 μ l

Tabelle 3.6: Ansatz für die 1. PCR, Genotyp 1b

DMPC Wasser	39,7 μ l
10xPCR-Puffer	5 μ l
1a/1b-NS5A-33s	0,5 μ l
1a/1b-NS5A-33as	0,5 μ l
Produkt der 1. PCR	2 μ l
Taq-Polymerase	0,3 μ l
MgCl ₂	5 μ l
DMSO	1 μ l
dNTP-Mix	2 μ l

Tabelle 3.7 : Ansatz zur 2. PCR der NS5A Region für den Genotyp 1a oder 1b

DMPC Wasser	39,7 μ l
10xPCR-Puffer	5 μ l
1a-NS5A-16s	0,5 μ l
1a-NS5A-33as	0,5 μ l
Produkt der 1. PCR	2 μ l
Taq-Polymerase	0,3 μ l
MgCl ₂	5 μ l
DMSO	1 μ l
dNTP-Mix	2 μ l

Tabelle 3.8 : Ansatz zur 2. PCR der NS5A Region für den Genotyp 1a

DMPC Wasser	39,7 µl
10xPCR-Puffer	5 µl
1b-NS5A-35s	0,5 µl
1b-NS5A-33as	0,5 µl
Produkt der 1. PCR	2 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
MgCl ₂	5µl
DMSO	1µl
dNTP-Mix	2 µl

Tabelle 3.9 : Ansatz zur 2. PCR der NS5A Region für den Genotyp 1b

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (s)</i>	<i>Zyklenzahl</i>
<i>Denaturierung</i>	95	120	1
<i>Denaturierung</i>	95	60	25
<i>Annealing</i>	45	60	
<i>Extension</i>	72	60	
<i>Extension</i>	72	600	1

Tabelle 3.10: Cyclereinstellungen zur 1. PCR für die PCR-Protokolle Tabelle 3.4 bis Tabelle 3.6.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	60	45
Annealing	45	60	
Extension	72	60	
Extension	72	600	1

Tabelle 3.11 : Cyclereinstellung zur 2. PCR für die PCR-Protokolle Tabelle 3.7 bis Tabelle 3.9

3.9.5 Herstellung von Puffern und Lösungen zur Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Agar-Gelplatten und der Laufpuffer zur Elektrophorese musste ein 40%-iger Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer als konzentrierte Vorratslösung angesetzt werden. Die in Tabelle 3.12 aufgelisteten Reagenzien wurden dazu eingewogen und in 800 ml Wasser unter ständigem Rühren aufgelöst. Anschließend wurde mit Essigsäure (Eisessig, 100%) der pH-Wert auf 8,3 eingestellt und die Lösung auf einen Liter mit Wasser aufgefüllt. Für die weitere Verarbeitung wurde vor jeder Gelelektrophorese TAE in 10%-iger Form durch vierfache Verdünnung mit Reinstwasser aus 40%-iger TAE-Vorratslösung hergestellt.

193,82 g	Tris-Base
65,62 g	NaAcetat
29,78 g	EDTA

Tabelle 3.12: Herstellung TAE 40%

3.9.6 Aufreinigen von PCR-Produkten

Vor der Überprüfung des PCR-Produkts durch Auftrennung in der Gelelektrophorese oder vor einer Weiterverarbeitung zur Sequenzierung musste das 2. PCR-Produkt aufgereinigt werden. Dieser Schritt erfolgte mittels des „QIAquick PCR Purification Kit“-Protokolls. Dazu wurden die verbleibenden 50 µl des 2. PCR Produktes mit 180 µl des Bindungs-Puffers aus dem Kit mit einer Pipette gemischt. Durch die Zugabe des Bindungs-Puffers entstand ein pH- und Salzgehalt in der Lösung, bei dem nach Zentrifugation die DNA im Filter der mitgelieferten Säule adsorbiert wurde. Nach Zugabe des Waschpuffers auf die Filtersäule und erneuter Zentrifugation bei 1300 rpm über eine Minute, konnte mit Hilfe des Elution-Puffers die gereinigte DNA als Überstand gewonnen werden.

3.9.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Sicherung der PCR-Ergebnisse wurde das aufgereinigte 2. PCR-Produkt durch die Agarose-Gelelektrophorese in seiner Länge und Quantität überprüft. Dazu wurde ein 2%-iges Agarosegel aus 2 g Agarose und 100 ml des 10%-igen TAE-Puffers hergestellt. Durch Erhitzen in der Mikrowelle polymerisierte die Agarose. Der Lösung wurden nach leichtem Abkühlen 5 µl Etidiumbromid (EtBr) zur späteren Markierung der DNA zugesetzt. Nach Festwerden des Gels wurde in die darin enthaltenen Geltaschen 10 µl des PCR-Produktes auf das Agarosegel aufgetragen. Gleichzeitig wurden 5 µl

des 100 Basenpaar (BP)-Ladders in eine eigene randständige Tasche zum Längenwanderungsvergleich mit aufgetragen. Die ganze Gelplatte konnte danach in eine Elektrophorese-Kammer, gefüllt mit 10%-iger TAE-Lösung als Laufpuffer, gestellt werden. In der Kammer wanderte das DNA-Produkt bei einem angelegten Gleichstrom von 500 mA und einer Spannung von 110 Volt innerhalb von ca. 40 Minuten durch das Gel zur Anode. Hierbei erfolgte die Einlagerung des Etidiumbromid in die DNA, welche unter Anlage des Stroms in Richtung der Katode wanderte. Kurze DNA-Fragmente wanderten dabei weiter durch das polymerisierte Netz als längere Fragmente. Eine Auftrennung der DNA konnte hierdurch erzielt werden.

Unter der UV-Lampe konnte man die gleichlangen DNA-Fragmente als eine homogene fluoreszierende Bande erkennen. Je nach Bandenstärke und Lokalisation im Gel konnte die Qualität des Versuchs beurteilt werden. Voraussetzung für eine gelungene PCR war die Identifizierung der Negativ- und Positivkontrolle. Zur Erkennung der Fragmentlänge diente der 100 BP-Ladder. Das untersuchte Fragment konnte mit einer Basenpaarlänge von 270 BP als Bande auf Höhe zwischen der 200- und 300 BP-Markierung des Ladders identifiziert werden. Anschließend wurde das Gel unter dem UV-Licht zur Dokumentation mit der Polaroid-Kamera photographiert.



Abbildung 3.1: Polaroid-Bild einer Gelelektrophorese:

Erklärung zur Abbildung 3.1:

Links im Bild befindet sich der BP-Ladder, mit Leuchtbande nach je 100BP, daneben Banden mit unterschiedlicher Leuchtqualität in Höhe der Markierung von 200 bis 300 BP. In der 9. Tasche befindet sich kein fluoreszierendes Amplifikat.

3.10 Sequenzierung

3.10.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Um die DNA-Sequenzen für den Sequenzierungsautomaten lesbar zu machen, wurde in der Sequenzierungs-PCR ein Sequenzierungs-Kit mit Big-dye-Nukleotiden verwendet. Bei den modifizierten Nukleotiden handelte es sich um so genannte 2',3'-Dideoxynucleotid-Triphosphate (ddNTPs), die am 3'C-Atom statt einer OH-Gruppe ein Wasserstoffatom besitzen. Dadurch wird im Verlauf der DNA-Strang-Synthese nach Einbau eines modifizierten Nukleotids die Verlängerung des DNA-Stranges abgebrochen, da die Bildung einer Phosphodiesterbindung am 3'C-Atom unmöglich ist. Zusätzlich ist jedes der vier modifizierten Nukleotide mit einem spezifischen Farbstoff markiert. Das Sequenzierungs-Kit für die enzymatische Synthese der unterschiedlich langen DNA-Fragmente enthält neben den modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden auch eine Taq Polymerase. Der Anteil an modifizierten Nukleotiden verglichen mit dem Gesamtanteil an Nukleotiden beträgt 1%. Der Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR und das verbleibende aufgereinigte 2. PCR-Produkt wurden entsprechend dem Protokoll aus Tabelle 3.13 hergestellt. Je ein Lösungsansatz pro Probe wurde in ein 20 µl PCR-Tube pipetiert und der Thermocycler entsprechend des Protokolls in Tabelle 3.14 eingestellt.

Reinstwasser	12 µl
Sequenzierungs Kit	4 µl
Sense Primer der letzten PCR	0,5 µl
Aufgereinigtes 2.PCR-Produkt	3,5 µl

Tabelle 3.13 : Sequenz-PCR mit big dye Nukleotiden vom PCR-Produkt

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklenzahl
Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	96	10	35
Annealing	50	15	
Extension	60	240	
Extension	72	600	1

Tabelle 3.14 : Cyclereinstellung zur Sequenz-PCR für direktes PCR-Produkt oder Klon

3.10.2 Aufreinigung vor der Sequenzanalyse

Vor einer Sequenzierung der amplifizierten BigDye-markierten-DNA musste das Produkt entsprechend des „DyeEx 2.0 Spin“-Protokolls aufgereinigt werden. Dazu mussten die dazugehörenden Filtersäulen durch Zentrifugation bei 2700 rpm für 3 Minuten in der Tischzentrifuge vorbereitet werden. Danach konnten die Säulen in ein 2ml-fassendes Zentrifugentube gestellt werden und jeweils 20 µl des Seq.-PCR-Produkts vorsichtig auf die Filtersäule pipetiert werden. Nach 3 Minuten Zentrifugation bei 2700 rpm konnte der Filter entfernt werden. Das im Tube verbleibende gereinigte Sequenzierungs-Produkt wurde direkt weiter verarbeitet oder bei 4 °C gelagert.

3.10.3 Sequenzanalyse im Sequenzierautomaten

Vor der Sequenzanalyse im Sequenzierautomaten (Genetic Analyser 3100) wurde das aufgereinigte Produkt ohne Luft einschüsse in eine dafür vorgesehene Sequenzierungsplatte pipetiert. Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte und der unterschiedlichen Klone basiert auf der Methode nach Sanger. Durch die Kettenabbruch-Reaktion liegen DNA-Fragmente in unterschiedlichen Längen vor, abhängig davon, wann ein desoxygeniertes, mit einem Farbstoff markiertes Nukleotid (ddNTP) eingebaut wurde und das Fragment zum Abbruch gebracht hat. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye-System durchgeführt. Die während der Reaktion synthetisierten DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden über eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Laser des Gerätes sendet Licht von unterschiedlicher Wellenlänge aus. Er detektiert dadurch die vier unterschiedlichen Farbstoffe der im DNA-Fragment angehängten BigDye-Nukleotide (ddNTPs) und kann durch die Analyse der unterschiedlich großen Fragmente die Sequenzabfolge analysieren.

3.11 Bearbeitung und Sicherung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden in das Software-Programm OMIGA[®] 1.0. der Oxford Molecular Group übernommen. Durch die Anwendung dieses Programms konnten die Basensequenzen in Aminosäuresequenzen übertragen werden. Es wurde für jede Sequenz die Sense- und Antisense-Basenabfolge gelesen und in ihrer Abfolge verglichen um Lesefehler des Sequenzierautomaten zu reduzieren und die Qualität der Sequenzen zu sichern.

Das Vorgehen wird beispielhaft an dem 24 BP-langen Sequenzausschnitt des NS5A-Gens in Abbildung 3.2. gezeigt. Nach Translation ergab sich die in Tabelle 3.15 abgebildete Aminosäuresequenz.

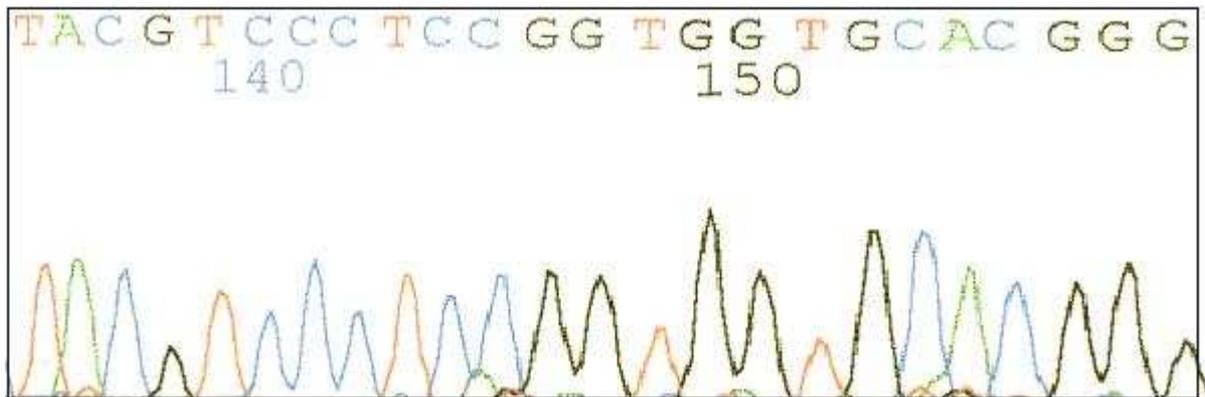


Abbildung 3.2: Basen-Sequenzausschnitt des NS5A-Fragmentes als ABI PRISM-Sequencer-Ausdruck

Erklärung zur Abbildung 3.2:

Exemplarisch wird in dieser Abbildung ein Ausschnitt der Basensequenz des NS5A-Gens des Hepatitis C Virus dargestellt. Dabei steht das T (rot) für Thymin, das A (grün) für Alanin, das G (schwarz) für Guanin und das C (blau) für Cytosin

Basensequenz	TAC	GTC	CCT	CCG	GTG	GTG	CAC	GGG
Aminosäuresequenz	Tyrosin	Valin	Prolin	Prolin	Valin	Valin	Histidin	Glycin
AS-Abkürzung	Y	V	P	P	V	V	H	G

Tabelle 3.15: Tabelle zur Translation der Basensequenz der Sequenzierung in eine Aminosäuresequenz

3.12 Mutationsanalyse NS5A

Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Mutationshäufigkeit wurden der Kruskal-Wallis bzw. der Mann-Whitney U Test angewandt.

3.12.1 Erstellung der Konsensus-Sequenzen

Zur Durchführung einer Mutationsanalyse wurden Gruppierungen („Alignments“) aus den einzelnen Aminosäuresequenzen erstellt. Dazu wurde das Softwareprogramm BioEdit; Version 7.0.0 (Tom Hall, Ibis Therapeutics; CA 92008) verwendet. Aus der Gesamtzahl aller Sequenzen und aus den einzelnen Patientengruppen wurden Konsensussequenzen errechnet. Die dabei und bei weiteren Abbildungen einheitlich verwendeten Aminosäureabkürzungen sowie die physiko-chemischen Eigenschaften der betreffenden Aminosäure sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

Klasse	Aminosäure	Abkürzung
Positiv geladen	Arginin	R
	Lysin	K
negativ geladen	Aspartat	D
	Glutamat	E
Aromatisch	Histidin	H
	Phenylalanin	F
	Tyrosin	Y
	Tryptophan	W
Polar	Asparagin	N
	Glutamin	Q
	Serin	S
	Threonin	T
Aliphatisch	Alanin	A
	Isoleucin	I
	Leucin	L
	Methionin	M
	Valin	V
	Cystein	C
spezielle konformative Eigenschaften	Glycin	G
	Prolin	P

Tabelle 3.16: Abkürzungen und physiko-chemische Eigenschaften der Aminosäuren

3.12.2 Analyse konservierter und nicht-konservierter Bereiche

Zur Untersuchung von konservierten und nicht-konservierten Mutationen mussten die Aminosäuren als „positiv“, „negativ“, „aromatisch“, „polar“, „aliphatisch“ oder „andere“ klassifiziert werden. Dabei bedeutet eine konservierte Mutation, dass es beim Auftreten einer Aminosäuremutation an dieser Position nicht zu einem Klassenwechsel der Aminosäure kommt. Eine Mutation, die einen Wechsel zu einer Aminosäure einer anderen Klasse zur Folge hat, wird somit als nicht-konservierte Mutation bezeichnet. (Tabelle 3.16.)

3.12.3 Konformative und phylogenetische Analyse

Aus den NS5A-Sequenzen konnten phylogenetische Stammbäume mittels Hilfe des Softwareprogramms Treecon für Windows (Version 1b; Y. van Peer, Antwerpen, Belgien) errechnet werden.¹³⁷ Eine Proteingewicht-Matrix („identity protein weight matrix“) wurde verwendet um die evolutionären Abstände abzuschätzen. Die Korrektur von Kimura wurde zur Richtigstellung multipler Substitutionen genutzt.⁵⁷ Der phylogenetische Baum wurde durch die Hilfe der „Neighbor-joining“-Methode von Saitou und Nei ermittelt.¹¹¹ Um die Zuverlässigkeit der Stammbaumstruktur zu untersuchen, wurde ein „Urladeprogramm“ („Bootstrap“) an Wiederholungsprobeentnahmen (1000 Wiederholungen) als pseudo-empirischer Test verwendet.³⁰

3.12.4 Lokale statistische Datenanalyse

Als Grundlage dieser Datenanalyse dient das mathematische Modell beschrieben von Sarrazin et al. 2002.¹¹⁹ Dabei können lokale Akkumulationen von Mutationen auf der Basis eines nichtparametrischen binominalen Regressionsmodells unter der vereinfachenden Annahme, dass die Aminosäureaustausche unabhängig voneinander stattfinden, analysiert werden.^{118,119} Diese Vermutung wurde beispielsweise auch als Approximation erster Ordnung in einem verwandten Kontext einer Sequenz-Segmentierung verwendet.¹¹

Ein spezifisches Datenanalyseverfahren wurde bestimmt, um zu testen, ob Unterschiede zwischen der Häufigkeit von Mutationen der Isolate bei Therapieansprechen im Vergleich zu solchen ohne Ansprechen durch eine konstante Verschiebung erklärt werden können.¹²⁶

Der Test basiert auf der Testgröße

$$T = \int_{2303}^{2393} w(t) [\hat{p}_R(t) - \hat{p}_{NR}(t) - \hat{a}]^2 dt \quad (1)$$

wobei \hat{p}_R und \hat{p}_{NR} jeweils die geschätzte Funktion der Mutationswahrscheinlichkeiten für Sequenzen aus Respondern bzw. Nonrespondern angeben. Dabei steht \hat{a} für eine Schätzung der konstanten Verschiebung.

Die Funktionen \hat{p}_R und \hat{p}_{NR} schätzen die Funktionen, welche den verschiedenen Positionen die lokalen Mutationswahrscheinlichkeiten als zumindest stetige Funktionen mit nichtparametrischen Kurvenschätzern, zugeordnet sind. Zur Glättung wurde hierbei eine Gewichtung mit dem Gauss-Kern bestimmt und eine Bandbreite von $b=1.5$ verwendet. Somit entsprechen die beiden Schätzfunktionen geglätteten Mutationshäufigkeiten. Die asymptotische Normalverteilung von T wurde durch

$$T \sim AN \left(\sum_i c_{ij} \sigma_i, 2 \sum_i \sum_j c_{ij}^2 \sigma_i \sigma_j \right) \quad (2)$$

bestimmt, wobei

$$\sigma_i = \frac{1}{n_R} p_R(i) [1 - p_R(i)] + \frac{1}{n_{NR}} p_{NR}(i) [1 - p_{NR}(i)] \quad (3)$$

und

$$c_{ij} = \int_{2303}^{2393} w(t) \left(k_i(t, b) - \frac{1}{447} \right) \left(k_j(t, b) - \frac{1}{447} \right) dt \quad (4)$$

gilt und $k_i(t, b)$ mit $i = 2303, \dots, 2393$ (im Sinne der Aminosäurepositionen des untersuchten NS5A-Fragmentes des Hepatitis C Virus) die Kerngewichte beschreibt. Diese asymptotische Verteilung wurde verwendet, um die kritischen Regionen des Signifikanztests bzw. p-Werts zu berechnen.¹¹⁹

Stetige Variablen wurden unter Verwendung des Mann-Whitney U Test verglichen und zwei kontinuierliche Variablen mit Hilfe des Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten analysiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Tests zweiseitig durchgeführt und ein p-Wert <0.05 als signifikant betrachtet.¹¹⁸

3.13 Klonierung von Quasispeziesvarianten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mittels des TOPO[®]XL-PCR Cloning Kit und dem darin enthaltenen Vektor pCR[®]-XL-TOPO[®]. Als Ausgangsprodukt wurde aufgereinigte DNA aus der 2. PCR von 11 Patienten des Kollektivs zum Zeitpunkt vor und nach zwei Wochen Therapie verwendet.

Das verwendete Klonierungssystem arbeitet mit dem Prinzip, dass die Taq-Polymerase der PCR eine terminale Transferaseaktivität besitzt und unabhängig vom Amplifikat am 3'-Ende ein einzelnes Adenosin anhängt. Für die Aufnahme der Fremd-DNA enthält der Vektor pCR[®]-XL-TOPO[®] am 3'-Ende einen eingefügten DNA-Abschnitt mit vielen Restriktionsschnittstellen („Multiple Cloning Site“). Mit dem Überhang eines Thymin-Restes kann das PCR-Produkt relativ einfach in den Vektor ligiert werden, da dieser bereits in linearisierter Form vorliegt und für die Ligation nicht mehr enzymatisch geschnitten werden muss. Die Vektorsequenz enthält M13-Primerbindungsstellen (M13-reverse und -forward-priming site), um mittels PCR die Insertion des Amplifikates überprüfen zu können.

3.13.1 Ligation

Der Ligationsansatz enthielt 1 µl des fertigen Ligasemix mit dem 3,5 kb langen DNA-Vektor und 4 µl des vorher aufgereinigten PCR-Produkts. Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde mit dem Ligasemix und dem darin enthaltenen Vektor bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zusatz einer Stopp-Lösung wurde die Ligation nach 5 Minuten beendet. Im Anschluss erfolgte die Abkühlung auf Eis.

3.13.2 Transformation

Die Transformation beinhaltet die Plasmidaufnahme in die Bakterienzelle als notwendigen Teil der Klonierung. Dieser Schritt erfolgt mit Hilfe kompetenter E. coli-Zellen. Kompetent bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Bakterien durch eine Vorbehandlung (zum Beispiel mit Calcium²⁺) eine höhere Transformationskapazität haben und damit ein größerer Ertrag an Klonierungsprodukten erwartet werden kann. Vom Hersteller wurden bereits kompetente E. coli-Zellen mitgeliefert, welche mit 2 µl der mitgelieferten Reaktionslösung vorsichtig durch leichtes Schütteln des Tubes vermischt wurden.

Für 30 Minuten wurde der Ansatz auf Eis inkubiert, bevor er für 30 Sekunden einem Wasserbad von 42 °C ausgesetzt wurde. Der Hitzeschock bewirkte eine Instabilität der Zellmembran, wodurch das Plasmid in die Zelle aufgenommen werden konnte.

In der folgenden Stunde wurde das Reaktionsgefäß auf einem Schüttler bei 37 °C und 225 rpm erneut inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen konnte das Transformationsprodukt weiter verarbeitet werden.

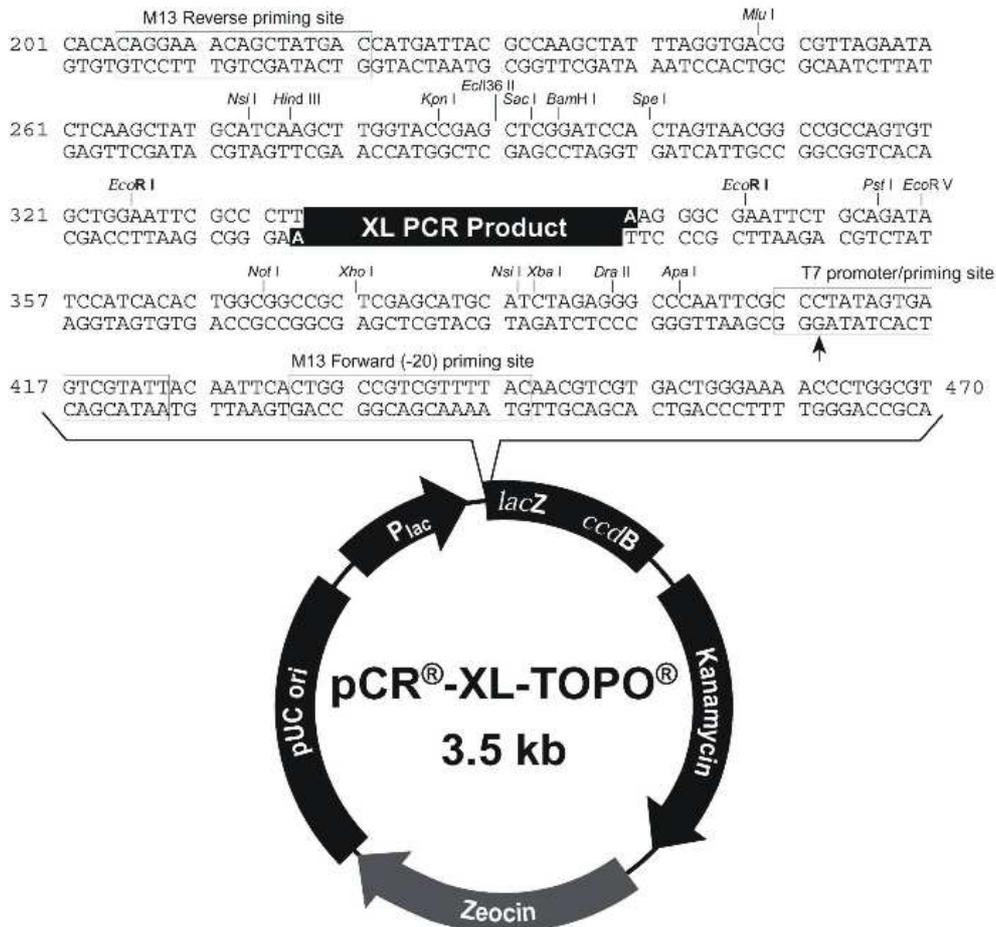


Abbildung 3.3 : Dargestellt ist der Vektor pCR®-XL-TOPO® in den das DNA-Fragment des NS5A kloniert wurde.

3.13.3 Herstellung der Kandamycin/ Ampicillin-Agarplatte zur Klonierung

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Agarplatten für die Klonierung der Quasispeziesvarianten wird ein „Lysogeny broth Medium“ (LB-Medium) benötigt. Für die Herstellung von 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl eingewogen. Die Reagenzien wurden auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und unter ständigem Rühren aufgelöst. Anschließend wurde das Medium mit

NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zur Herstellung des LB-Agars wurden dem LB-Medium zusätzlich 9 g Agar hinzugefügt. Nach 20-minütigem Autoklavieren bei 1,3 bar und Abkühlen auf 50°C konnten Ampicillin und Kandamycin zugesetzt werden. Die Antibiotika wurden als Stammlösungen in 1000-facher Konzentration mit Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Aufgrund der Antibiotikaresistenz, welche auf dem Plasmid kodiert vorliegt, wurde für die Selektion der Bakterien Kandamycin in einer Menge von 50 µg/ml Endkonzentration zugesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Nährmedium Ampicillin in derselben Konzentration beigemischt. Das Medium konnte anschließend in die Petrischalen gegossen werden. Nach Abkühlen konnten die Platten direkt verwendet oder bei 4°C für einige Tage gelagert werden.

3.13.4 Kultivierung

Zur Kultivierung einzelner Klonkolonien wurden die vorbereiteten Kandamycin/Ampicillin-Agarplatten mit dem Transformationsprodukt eines Patienten beschichtet. Dabei wurden pro Transformationsprodukt zwei verschiedene Mengen aufgetragen. Es wurden 100 µl bzw. 200 µl des Transformationsprodukts auf je eine Nährplatte pipettiert und mittels Spatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden 24 bis 48 Stunden bei 37 °C im Bakterienbrutschrank bebrütet. Für eine bessere Identifizierung transformierter Klone wurde die Eigenschaft der Plasmide, Informationen über eine Kandamycinresistenz zu tragen, nutzbar gemacht. Bakterien, welche ein Plasmid inklusive Amplifikat besitzen, wachsen als Kolonien auf der Kandamycinplatte. Wird ein Plasmid ohne Amplifikat aufgenommen, wächst das Bakterium nach der ersten Teilung nicht mehr weiter. Kommt es zum Verlust eines Thymidinrests an einem Ende des linearen Plasmids, schließt er sich zu einer Ringstruktur. Dabei entsteht eine Verbindung zwischen der Promotorregion und dem Strukturgen des *ccdB*-Gens. Ein dadurch gebildetes bakteriotoxisches Produkt führt zum Absterben des *E.coli*-Bakteriums. Beide Mechanismen sorgen dafür, dass nur Bakterienkolonien wachsen, die den Vektor inklusive des zu untersuchenden DNA-Fragments beinhalten.

3.13.5 Sequenzierung der Klone

Auf einer Kandamycinplatte waren nach 24-48 h einige hundert Bakterienkolonien gewachsen. Um eine Kontamination mit anderen Bakterien und vor allem mit Pilzen zu verhindern, wurden die Kolonien am selben Tag weiterverarbeitet. Um mehr DNA-Material für die Sequenzierung zu erhalten, wurde das klonierte DNA-Fragment vor der Sequenzierung erst noch mittels PCR amplifiziert (Tabelle 3.17 und Tabelle 3.18). Dazu wurden die M13-forward- und -reverse-Primer benutzt, welche direkt auf dem Plasmid eine Bindungsstelle besitzen. Von den Kandamycinplatten wurden ca. 30 Bakterienhöfe gepickt und direkt in den PCR-Reaktionsansatz gebracht. Nach 55 Zyklen konnten die amplifizierten Fragmente mit Hilfe des „Purification Kits“ aufgereinigt werden. Nach Sequenzierungs-PCR und anschließender Reinigung mittels des Dye Ex 2.0 Spin Kits konnten die DNA-Fragmente analysiert werden (Tabelle 3.19 und Tabelle 3.20). Aus 30 gepickten und amplifizierten Klonen konnten im Mittel 20 verwertbare Sequenzen gewonnen werden.

Abhängig davon, wie das Fragment in den Vektor zufällig inseriert worden war, entstanden die Sequenzen in 5`- oder in 3`-Leserichtung. Zur Auswertung wurden alle Sequenzen in „sense“ (5`-3`)-Leserichtung umgewandelt.

10xPCR-Puffer 15 mM	5 µl
M 13-forward Primer	0,5 µl
M 13-reverse Primer	0,5 µl
Taq-Polymerase 5U/µl	0,3 µl
dNTP Mix 10 mM	1 µl
DMPC-Aqua	41 µl
DMSO	1µl

Tabelle 3.17 : Ansatz zur PCR-Amplifikation der Klone

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklenzahl
Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	60	
Annealing	55	60	55
Extension	72	60	
Extension	72	600	1

Tabelle 3.18: Cyclereinstellungen zur PCR-Amplifikation der Klone

Reinstwasser	12 µl
Sequenzierungs Kit	4 µl
M13-forward Primer	0,5 µl
Klonkolonie	1

Tabelle 3.19 : Sequenz-PCR der Klone mit Big-dye-Nukleotiden

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklenzahl
Denaturierung	96	120	1
Denaturierung	96	10	
Annealing	50	15	35
Extension	60	240	
Extension	72	600	1

Tabelle 3.20: Cyclereinstellungen zur Sequenzierungs-PCR der Klone

3.14 Statistische Methoden der Quasispezies-Auswertung

3.14.1 Variantenentwicklung unter Kombinationstherapie

Zur Auswertung der durch Klonierung und Sequenzierung ermittelten Quasispezies-Sequenzen wurden Gruppen identischer Isolate mit Hilfe des BioEdit[®]-Softwareprogramms erstellt. Wie auch die Bearbeitung der Direktsequenzen, erfolgte zuvor die Übertragung der Nukleotid- in Aminosäuresequenzen mit Hilfe des OMIGA[®]-Softwareprogrammes. Durch anschließende Sichtung identischer Sequenzen ließen sich Art und Anzahl der einzelnen Variantengruppen zu beiden Zeitpunkten (vor und zwei Wochen nach Therapiebeginn) bestimmen. Durch diese Gruppierung konnten die Klonvarianten untereinander verglichen werden.

3.14.2 Berechnung der Komplexität der Quasispezies

Die genetische Komplexität ist definiert als die Anzahl der verschiedenen HCV-Isolate innerhalb der HCV-Quasispezies.⁴⁰ Um die genetische Komplexität innerhalb der untersuchten Region des NS5A (AS 2303-2393) vorherzusagen, wurde die Entropie berechnet. Diese ist definiert auf der Grundlage der Wahrscheinlichkeit mit welcher die verschiedenen Isolate oder Cluster an Sequenzen zu einem bestimmten Zeitpunkt vorkommen können. Der Wert wurde berechnet mit $S = -\sum_i (\rho_i \ln \rho_i)$, wobei ρ_i die relative Frequenz eines Isolates innerhalb der viralen Quasispezies darstellt. Die normalisierte Entropie (S_n), wurde mit $S_n = S/\ln N$ berechnet. N ist die totale Anzahl der untersuchten Isolate.¹⁴⁸ S_n variiert von 0 (alle Isolate sind identisch) bis 1 (alle Isolate sind verschieden). Die normalisierte „Shannon Entropie“ wurde vor und nach zwei Wochen Therapie sowohl anhand der Nukleotid- als auch der Aminosäuresequenzen von 20 HCV-Isolaten aus Seren von Patienten mit dauerhaftem virologischen Ansprechen (SVR) (n=2), Rückfall (REL) (n=4), oder fehlendem Ansprechen (NR) (n=5) berechnet.

3.14.3 Berechnung der Diversität der Quasispezies

Die genetische Diversität ist definiert als die Mutationsfrequenz innerhalb der verschiedenen Isolate der HCV-Quasispezies und wurde durch die Berechnung der „Hamming-Distanzen“ ermittelt. Diese ist definiert als die Anzahl an unterschiedlichen Nukleotiden bzw. Aminosäuren innerhalb der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz zweier Isolate, oder $(1-s) \times 100$, wobei s die Fraktion von identischen Nukleotiden bzw. Aminosäuren innerhalb zwei verglichener Isolate (Paar) darstellt. Die Hamming-Distanz variiert von 0 (keine genetische Diversität) bis 100 (maximale genetische Diversität). Die durchschnittliche Hamming-Distanz ist der Mittelwert aller einzeln berechneten Isolate-Paare aus der Probe eines einzigen Patienten. Die durchschnittliche Hamming-Distanz wurde vor und zwei Wochen nach Beginn der Kombinationstherapie sowohl anhand der Nukleotid- als auch anhand der Aminosäuresequenzen von 20 HCV-Isolaten aus Seren von Patienten mit dauerhaftem virologischen Ansprechen (SVR) ($n=2$), Rückfall (REL) ($n=4$), oder fehlendem Ansprechen (NR) ($n=5$) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Alle untersuchten Patienten erhielten im Rahmen der internationalen multizentrischen DITTO-Studie Peginterferon alfa-2a mit einer Dosierung von 180 µg pro Woche (subkutan) und Ribavirin mit 1000-1200 mg pro Tag (per os). Sie hatten alle zuvor keine spezifische Therapie ihrer chronischen Hepatitis C erhalten. Bei 78 von 82 Patienten konnte die C-terminale Region des NS5A amplifiziert werden.

In der Analyse wurden die Daten bezüglich des Therapieansprechens nach vier Wochen Standardtherapie in „Rapid Viral Response“ (RVR), „Slow Partial Response“ (SPR), „Flat Partial Response“ (FPR), und „Nullresponse“ (NUR) eingeteilt und alle 78 Aminosäuresequenzen (Länge: 90 AS) diesbezüglich ausgewertet.

Die Analyse bezogen auf den Therapieerfolg konnte bei 73 Patienten, welche die Therapie protokollgemäß beendet hatten, durchgeführt werden. Hierzu erfolgte die Einteilung in „Sustained Virologic Response“ (SVR), „End-of-Treatment Response“ (ETR) und „Nonresponse“ (NR). Zusätzlich wurde bei elf ausgewählten Patienten aus dem Kollektiv vor und nach zwei Wochen Therapie der untersuchte NS5A-Abschnitt kloniert und je 20 Klone (insgesamt 400 Sequenzen) ausgewertet. Alle initial eingeschlossenen Patienten waren mit dem HCV-Genotyp 1 infiziert, wobei bei 56 Patienten der Genotyp 1b und bei 22 Patienten der Genotyp 1a bestimmt werden konnte. Die verbleibenden vier Patienten konnten keinem Subgenotyp zugeordnet werden. Sie erscheinen deshalb nur in der Gesamtauswertung und nicht bei der Auswertung der einzelnen Genotyp-Gruppen. In Tabelle 4.1 sind die klinischen Daten der 78 ausgewerteten Patienten vor Therapiebeginn dargestellt.

Patienten-Charakteristika	n = 78
Alter (Jahre) ^a	39,9 ± 10,1
Geschlecht (m/w)	53 / 25
Gewicht (kg) ^a	73,7 ± 13,6
GPT ^b	2,1 (1,0 – 22,7)
HCV RNA (x 10 ⁶ Kopien/ml) ^b	2,0 (0,02 – 16,6)
HCV Genotype 1a / 1b	22 / 56
Fibrosegrad ^a	2,2 ± 1,7
Zirrhose	10 (13 %)

Tabelle 4.1 Charakteristika der untersuchten, chronisch HCV-Genotyp1-infizierte Patienten vor Therapiebeginn

Erklärung zur Tabelle 4.1.:^a Mittelwert ± Standardabweichung^b Vielfaches der oberen Normgrenze im Median

Von den 78 Patienten zeigte sich bei 38 ein „Rapid Viral Response“, bei 28 ein „Slow Partial Response“, bei 4 ein „Flat Partial Response“ und 8 Patienten wiesen einen „Nullresponse“ auf.

Nach Beendigung der Kombinationstherapie konnten die Patienten anhand ihres endgültigen virologischen Ansprechens erneut gruppiert werden. Dazu wurden die Daten des „End-point per Protocol“ zum Ende der Therapie verwendet. Es wurden dabei nur Patienten eingeschlossen, welche die Therapie protokollgemäß durchgeführt und beendet hatten. Innerhalb dieser zweiten Zuordnung zeigten 18 Patienten keinen signifikanten Virusabfall unter Therapie und mussten deshalb als „Nonresponder“ (NR) klassifiziert werden. 55 Patienten waren „End-of-Treatment-Responder“ (ETR), da sie zum Ende der antiviraler Therapie in der PCR Hepatitis C Virus negativ waren. Nach dem Follow-up von 24 Wochen, wiesen aus dieser Gruppe 11 Patienten eine positive Viruslast in der PCR auf (Relapser, REL). 44 Patienten aus der Gruppe der End-of-Treatment-Responder wurden nach dem Follow-up als „Sustained Virologic Responder“ (SVR) eingruppiert.

4.2 Vergleichsanalyse des initialen Ansprechens und des Therapieerfolgs

Zum Ende der Studie wurde eine Vergleichsanalyse zwischen der Zuordnung des initialen Therapieansprechens und der Gruppierung des endgültigen Therapieerfolgs erstellt. Die Zusammenhänge sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. In der Kreuztabelle kann abgelesen werden, wie viele Patienten der „initialen Klassifikation“ nach 4 Wochen Kombinationstherapie (RVR, FPR, SPR und NUR) sich später in den einzelnen Gruppierungen nach erfolgter Therapie (SVR, REL und NR) wieder finden.

So finden sich zum Beispiel 31 Patienten mit einem schnellen Abfall der Viruslast (RVR) später in der Gruppe der Patienten mit anhaltendem Therapieerfolg (SVR) wieder. Dies sind 88,6% der insgesamt als RVR klassifizierten Patienten (n=35) und 70,5 % der später als SVR klassifizierten Patienten (n=44). Demnach zeigte eine signifikante Patientenzahl mit einem schnellen Abfall der Viruslast in den ersten vier Wochen auch ein anhaltendes Therapieansprechen auf die Kombinationstherapie (p-Wert <0.000). (Tabelle 4.2)

		Initiale-Klassifikation(A)					
		RVR	SPR	FPR	NUR	Gesamt	
End-Klassifikation (B)	SVR	Anzahl	31	12	0	1	44
		%-Anteil von B	70,50%	27,30%	0%	2,30%	100%
		%-Anteil von A	88,60%	46,20%	0%	12,50%	60,30%
	REL	Anzahl	3	6	1	1	11
		%-Anteil von B	27,30%	3,90%	9,10%	9,10%	100%
		%-Anteil von A	8,60%	54,50%	25,00%	12,50%	15,10%
	NR	Anzahl	1	8	3	6	18
		%-Anteil von B	5,60%	44,40%	16,70%	33,30%	100%
		%-Anteil von A	2,90%	30,80%	75,00%	75,00%	24,70%
Gesamt	Anzahl	35	26	4	8	73	
	%-Anteil von B	47,90%	35,60%	5,50%	11,00%	100%	
	%-Anteil von A	100%	100%	100%	100%	100%	

Tabelle 4.2: Kreuztabellen mit dem Vergleich der Initialen- und der End-Klassifikation des Therapieansprechens

Erklärung zur Tabelle

A beinhaltet die Initiale-Klassifikation, bestehend aus: RVR, SVR, FPR und NUR
 B beinhaltet die End-Klassifikation, bestehend aus: SVR, REL und NR

Demgegenüber fanden sich 25 der 29 Patienten aus der Gruppe ohne ein anhaltendes Therapieansprechen (Relapser und Nonresponder; entsprechen in der Tabelle 4.3 „Nicht-SVR“ mit 86,2%) auch in der Gruppe ohne einen schnellen initialen Abfall der Viruslast in den ersten 4 Therapiewochen (FPR, SPR und NUR, entsprechen in der Tabelle 4.3: „Nicht-RVR“) wieder (p-Wert <0,000).

Demnach korreliert ein „nicht-schneller“ Virusabfall in den ersten vier Therapiewochen signifikant mit einem „nicht dauerhaft“ anhaltenden Therapieerfolg (Tabelle 4.3).

	Initial RVR/Nicht-RVR- Klassifikation(C)				Gesamt
			RVR	Nicht-RVR	
End-SVR/Nicht-SVR	SVR	Anzahl	31	13	44
		%-Anteil von D	70,50%	29,5%	100%
		%-Anteil von C	88,60%	34,2%	60,30%
Klassifikation (D)	Nicht-SVR	Anzahl	4	25	29
		%-Anteil von D	13,80%	86,20%	100%
		%-Anteil von C	11,40%	65,80%	39,70%
Gesamt		Anzahl	35	38	73
		%-Anteil von D	47,90%	52,10%	100%
		%-Anteil von C	100%	100%	100%

Tabelle 4.3: Kreuztabelle der End-SVR/Nicht-SVR-Klassifikation gegenüber der Initial RVR/Nicht-SVR-Klassifikation

Erklärung zur Tabelle Tabelle 4.3:

D beinhaltet die End-Klassifikation, bestehend aus: SVR und Nicht-SVR (REL, NR)

C beinhaltet die Initiale-Klassifikation, bestehend aus: den Gruppen RVR und Nicht-RVR (SVR, FPR, NUR)

4.3 Analyse der Direktsequenzen des C-terminalen NS5A-Proteins des HCV (AS 2303-2393)

Aus den untersuchten 82 Seren vor Therapie konnten mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen 78 Direktsequenzen mittels nested-PCR ermittelt werden. Primär wurden spezifisch konfigurierte Primer entsprechend der Genotypisierung vor Therapie zur PCR gewählt. In einigen Fällen brachte erst der Wechsel zu anderen Primerkombinationen ein Ergebnis, wobei in vier Fällen auch mit modifizierten PCR-Protokollen kein Ergebnis erzielt werden konnte.

Die untersuchten Sequenzen hatten eine Länge von 90 Aminosäuren (AS-Position 2303 bis 2393). Dieser Abschnitt repräsentiert den carboxyterminalen Bereich des Nichtstrukturproteins 5A. Er beinhaltet die SH3-bindende Domäne (AS 2321-2327), den N-terminalen Abschnitte der Domäne III (AS 2328-2419), und die V3 Region (AS 2356-2379).^{20,24,74,83,133,134}

Unter Verwendung der ermittelten Direktsequenzen erfolgte die Etablierung subtypenspezifischer Konsensussequenzen (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Durch Anwendung des im Methodenteil beschriebenen mathematischen Modells wurden die Differenzen gegenüber den Konsensussequenzen ermittelt. Weitere Daten konnten durch die Analysen des spezifischen Testsystems, basierend auf der „geglätteten Mutationshäufigkeit“, ermittelt werden.¹¹⁹ Dabei konnten lokale Unterschiede in den Sequenzen gegenüber den beiden Konsensussequenzen festgestellt werden. Zusätzlich zu den lokalen Sequenzunterschieden wurden auch die Differenzen des gesamten untersuchten Proteinabschnitts gegenüber den beiden Konsensussequenzen, im Sinne allgemeiner (globaler) Sequenzunterschiede ermittelt. Bei der Analyse der allgemeinen Mutationsrate in Bezug auf das Therapieansprechen wurden der Kruskal-Wallis und der Mann Whitney U Test verwendet.

Ergebnisse

```

cons 1a      PDYEPPVVHGCLPPPQSPVPPPRKKRTVVLTESTVSTALAEELATKSFSGSSSTSGITGDNTTTSSEPAPSVCPDSDAESYSMPPLEG

SVR 1a D03  -----RP-----V--D-AA--T--PA-L-----C-----
SVR 1a D16  ---T-----TKA--I---R-K-----S-----T---ES-AVDSGTA-APPDQPSDDGGAG--V-----
SVR 1a D31  -----R-----S-SPA-L-----C-----
SVR 1a D34  -----V-----A---S-GHS-----
SVR 1a D51  ---V-----TKA--I---R-----S-----T---ES-AADSGTA-ALPDQL-DDGDAG--V-----
SVR 1a D56  -----R-----C-----
SVR 1a D60  -----D-P---S---R-----C-----
SVR 1a D61  -----V-----T--D-S-----C-----
SVR 1a D70  ---V-----AKA--I---R---S---S---T---ES-AVDSGTA-A-PDQPSDDGDAG--V-----
SVR 1a D74  ---V-----TKA--I---R-----S-----T---ES-AVDSGTA-APPDQ-SDDGDAG--V-----
SVR 1a D82  -----R-----SV--Y-----
ETR 1a D12  -----P---S-GR-----C-----
ETR 1a D44  -----R-----S-----S-A-A---S-G-L-----
ETR 1a D55  -----D-----A-----SM-E-----S-S-----C-----
ETR 1a D57  -----R-----C-----
NR  1a D27  -S-V-----TKA--I---R-----S-----T---ES-AVDSGTA-APPDQL-DAGDXG-----
NR  1a D33  -----A-----R-L-----
NR  1a D36  -G-----M-----T-----
NR  1a D62  ---K-----A-----
NR  1a D68  -----N-----A-----C-----
NR  1a D73  -----T-A-----G-----

```

Abbildung 4.1: Alle untersuchten Subtyp 1a-Aminosäuresequenzen dargestellt gegenüber der Konsensussequenz („cons 1a“)

Erklärung zur Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2:

In der ersten Zeile ist unter der Bezeichnung „cons 1a“, bzw. „cons 1b“ die jeweilige Konsensussequenz dargestellt. Darunter befinden sich alle Genotyp 1a- bzw. 1b-Sequenzen, gruppiert anhand des Therapieansprechens. Die Abkürzungen D01-D82 entsprechen den Patienten-Identifikationsnummern. Identische AS gegenüber Konsensussequenz sind durch einen Bindestrich gekennzeichnet. Alle Mutationen werden durch einen Großbuchstaben gekennzeichnet, entspricht der Abkürzung der zugehörigen Aminosäure (siehe Tabelle 3.16)

Ergebnisse

```

cons 1b      PDYVPPVVHGCP LPPTKAPP I PPRRKRTVVLTESTVSSALAE L A T K T F G S S E S S A V D S G T A T A P P D Q P S D D G D A G S D V E S Y S S M P P L E G

SVR 1b D01  -----A-T-----G-----GT-----
SVR 1b D06  -----S-----N-T-----
SVR 1b D07  -----A-----II--N-----SG-----T--A-----
SVR 1b D09  -----E-F-A-----
SVR 1b D11  -----A-----SK-----S-----
SVR 1b D13  --E-----PQS--V--K-----T-----S---ST-GITGDNT-T-SEPA-SGRPPD--A-C-----
SVR 1b D14  -----L--P-GS-T-----
SVR 1b D15  -----L--P-GS-T-----
SVR 1b D17  --E-----SQS--V--K--M-----T-----S---ST-GITGD-T-TSSEPAPSGCPPD-----
SVR 1b D18  --D-----G--A---G-GP-GA-N--VA--R--A---K--A-----
SVR 1b D20  -----R-----Q--I-----S--K-----
SVR 1b D22  --Q--Y---PRP--V-----NL-T-----S---ST-GITGDNT-TSSEPAPSGRSRD--A-T-----
SVR 1b D25  -----K--N-----S-----P--D--AG-----
SVR 1b D26  -----K--N-----S-----P--D--AG-----
SVR 1b D29  -----V-S-----T-T--A-----
SVR 1b D32  -----RT-----G-----T--T--G-----
SVR 1b D38  --T-----P--V-----D-----GPP--NG--A--S--GD-----C-----
SVR 1b D39  -----A-T-----GT-----
SVR 1b D40  ---R-----K-----A--G-P-A---P-----
SVR 1b D41  ---S-----X-----L-----T-----
SVR 1b D42  -----A-----G--A-----GX--A-----
SVR 1b D47  -----S--A--A-----DG-T-----
SVR 1b D48  -----V-----D--S--G-----E-P-G-T---F-----
SVR 1b D49  -----NM-----I-----A-----D--T-----
SVR 1b D54  -----V-----AG-G--A-----
SVR 1b D58  -----E-R-----N-V-----GD--G-----
SVR 1b D63  --E-----PQS--V--K--N--T-----S---ST-GITGDNT-TSSEPAPSA CPPD--A-----
SVR 1b D64  -N-----T-----KEK--I--S-----G-----K--P-----
SVR 1b D69  --A-----K-----GP--TA-DSMEI-L--P--GT-----
SVR 1b D71  -----A-----I-----S--A-----A--S--P-P-----
SVR 1b D72  -----D-----LH-S--T--AG-----
SVR 1b D76  -----I-V--V-----T--N--M-----
SVR 1b D78  ---I-----A-----A--A-----
SVR 1b D79  --E-----SQS--V--K-----S-----S-A--ST-GIT-DNT-TS-EPA-SGCPPD--T-H-----
SVR 1b D80  --E-----PRS--V--K-----S---ST-GITGDNT--SSEPAPSVCPPD--T-----
SVR 1b D81  --T-----K-----C-----G-----
ETR 1b D04  -----P-T-----A--G-----
ETR 1b D10  -----R--A-T-----G-----
ETR 1b D21  -----G-----A--KE-----
ETR 1b D52  -----A-A-D--T--V-----L--GT-T-----
ETR 1b D53  -----R-----V-----D--G-----A--DG-T-----
ETR 1b D75  -----I-V--V-----T--N--M-----
NR 1b D02  -----I-----T-----G-----A-G--T-----
NR 1b D05  -----S-----N-T-----
NR 1b D08  -----G-----
NR 1b D19  -----A-T-----D-----S--G-----L--A-T-----
NR 1b D23  -----A-----G--P-V--G--A--T-A-----
NR 1b D24  -----LL--K-----
NR 1b D28  -----A-----M--A--G-----SLG--T--AG-----
NR 1b D35  -----K-----G-----A-G-----
NR 1b D37  -----A-T-----S-----G--E-----
NR 1b D43  -----E-----R-A--N-----G-----M-G--L-T-T-----
NR 1b D45  -----S--G--N-----
NR 1b D46  -----R--GPPTI-----LS-G--T--AG-----
NR 1b D59  --E-----PQS--V-----M-----T-----S---ST-GITGDNT-TSSEPAPSVCPPD--AD-C-----
NR 1b D66  -----K--I--S-----G-----E--P-----
NR 1b D77  -----G--LA--N--A-----

```

Abbildung 4.2: Alle untersuchten Subgenotyp 1b-Aminosäuresequenzen dargestellt gegenüber der Konsensussequenz („cons 1b“)

4.4 Mutationsanalyse zum virologischen Therapieerfolg

Diese Auswertung basiert auf der Zuordnung der Patienten nach dem virologischen Ansprechen auf die Gabe von Interferon-alfa 2a/Ribavirin zum Ende der Therapie bzw. des Beobachtungszeitraums (48 Wochen Therapie zuzüglich 24 Wochen Follow-up). Berücksichtigt wurden die Gruppen Sustained virologic Response (SVR), End-of-Treatment Response (ETR) und Nonresponse (NR) sowie die Einteilung des Genotyps. Dabei kamen die Daten der 73 Patienten zur Auswertung, die therapiegemäß entsprechend dem Studienprotokoll abgeschlossen hatten.

4.4.1 Korrelation lokaler und globaler Sequenzheterogenität anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens

Die Mutationen wurden im Vergleich zur jeweiligen Konsensussequenz der Genotypen („cons 1a“ und „cons 1b“) ermittelt (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Es folgte eine allgemeine Analyse der globalen Mutationsfrequenz innerhalb des untersuchten Proteinabschnitts (AS 2303-2393) sowie der Anzahl an Mutationen in der von Sarrazin et al. 2002 ermittelten Region (AS 2350-2370).¹¹⁹

In der aktuellen Patientengruppe zeigte sich bei beiden Untersuchungen keine signifikante Häufung von Mutationen, die mit dem virologischen Therapieansprechen auf die Kombinationstherapie korrelierten (Tabelle 4.4).

p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
gesamte Zahl an Mutationen (SVR vs. ETR und NR)	0.10	0.37
Anzahl an Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (alle 3 Response-Gruppen)	0.73	0.39
Anzahl an Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR und ETR vs. NR)	0.55	0.92
Anzahl an Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR vs. ETR und NR)	0.46	0.34

Tabelle 4.4: Analyse allgemeiner Mutationsanalyse der verschiedenen Response-Gruppen anhand des anhaltenden Therapieansprechens.

4.4.2 Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit anhand des dauerhaften virologischen Therapieansprechens

In der Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit („smoothed mutational frequency“), wurden neben den einzelnen Aminosäurepositionen auch die Mutationen der benachbarten Positionen berücksichtigt, wodurch auch eine lokale Häufung von Variationen angezeigt werden kann. Dabei fanden sich über dem gesamten untersuchten Genabschnitt bei beiden Subtypen signifikant mehr Mutationen innerhalb der betrachteten Region des NS5A (AS 2303-2393) um die V3 Region bei Patienten mit einem Therapieansprechen (SVR und ETR) gegenüber den Nonrespondern.

Dieser Unterschied gegenüber der Konsensussequenz war unter den 1b-Sequenzen etwas geringer ausgeprägt, aber ebenfalls statistisch signifikant (Tabelle 4.5 und Abbildung 4.3) Auch in dieser Untersuchung traten die Unterschiede in der Gruppe der HCV-Genotyp 1a-infizierten Patienten deutlicher hervor, obwohl die Patientenzahl geringer war.

p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Geglättete Mutationshäufigkeit global oder lokal (SVR und ETR vs. NR)	0.03	0.03
Geglättete Mutationshäufigkeit global oder lokal (SVR vs. ETR und NR)	< 0.001	< 0.001
Geglättete Mutationshäufigkeit lokal vs. konstante Unterschiede (SVR und ETR vs. NR)	0.05	0.10
Geglättete Mutationshäufigkeit lokal vs. konstante Unterschiede (SVR vs. ETR und NR)	< 0.001	0.01

Tabelle 4.5: Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit („global oder lokal“ und „lokal vs. konstant“) anhand des anhaltenden Therapieansprechens

Weiter zeigte sich bei den HCV-1a-infizierten Patienten mit einem anhaltenden Therapieansprechen der Fokus einer lokalen Häufung von Sequenzvariationen etwas weiter N-terminal der V3-Region um die Aminosäureposition 2320. Dagegen lieferte die Auswertung der HCV-1b-Sequenzen einen Fokus vermehrter Sequenzvariationen im Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 2350 und 2370 innerhalb der V3-Region (Abbildung 4.3).

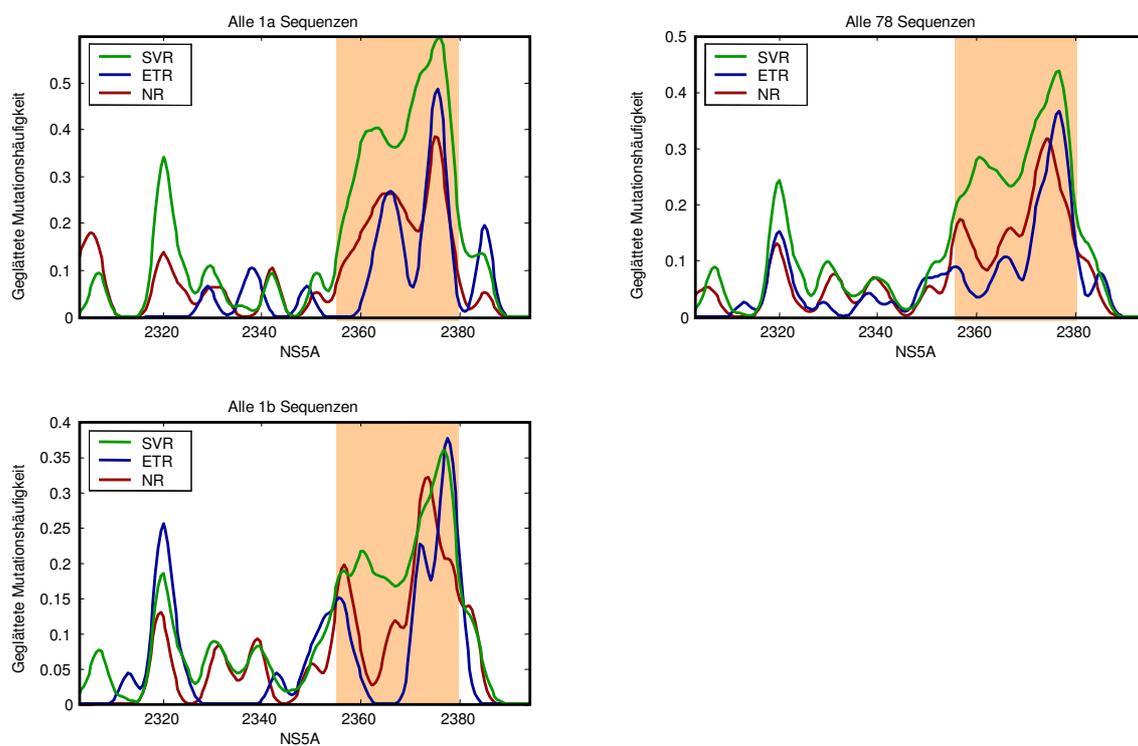


Abbildung 4.3: Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit unter der Berücksichtigung des Therapieerfolges mit SVR vs. ETR/NR und SVR/ETR vs. NR, bei beiden Genotypen.

4.4.3 Allgemeine Mutationsanalyse vorhergesagt verdeckter und oberflächlich liegender Regionen anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens

Diese Auswertung beruht auf der mathematischen Berechnung, dass bestimmte Anteile des NS5A-Proteins aufgrund physiko-chemischer Eigenschaften an der Oberfläche oder verdeckt im Inneren des Proteins gelegen sind. Durch Ladungsanalyse ließen sich die Lokalisationen der untersuchten Bereiche innerhalb des Proteins voraussagen.

Bei der allgemeinen Mutationsanalyse verdeckter und oberflächlich gelegener Regionen des NS5A-Proteins der 73 „per protocol“-analysierten Patienten fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen einem dauerhaft anhaltenden Therapieansprechen (SVR) und einem nicht-dauerhaften Therapieansprechen (ETR und NR) innerhalb der untersuchten Region. Entsprechende Ergebnisse zeigte der Vergleich unter Berücksichtigung verdeckter und oberflächlich liegender Regionen zwischen der Response- und Nonresponse-Gruppe (Tabelle 4.6).

	p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Oberflächlich gelegen	Insgesamte Zahl an Mutationen (alle 3 Response-Gruppen)	0.16	0.50
	Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR und ETR vs. NR)	0.14	0.56
	Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR vs. ETR und NR)	0.07	0.28
Verdeckt gelegen	Insgesamte Zahl an Mutationen (alle 3 Response-Gruppen)	0.36	0.74
	Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR und ETR vs. NR)	0.23	0.53
	Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR vs. ETR und NR)	0.77	0.76
Oberflächlich gelegen	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (alle 3 Response-Gruppen)	0.59	0.42
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR und ETR vs.NR)	0.55	0.73
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR vs. ETR und NR)	0.33	0.29
Verdeckt gelegen	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (alle 3 Response-Gruppen)	0.79	0.40
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR und ETR vs.NR)	0.55	0.94
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR vs. ETR und NR)	0.77	0.58

Tabelle 4.6 Analyse der Mutationen anhand vorhergesagter verdeckter und oberflächlicher Regionen des NS5A

4.4.4 Geglättete Mutationshäufigkeit vorhergesagter verdeckter oder oberflächlich liegender Regionen anhand des dauerhaften virologischen Ansprechens

Eine Auswertung unter Berücksichtigung der geglätteten Mutationshäufigkeit zeigte ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen vorhergesagten oberflächlichen und verdeckten Mutationen (Abbildung 4.4).

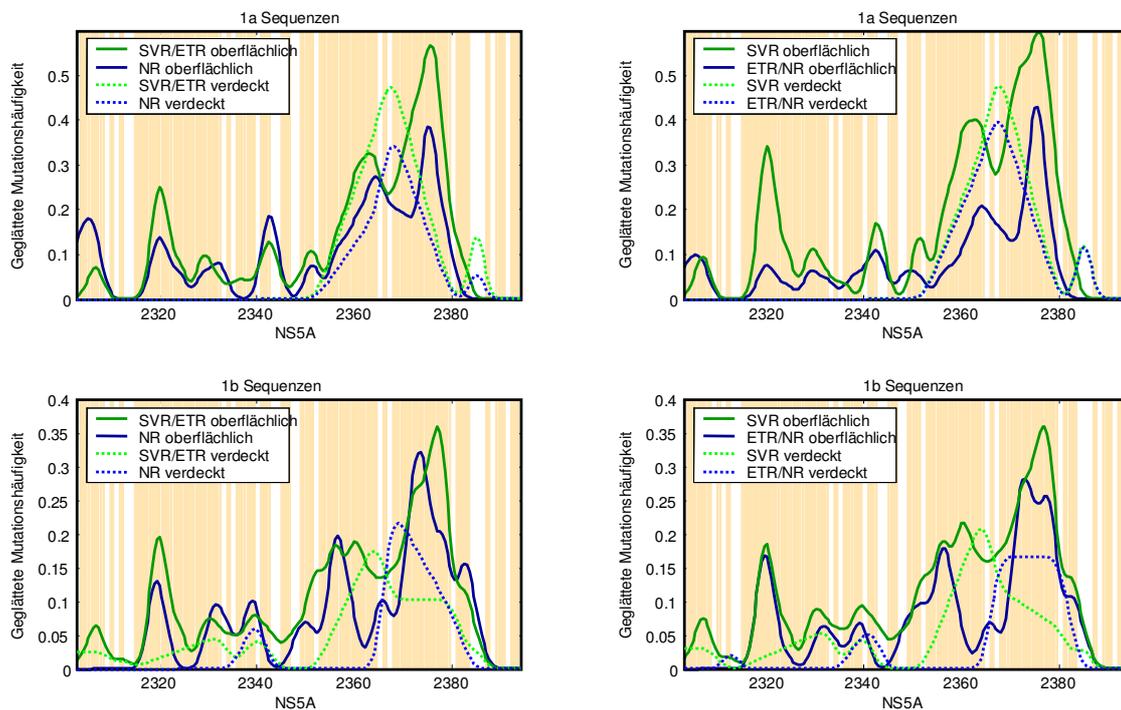


Abbildung 4.4: Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit anhand vorhergesagter oberflächlicher und verdeckter Bereiche des NS5A-Proteins

4.4.5 Konservierte versus nicht-konservierte Mutationen in Bezug auf den Therapieerfolg

Die Untersuchung konservierter und nicht-konservierter Mutationen innerhalb des untersuchten Proteinabschnitts ergaben einen signifikanten Unterschied in der Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit beim Vergleich der Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR) gegenüber den Patienten mit einem End-of-Treatment Response (ETR) und Nonresponse (NR) ($p < 0,001$) (Tabelle 4.7).

p-Werte	1a Sequenzen	1b Sequenzen
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal, konserviert und nicht-konservierte AS (SVR und ETR vs. NR)	0.35	0.15
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal, konserviert und nicht-konservierte AS (SVR vs. ETR und NR)	< 0.001	< 0.001
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstante Unterschiede, konserviert und nicht-konservierte AS (SVR und ETR vs. NR)	0.67	0.20
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstante Unterschiede, konserviert und nicht-konservierte AS (SVR vs. ETR und NR)	< 0.001	< 0.001

Tabelle 4.7: Geglättete Mutationshäufigkeits-Analyse im Vergleich konservierte gegenüber nicht-konservierter Aminosäuren

Die Untersuchungen der allgemeinen Mutationsrate erbrachten unter der Berücksichtigung konservierter und nicht-konservierter Aminosäuremutationen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied innerhalb der verglichenen Patientengruppen. Dies zeigte sich sowohl für den gesamten untersuchten Abschnitt, als auch für den in den Voranalysen hervorstechenden Proteinbereich zwischen den Aminosäuren 2350-2370. (Tabelle 4.8)

p-Werte	1a Sequenzen	1b Sequenzen
Insgesamte Zahl an Mutationen (alle 3 Response-Gruppen)	0.42	0.17
Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR and ETR vs. NR)	0.35	0.29
Insgesamte Zahl an Mutationen (SVR vs. ETR und NR)	0.23	0.07
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (alle 3 Response-Gruppen)	0.86	0.71
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR und ETR vs. NR)	0.74	0.96
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (SVR vs. ETR und NR)	1.00	0.65

Tabelle 4.8: Allgemeine Mutationsanalyse im Vergleich konservierte gegenüber nicht-konservierter Aminosäuren

4.5 Analyse entsprechend des initialen Therapieansprechens nach vier Wochen Kombinationstherapie

4.5.1 Korrelation lokaler und globaler Heterogenität anhand des initialen Therapieansprechens

Diese Auswertung wurde an 78 Patientensequenzen durchgeführt, die zu diesem Zeitpunkt gemäß dem Studienprotokoll therapiert wurden.

Die Häufung der Sequenzvariationen wurde dabei anhand der Einteilung entsprechend des initialen Therapieansprechens nach vier Wochen Kombinationstherapie durchgeführt. Die verschiedenen initialen Patientengruppen wurden unter Berücksichtigung der Subtypen verglichen. Dabei wurde die gesamte Zahl an Mutationen innerhalb des sequenzierten NS5A-Fragments (AS 2309-2393) untersucht.

In einer weiteren Auswertung wurde der von Sarrarzin et al. beschriebene Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 2350 und 2370 genauer untersucht. Bei beiden Untersuchungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Patientengruppen. (Tabelle 4.9)

p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Insgesamte Zahl an Mutationen (AS 2303-2393) (RVR vs. SPR vs. FPR/NUR)	0.87	0.96
Insgesamte Zahl an Mutationen (AS 2303-2393) (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.40	0.96
Insgesamte Zahl an Mutationen (AS 2303-2393) (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.26	0.85
Insgesamte Zahl an Mutationen (AS 2303-2393) (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.70	0.82
Insgesamte Zahl an Mutationen (AS 2303-2393) (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	1.00	0.82
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350-2370 (RVR vs. SPR vs. FPR/NUR)	0.69	0.35
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350-2370 (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.74	0.63
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350-2370 (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.37	0.63
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350-2370 (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.47	0.88
Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350-2370 (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	1.00	0.79

Tabelle 4.9: Auswertung der allgemeinen Mutationshäufigkeit zwischen AS 2303-2393 und AS 2350-2370 anhand des initialen Therapieansprechens

4.5.2 Geglättete Mutationshäufigkeits-Analyse anhand des initialen Therapieansprechens

Durch Anwendung des oben beschriebenen spezifischen Testsystems konnte gezeigt werden, dass HCV-Genotyp-1a-infizierte Patienten mit schnellem („rapid“), langsamem („slow“) und flachem („flat“) Abfall der Viruslast („viral Response“) in den ersten vier Therapiewochen signifikant höhere geglättete Mutationshäufigkeiten innerhalb des untersuchten Bereiches im Vergleich zu Patienten mit einem Nichtansprechen („Nullresponse“) aufwiesen (jeweils $p < 0.001$).

In der Auswertung der Gruppe HCV-Genotyp 1b-infizierter Patienten konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Tabelle 4.10; Abbildung 4.5).

p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	< 0.001	0.86
Geglättete Mutationshäufigkeit lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	< 0.001	0.81
Geglättete Mutationshäufigkeit global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.93	0.24
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.91	0.26
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.65	0.70
Geglättete Mutationshäufigkeit lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.80	0.62

Tabelle 4.10: Analyse der geglättete Mutationshäufigkeit des initialen Ansprechens

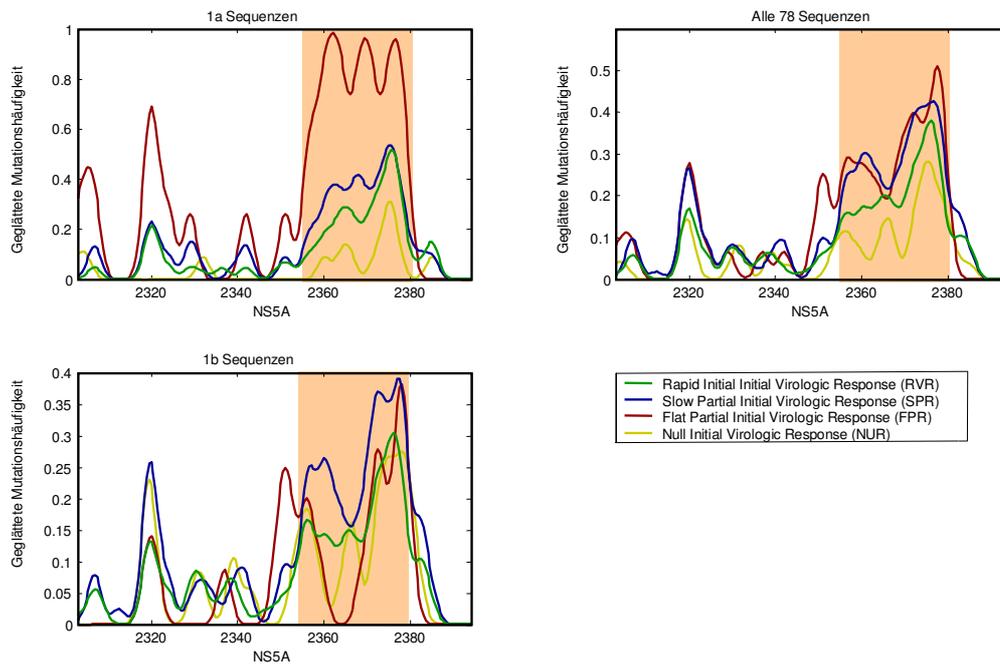


Abbildung 4.5: Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit anhand des initialen Therapieansprechens unter Berücksichtigung des Genotyps

4.5.3 Mutationsanalyse vorhergesagt verdeckter und oberflächlich gelegener Regionen anhand des initialen Therapieansprechens

Die Auswertung aller Daten zu den 78 Sequenzen des frühen Therapieansprechens nach vier Wochen Kombinationstherapie zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Mutationsanalyse vorhergesagter verdeckter und oberflächlich liegender Bereiche des NS5A-Proteins. Dieses Ergebnis fand sich sowohl bei der Untersuchung allgemeiner Mutationen als auch bei der geglätteten Mutationsanalyse für den bei Sarrazin et al. vorgeschriebenen Bereich zwischen den Aminosäureposition 2350 und 2370. (Abbildung 4.6; Tabelle 4.11; Tabelle 4.12).¹¹⁹

	p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Oberflächlich gelegen	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR vs. FPR/NUR)	0.91	0.91
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.46	0.88
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.26	0.83
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.70	0.97
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	0.92	0.72
Verdeckt gelegen	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR vs. FPR/NUR)	0.40	0.84
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.11	0.54
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.08	0.35
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.28	0.61
	Insgesamte Zahl an Mutationen zwischen AS 2309 und 2393 (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	0.97	0.90

Tabelle 4.11: Mutationsanalyse vorhergesagter verdeckter und oberflächlich gelegener Regionen innerhalb des untersuchten NS5A-Fragmentes (AS 2303-2393)

	p-Werte	1a Seq.	1b Seq.
Oberflächlich gelegen	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.62	0.42
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.81	0.94
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.70	0.81
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	0.56	0.22
Verdeckt gelegen	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR vs. SPR vs. FPR/NUR)	0.48	0.99
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR vs. SPR/FPR vs. NUR)	0.12	0.71
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.15	0.58
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.52	0.97
	Anzahl von Mutationen zwischen AS 2350 und 2370 (RVR vs. SPR/FPR/NUR)	0.76	0.93

Tabelle 4.12: Mutationsanalyse vorhergesagter verdeckter und oberflächlich gelegener Regionen anhand des aus Sarrazin et al. ermittelten Fokus (AS 2303-2393)¹¹⁹

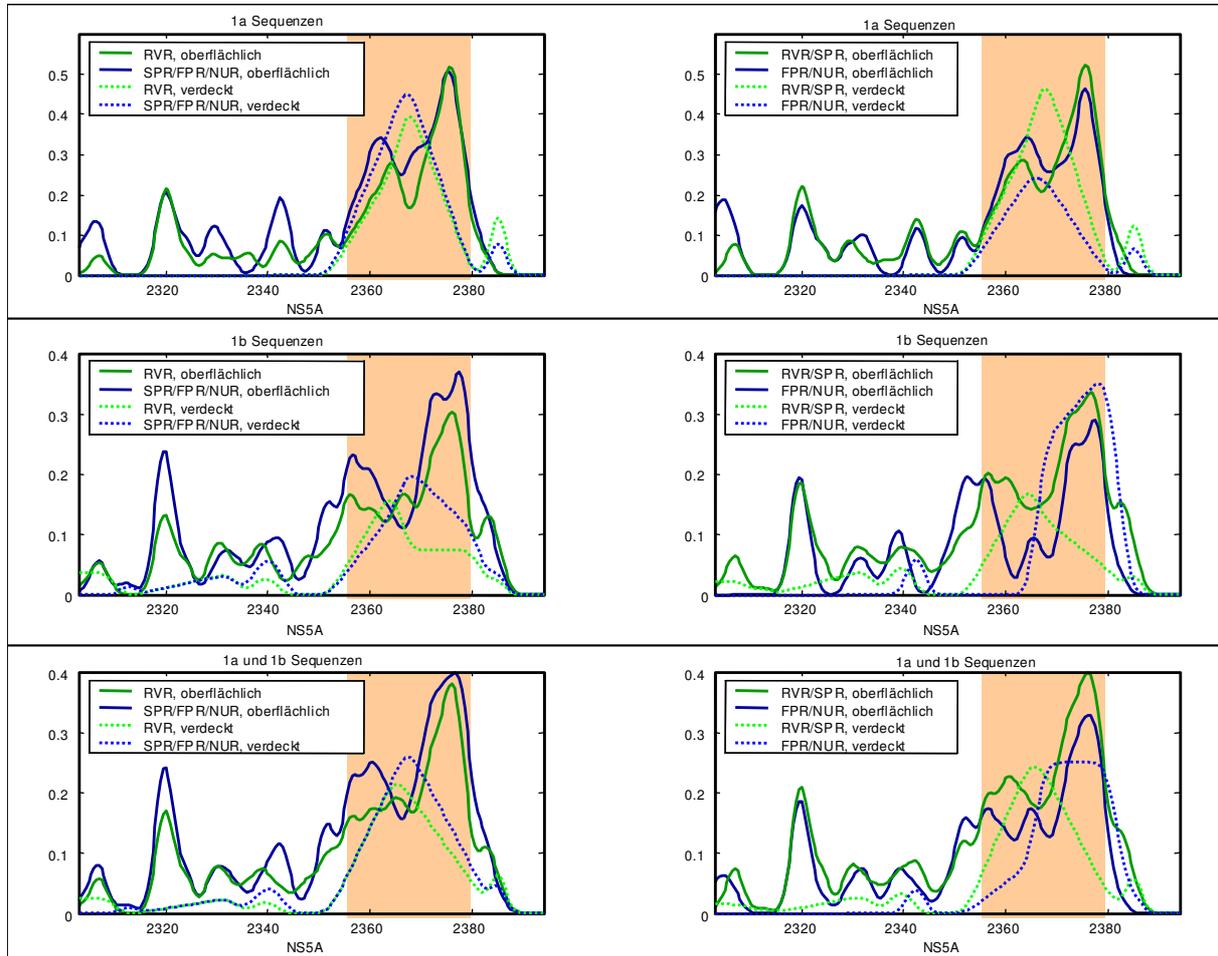


Abbildung 4.6: Mutationsanalyse vorhergesagter verdeckter und oberflächlich gelegenen Regionen des NS5A-Proteins der initialen Klassifikation

4.5.4 Analyse der geglätteten Mutationshäufigkeit konservierter gegenüber nicht-konservierter AS-Mutationen anhand des initialen Therapieansprechens

Bei der Untersuchung konservierter und nicht-konservierter Bereiche des NS5A zeigte sich unter den 1a-Sequenzen der initialen Klassifizierung eine signifikante Korrelation zwischen der Mutationshäufigkeit nicht-konservierter Aminosäuremutationen und den Patienten mit einem schnellen („rapid“), langsamen („slow“) und flachen („flat“) Abfall der Viruslast in den ersten vier Wochen Kombinationstherapie gegenüber den Patienten ohne ein Therapieansprechen (Nullresponder; $p < 0.001$). Unter den 1b-Sequenzen konnte dieser Nachweis nicht erbracht werden (Abbildung 4.9).

p-Werte	1a Sequenzen	1b Sequenzen
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	< 0.001	0.71
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.05	0.60
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.78	0.19
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.87	0.14
Geglättete Mutationshäufigkeit: global oder lokal (RVR/SPR/FPR vs. NUR)	0.31	0.76
Geglättete Mutationshäufigkeit: lokal vs. konstant (RVR/SPR vs. FPR/NUR)	0.48	0.66

Tabelle 4.13: Untersuchung konservierter Mutationen nach dem initialen Therapieansprechen mit einem Vergleich der Gruppen untereinander

4.6 Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der Sequenzen

Diese Untersuchung beruht auf der mathematischen Grundlage einer phylogenetischen Stammbaumanalyse. Dabei wurde die Vermutung überprüft, ob Patienten mit einem ähnlichen Ansprechen auf die Kombinationstherapie auch eng verwandte Sequenzen besitzen.

Die Analyse erfolgte sowohl an den Basensequenzen als auch an den Aminosäuresequenzen der 78 untersuchten Patienten unter Berücksichtigung beider Genotyp-Subgruppen (1a und 1b).

Die phylogenetische Auswertung der Basensequenzen zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen eng verwandten Sequenzen und dem endgültigen Therapieansprechen der HCV-Genotyp 1a- und 1b-infizierten Patienten. Auch die Analyse der phylogenetischen Stammbäume auf Grundlage der Aminosäuresequenzen zeigte keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und phylogenetischer Herkunft der Aminosäuresequenzen beider Subtypen. Vereinzelt konnten in den Auswertungen Clusterbildungen mit einer Korrelation zwischen phylogenetischer Herkunft und Therapieansprechen verzeichnet werden (siehe Markierungen in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8).

Die Darstellung wird exemplarisch am phylogenetischen Baum der HCV Genotyp1a-Basenpaar-Sequenzen und der HCV-Genotyp 1b-Aminosäure-Sequenzen gezeigt (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8).

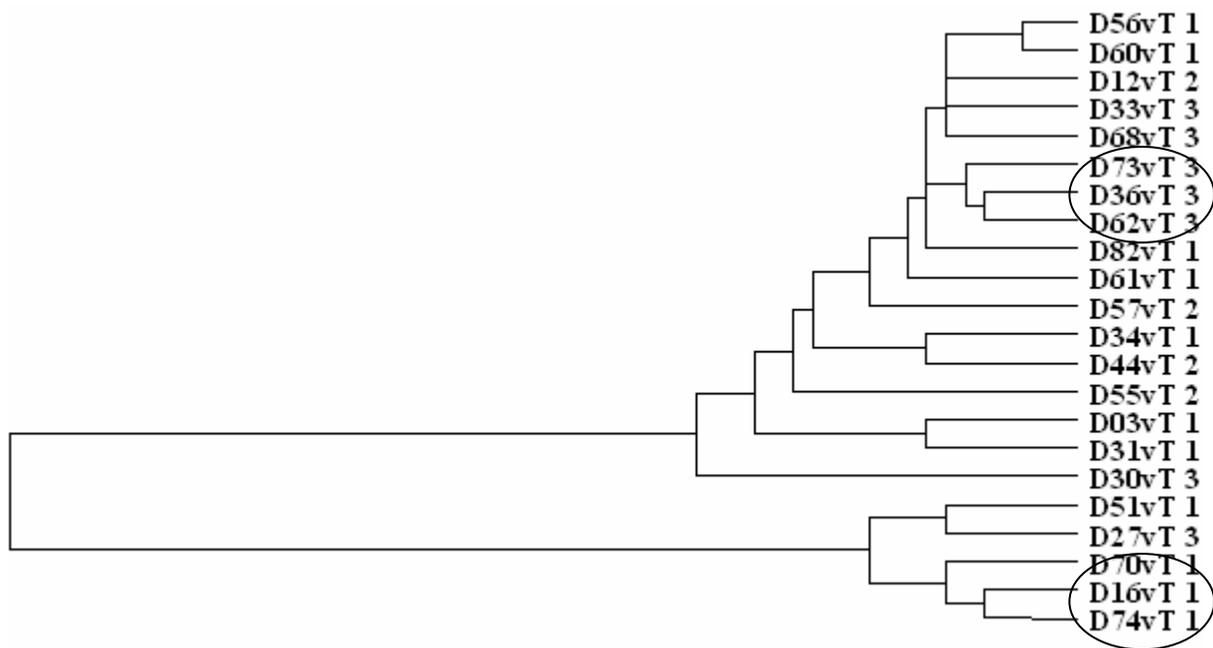


Abbildung 4.7: Phylogenetischer Baum erstellt aus den Basenpaar-Sequenzen der Gruppe der HCV Genotyp 1a-infizierten Patienten, markiert sind einzelne Clusterbildungen

Erklärung zur Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8:

D=DITTO-Studienpatient; vT= vor Therapie;

1= sustained Response; 2= Relapse; 3= Nonresponse

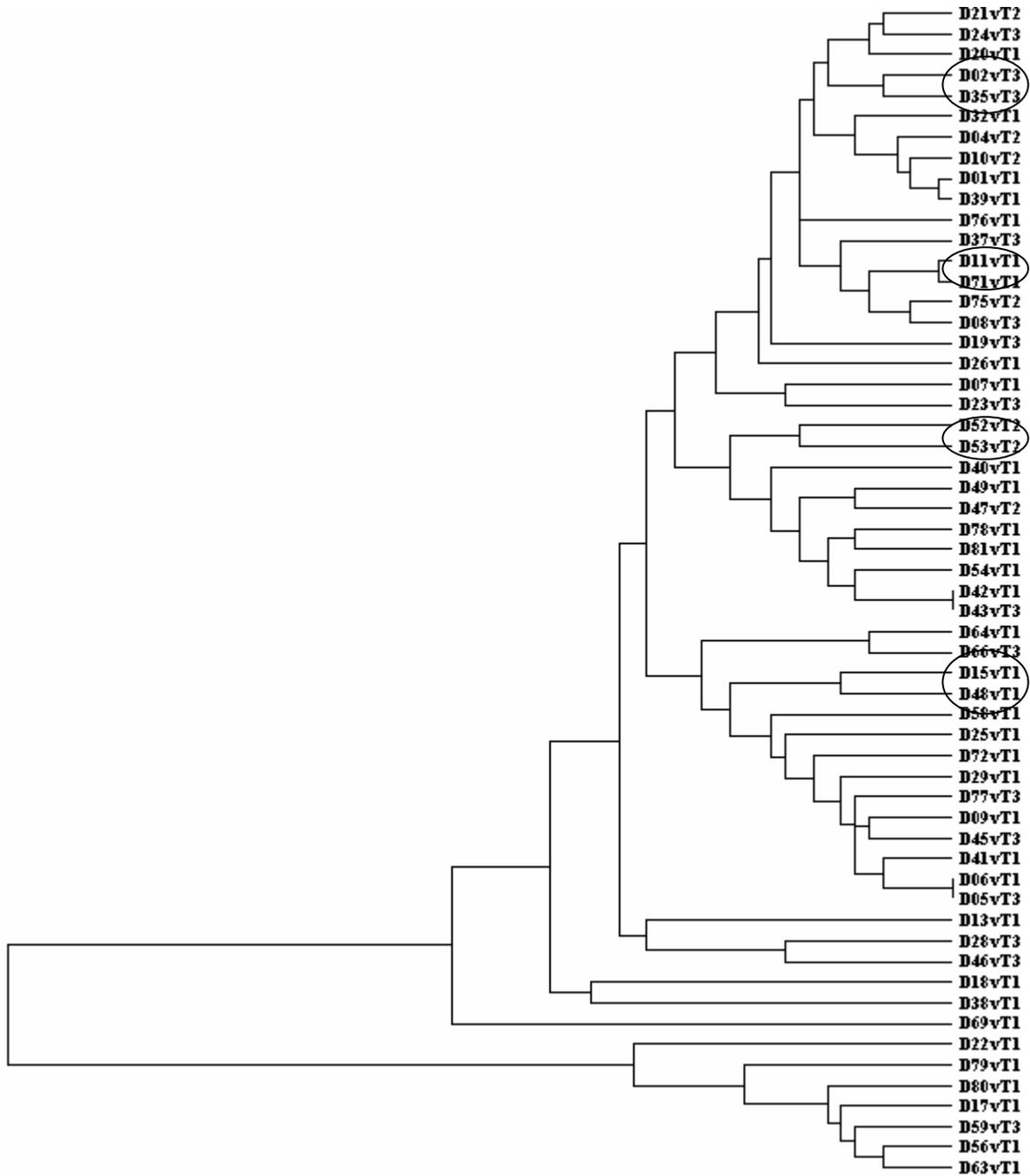


Abbildung 4.8: Phylogenetischer Baum erstellt aus den Aminosäure-Sequenzen der Gruppe der HCV-Genotyp 1b-infizierten Patienten

4.7 Ergebnisse der HCV-Quasispeziesentwicklung unter Therapie

4.7.1 Auswertung der Variantenentwicklung

Bei elf Patienten des untersuchten Kollektivs wurden zusätzlich zur Untersuchung der HCV-NS5A-Direktsequenz noch jeweils 20 durch Klonierung ermittelte Variantensequenzen vor und nach zwei Wochen Kombinationstherapie analysiert. Durch Auswertung der Sequenzen aller Quasispezies-Varianten eines Patienten konnte somit ein Vergleich zwischen der Population jeweils vor und nach zwei Wochen Kombinationstherapie erstellt werden. Identische Sequenzen wurden zur gleichen Variante gruppiert, anschließend gezählt und unter einander verglichen.

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Varianten vor bzw. nach zwei Wochen Kombinationstherapie und dem endgültigen Therapieansprechen. Es scheint aber tendenziell eine hohe Heterogenität in der Gruppe der Patienten mit einem Therapieansprechen nach einer Interferontherapie zu geben. Unterschiede zwischen den beiden Subtypen wurden nicht festgestellt (Tabelle 4.14).

Patient	Genotyp	End-Point ITT	Variantenzahl		Hamming Distanz		Shannon Entropie	
			Vor Therapie	Nach 2 Th.-Wo.	Vor Therapie	Nach 2 Th.-Wo.	Vor Therapie	Nach 2 Th.-Wo.
D05	1b	NR	5	11	1.396	1.608	0.272	0.626
D73	1a	NR	9	12	1.493	1.608	0.487	0.649
D27	1a	NR	15	15	2.717	2.677	0.793	0.793
D36	1a	NR	9	5	1.465	0.727	0.452	0.301
D43	1b	NR	9	8	1.482	0.761	0.487	0.393
D47	1b	REL	2	8	0.109	1.556	0.016	0.488
D55	1a	REL	10	11	3.410	6.831	0.588	0.669
D57	1a	REL	17	12	3.141	7.363	0.857	0.756
D12	1a	REL	7	12	0.915	3.741	0.432	0.724
D69	1b	SVR	5	10	1.350	1.768	0.491	0.580
D76	1b	SVR	5	6	0.543	0.978	0.210	0.333

Tabelle 4.14: Quasispezies-Variantenentwicklung unter Therapie sowie Hamming-Distanz und Shannon-Entropie

4.7.2 Berechnung der Hamming-Distanz und Shannon-Entropie

Aus den ermittelten Daten der Quasispezies-Sequenzen wurden zusätzlich die Hamming-Distanz und die Shannon-Entropie errechnet. Beide sind indirekte Marker für den selektiven Druck durch das Immunsystem oder die indirekte Interferonwirkung auf die HCV-Quasispezies.

Die Berechnungen der Parameter an allen vorliegenden Virus-Isolaten ergaben einen Anstieg beider Größen nach zwei Wochen Kombinationstherapie ohne statistische Signifikanz. Der p-Wert für die Shannon-Entropie betrug 0.09 und für die Hamming-Distanz 0.07.

Offensichtlich zeigt sich eine gesteigerte Variabilität innerhalb des untersuchten NS5A-Sequenzabschnittes der HCV-Quasispezies in den ersten beiden Therapiewochen.

Auffällig ist dabei die Abhängigkeit der Differenz von den Responseklassen. Wendet man den Kruskal-Wallis Test auf alle drei Klassen an (SVR, ETR, NR), so erhält man bei der Hamming-Distanz einen signifikanten Unterschied ($p=0.014$).

4.7.3 Aufstellung der Quasispezies-Varianten

In einer weiteren Untersuchung wurden die Quasispezies anhand ihrer Aminosäuresequenz analysiert. Dazu wurde eine Aufstellung der 40 Aminosäuresequenzen (je 20 Sequenzen vor und nach zwei Wochen Kombinationstherapie) der elf hierzu untersuchten Patienten erstellt. Eine untereinander ausgerichtete Zusammenstellung erlaubte die Untersuchung auf Gruppenzusammengehörigkeit. Die Variante mit dem häufigsten Vorkommen wurde als Majorvariante bezeichnet. Alle weiteren Sequenzen wurden gegen die Majorvariante verglichen und entsprechend ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz geordnet.

Bei der Analyse wurde besonders der Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 2350 und 2370 für den Genotyp 1b, sowie aufgrund der Daten der Mutationsanalyse der Bereich um die Aminosäurepositionen 2320 für den Subtyp 1a betrachtet.

Insgesamt zeigte sich für alle Majorvarianten eine unveränderte Entwicklung unter der Interferontherapie. Nur in wenigen Fällen zeigte sich nach zwei Wochen Therapie eine Zunahme der Majorvariante. Unterschiede in Bezug auf das endgültige Therapieansprechen konnten in beiden Gruppen nicht gezeigt werden.

Bei der Betrachtung der Aminosäuresequenzen aller zur Subpopulation 1a gehörenden Quasispezies-Varianten konnte um die Aminosäureposition 2320 keine erhöhte Mutationshäufigkeit zu beiden Therapiezeitpunkten festgestellt werden. Bei vier von sechs Patienten innerhalb dieser Gruppe ließen sich unabhängig vom Therapieansprechen eine erhöhte Häufigkeit einzelner Mutationen im Bereich der Aminosäurepositionen 2350 bis 2370 dokumentieren.

Die Betrachtung der Quasispeziesvarianten-Sequenzen der Genotyp-1b-Gruppe zeigte eine von der Therapie unabhängige Häufung einzelner Aminosäuremutationen im vorbeschriebenen Bereich (AS 2350-2370).

Das Beispiel in Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch die Aufstellung der 40 Quasispezies-Sequenzen eines HCV-Genotyp-1a-infizierten Patienten (D57) jeweils vor und nach zwei Wochen Kombinationstherapie. Die Majorvariante ist in der ersten Zeile abgebildet. Alle identischen Aminosäuren gegenüber der Majorvariante sind mit einem Punkt dargestellt. Abweichungen werden durch die Abkürzung der Aminosäure hervorgehoben (siehe Tabelle 3.16). Dies erlaubt eine einfache Darstellung der Unterschiede gegenüber der Majorvariante.

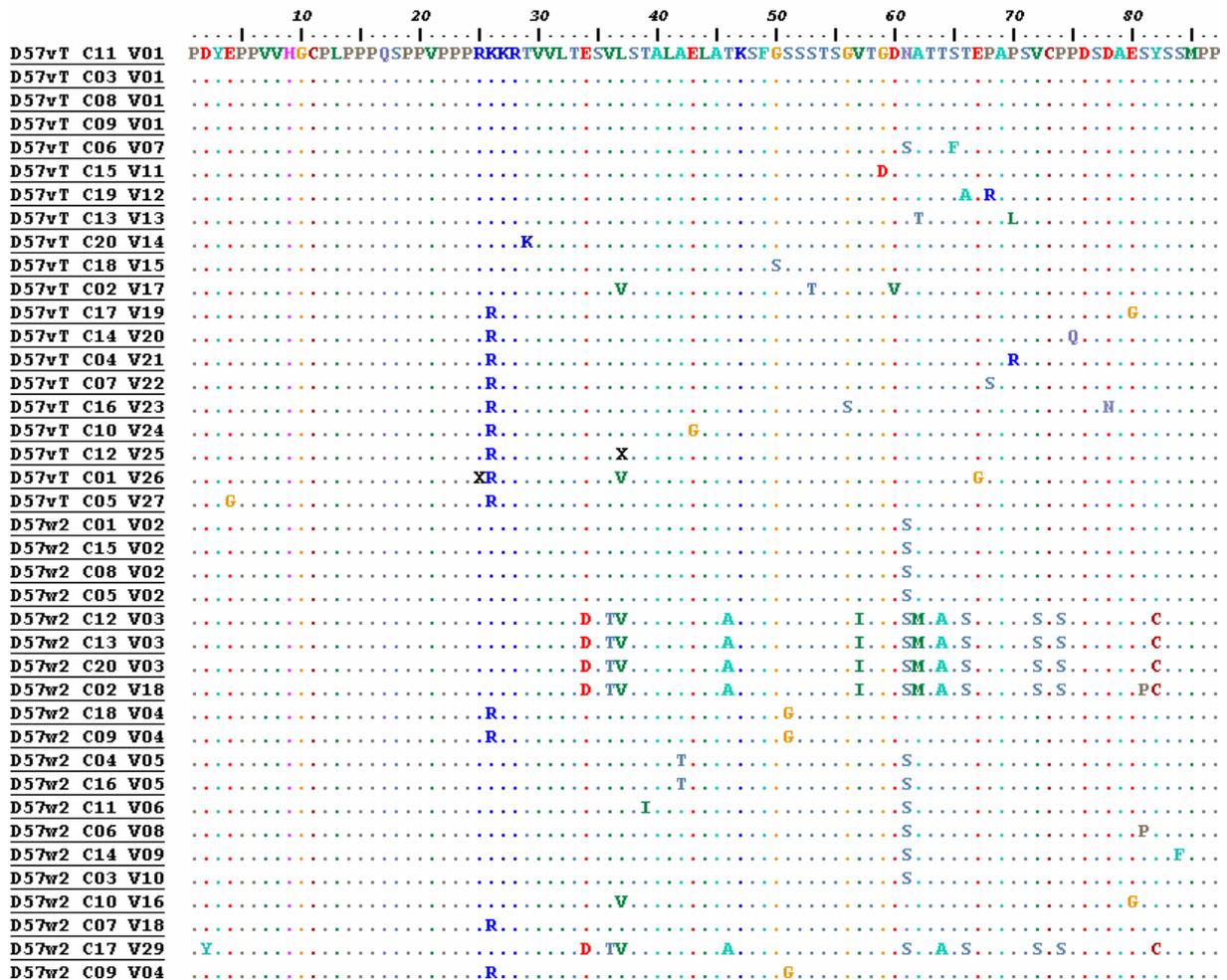


Abbildung 4.9: Aufstellung aller durch Klonierung gewonnenen Quasispezies-Varianten-Sequenzen (Länge:92AS) eines Patienten (D57) vor und nach zwei Wochen Therapie

Erklärung zur Abbildung 4.9:

D= DITTO-Studien-Nummer des Patienten, **vT**=vor Therapie, **w2**=nach 2 Wochen Therapie, **C**=Klon, **V**=Variante. Die Abkürzungen der AS finden sich unter Tabelle 3.16. Die angegebene AS-Position beschreibt die Position innerhalb des untersuchten Fragmentes. Die Position 1 in der Abbildung entspricht dabei der AS-Position 2303 des HCV-Genoms.

5 Diskussion

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit ca. 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert.¹ Bei 20-30% der chronisch HCV infizierten Patienten besteht das Risiko einer Leberzirrhose.⁵⁰ Weitere 20% dieser Zirrhose-Patienten leben mit der Gefahr ein primäres hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu entwickeln.¹⁵⁴ Bislang steht keine Impfung gegen die Virusinfektion zur Verfügung. Bei einer Chronifizierungsrate von 55-85% steht neben der Prävention die medikamentöse Therapie chronisch infizierter Patienten im Vordergrund.⁵²

Die aktuelle Therapie der chronischen Hepatitis C Virus-Infektion besteht in einer Kombination aus pegyliertem Interferon- α und Ribavirin über 24-48 Wochen. Unter dieser Standardtherapie können heute 54-63% der Patienten dauerhaft geheilt werden. Allgemein akzeptierte Prognoseparameter des Ansprechens auf eine Interferontherapie sind Alter des Patienten, Geschlecht, Viruslast vor Therapiebeginn, Fibrosegrad und als stärkster Faktor der HCV-Genotyp.^{33,78}

Auffällig in der antiviralen Therapie mit Interferon und Ribavirin sind die unterschiedlichen Ansprechraten der einzelnen Genotypen. Dabei erreichen mehr als 80% der Hepatitis C Virus-Genotyp 2- und 3-infizierten Patienten eine anhaltende Viruselimination, Patienten mit einer Genotyp-1-Infektion aber nur in 33-52% der Fälle.^{44,78} Dies legt die Vermutung nahe, dass virale Eigenschaften eine entscheidende Rolle in Bezug auf das Therapieversagen spielen.

Die genauen Ursachen des Ansprechens bzw. Nichtansprechens auf die Therapie konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Diskutiert werden neben wirtseigenen Faktoren, Resistenzmechanismen des Virus selbst, die im Zusammenhang mit der Interferontherapie stehen.

Bereits im Rahmen einer akuten HCV-Infektion kommt es durch Aktivierung komplexer Signalwege zur körpereigenen Interferonproduktion und einer damit verbundenen Abwehrhaltung gegenüber dem Virus. Mitgetragen wird diese Initiierung durch Viruspartikel, die ein so genanntes PAMP-Erkennungsmuster („pathogen-associated molecular pattern“) besitzen. Für die HCV-RNA konnte bereits ein solches Muster nachgewiesen werden. Über die Aktivierung des PAMP-induzierten Signalwegs kommt es im weiteren Verlauf über die Expression antiviraler Effektorgene und zellulärer

Transkriptionsfaktoren zur Interferonsekretion und damit zur Aktivierung des Jak-STAT-Pathways. In der weiteren Abfolge schließt sich die Phosphorylierung von Signaltransduktions- und Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT 1, STAT2, IRF9, etc.) an.³⁶ Der dabei gebildete „IFN-stimulated gene factor-3-Transkriptionskomplex“ bindet an die Promotorregion so genannter „IFN-stimulated genes“ (ISGs).¹⁸ Die verschiedenen Genprodukte dieser ISGs führen zur Hemmung der viralen Replikation und Transkription. Dazu gehören neben weiteren die 2',5'Oligoadenylatsynthetase (2',5'OAS), der „Interferon stimulated regulatory factor 7“ (IRF 7) und die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (PKR). Interaktionen viraler Proteine mit diesen Faktoren wurden bereits vielfach mit der Interferonresistenz in Verbindung gebracht.³⁶

Seit Enomoto 1995 zum ersten Mal eine Korrelation zwischen Mutationen innerhalb des NS5A-Proteins des Hepatitis C Virus und der Interferonresistenz beobachtete, steht dieses Protein im Fokus zahlreicher Untersuchungen.^{24,25}

Damals zeigte sich, dass japanische HCV-Genotyp-1b-infizierte Patienten die innerhalb der beschriebenen Region mehr als vier Mutationen im Vergleich zur HCV-J-Prototypsequenz aufweisen, eine größere Chance auf ein dauerhaftes Ansprechen auf IFN zeigen. Diese Region von Position 2209 bis 2248 im NS5A-Protein des HCV-J wurde als „Interferon sensitivity determining region“ (ISDR) bezeichnet. In den nachfolgenden Jahren schlossen sich zahlreiche Untersuchungen japanischer und europäischer Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Ergebnissen an. Dabei bestätigen Studien aus Japan die Wichtigkeit von Mutationen innerhalb der ISDR bei HCV-1b-infizierten Patienten, wohingegen Studien aus westlichen Ländern keine oder nur niedrige Mutationshäufigkeiten innerhalb der ISDR bei HCV-1b-Patienten mit dauerhaftem Ansprechen unter Interferon zeigen konnten.^{56,102,116,130,158}

Resultate aus Metaanalysen und Daten aus Studien größerer Patientenkollektive bestätigten wiederum eine Assoziation zwischen Mutationen innerhalb der ISDR und dem Therapieansprechen. Die meisten Patienten dieser Studien zeigten aber eine geringe Anzahl an Mutationen innerhalb der ISDR, so dass das Ansprechen dieser Patienten gegenüber der Interferontherapie nicht überzeugend durch die ISDR-Hypothese erklärt werden kann.^{98,115,116}

Im Zuge weiterer Untersuchungen konnte die so genannte ISDR als Teilregion einer PKR-bindenden Domäne identifiziert werden. Durch Interaktion dieser Domäne und der im Verlauf des Interferon-Pathways aktivierten RNA-abhängige Proteinkinase

(PKR) wird eine Hemmung der Interferonwirkung vermutet.³⁸

Mutationsanalysen des kompletten NS5A-Gens konnten weitere Bereiche vermehrter Aminosäuremutationen innerhalb des NS5A-Proteins aufdecken, die einen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen zeigten. Dabei fand sich im carboxyterminalen Ende des NS5A ein Abschnitt, der bereits als variable Region 3 (V3) beschrieben wurde.^{15,90}

In mehreren Studien konnte eine erhöhte Variabilität in diesem Proteinbereich bei Patienten mit einem Therapieansprechen (Responder) gegenüber Patienten ohne Therapieansprechen (Nonresponder) gezeigt werden. Eine Studie aus Frankreich zeigte beispielsweise, dass die V3-Region untersuchter HCV-1b-Seren europäischer Patienten signifikante Unterschiede zwischen einem dauerhaft anhaltenden Therapieansprechen (SVR) und einem Nichtansprechen (NR) aufweisen, wobei keine Zusammenhänge mit der ISDR nachgewiesen werden konnten.²⁰

Im Jahr 2002 zeigte eine Untersuchung von Sarrazin et al. an 45 chronisch HCV-1b-infizierten Patienten signifikante Häufungen an Aminosäuremutationen in der Analyse des kompletten NS5A-Gens, die mit dem Therapieansprechen korrelierten. Die Mutationsanalysen wurden dabei durch die Auswertung funktioneller und konformatorischer Eigenschaften der Aminosäure-Austausche unter der Anwendung eines neu entwickelten mathematischen Modells unterstützt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an Mutationen innerhalb des NS5A und dem Therapieansprechen. Für die vorbeschriebenen Bereiche ISDR, PKR und angrenzende Bereiche der V3-Region des NS5A fand sich allerdings keine Korrelation mit dem Therapieansprechen. Es zeigte sich aber ein neuer Bereich zwischen den Aminosäuren an Position 2350 bis 2370 unter Einbeziehung der V3-Region, der einen Zusammenhang zwischen erhöhter Mutationsfrequenz und dem dauerhaften Therapieansprechen aufwies. Die Patienten dieser Untersuchung hatten unterschiedliche Therapieschemata inklusive Interferon-Hochdosis und Interferon-Monotherapie erhalten.¹¹⁹

In der vorliegenden Arbeit wurde die neu beschriebene Region am C-terminalen Ende des NS5A-Proteins genauer untersucht. Zur prospektiven Evaluation der vorangegangenen Ergebnisse wurde in dieser Arbeit ein homogenes Patientenkollektiv aus 82 Hepatitis C Virus Genotyp-1-infizierten Patienten (Genotyp 1a und 1b) unter einer Therapie mit Peginterferon- α 2a (180 μ g/Woche) und Ribavirin (1000-1200mg/Tag) im Rahmen einer multizentrischen Studie untersucht. Aufgrund der

Daten der vorangegangenen Arbeit beinhaltete die aktuelle Untersuchung gezielt die vorbeschriebene Region (AS 2350 bis AS 2370) des NS5A.¹¹⁹ Der untersuchte Bereich umfasst außerdem eine SH3-bindende Domäne, die V3 Region und den aminoterminalen Teil der strukturell beschriebenen Domäne III des NS5A.^{20,24,74,83,133,134}

Die Patienten wurden nach vier Wochen Kombinationstherapie anhand ihres initialen Therapieansprechens durch den Abfall der Viruslast in die Gruppen RVR („Rapid Viral Response“; schneller Abfall der Viruslast), SPR („Slow Partial Response“; langsamer Abfall der Viruslast), FPR („Flat Partial Response“; flacher Abfall der Viruslast) und NUR („Nullresponse“; kein Abfall der Viruslast) eingeteilt.

Eine erneute Einteilung erfolgte zum Ende der Therapie anhand des dauerhaften virologischen Therapieansprechens in die Gruppen SVR („Sustained Virologic Response“; anhaltendes Therapieansprechen), ETR („End-of-Treatment Response“; Ansprechen bis zum Ende der Therapie) und NR („Nonresponse“; kein dauerhaftes Therapieansprechen).

Für den untersuchten NS5A-Abschnitt konnte in der allgemeinen Mutationsanalyse keine Korrelation zwischen der Sequenzheterogenität und dem initialen Therapieansprechen oder dem dauerhaften Therapieerfolg verzeichnet werden. Dabei wurden sowohl die Anzahl aller Mutationen gegenüber den ermittelten Konsensussequenzen als auch eine Gegenüberstellung der einzelnen Patientengruppen berücksichtigt.

Unter Anwendung der geglätteten Mutationsanalyse zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Sequenzheterogenität und Therapieansprechen. Die Betrachtung der Sequenzen von Patienten mit einem dauerhaften virologischen Therapieansprechen (SVR) zeigte gegenüber den Patienten ohne ein dauerhaftes Therapieansprechen (NR und ETR) signifikant höhere Mutationshäufungen über den gesamten untersuchten Abschnitt. Dabei korrelierte das dauerhafte Ansprechen auf die medikamentöse Therapie mit einer gehäuften Zahl an Mutationen bei den Sustained Respondern (SVR) gegenüber den Patienten mit einem End-of-Treatment- (ETR) oder Nonresponse (NR).

Somit konnte eine signifikante Assoziation des dauerhaften virologischen Ansprechens auf die Therapie mit Peginterferon alfa-2a und Ribavirin mit einer erhöhten Mutationsfrequenz im C-terminalen Abschnitt des NS5A übereinstimmend mit den Ergebnissen von Sarrazin et al. beschrieben werden.¹¹⁹ Im Vergleich hierzu traten die

Unterschiede zwischen SVR und ETR/NR in der vorliegenden Arbeit deutlicher hervor. Dies könnte an dem insgesamt besseren virologischen Ansprechen der aktuell untersuchten Patienten auf eine antivirale Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon plus Ribavirin im Vergleich zur Therapie mit Standard-Interferon plus Ribavirin liegen.³³

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der allgemeinen und der geglätteten Mutationsanalyse scheint in der Methode der zuletzt genannten Untersuchung selbst begründet zu liegen. Dabei wird in der allgemeinen Mutationsanalyse die Mutationshäufigkeit für eine bestimmte Position untersucht, wobei es das Modell der geglätteten Mutationshäufigkeit erlaubt, auch bei einer geringen Anzahl an Sequenzen die Mutationshäufigkeiten gegenüber der Konsensussequenz deutlicher hervorzuheben. Durch die Anwendung dieser Methode werden nicht nur einzelne Mutationen bestimmter Sequenzpositionen detektiert, sondern auch die benachbarten Positionen berücksichtigt. Durch Verschieben der über die Sequenz gelegten Gauss'schen Glockenkurve lassen sich mutationsreiche Bereiche stärker hervorheben.

Interessanterweise traten in der aktuellen Untersuchung unter Anwendung der geglätteten Mutationshäufigkeit verschiedene Bereiche gehäufte Mutationen des untersuchten NS5A-Abschnittes deutlich hervor. Bei den HCV Genotyp 1a-infizierten Patienten zeigte sich der Hauptfokus in einer lokalen Häufung von Sequenzvariationen um die Aminosäureposition 2320. Die Auswertung der HCV 1b-Sequenzen bestätigte den bei Sarrazin et al. vorbeschriebenen Fokus vermehrter Sequenzvariationen im Bereich der Aminosäurepositionen 2350 bis 2370.

Weiterhin zeigten sich Unterschiede zwischen den Patienten mit einem dauerhaften virologischen Therapieansprechen (SVR) und den Patienten ohne ein dauerhaftes Ansprechen (ETR und NR) in der Gruppe der HCV-Genotyp-1a-infizierten-Patienten insgesamt ausgeprägter als bei der Gruppe der Genotyp-1b-infizierten Patienten.

Eine Analyse unter Vorhersage der oberflächlich und verdeckt gelegenen Aminosäuren innerhalb des NS5A sollte Aufschluss darüber geben, ob mutationsreiche Abschnitte möglicherweise an der Oberfläche, bzw. in funktionellen Abschnitten des Proteins liegen könnten. Die Lokalisation innerhalb des Proteins ließ sich durch eine Ladungsanalyse der bekannten Aminosäuresequenz vorhersagen.

In der Betrachtung der Gruppen zu beiden Therapiezeitpunkten (initiales und dauerhaftes Therapieansprechen), ließen sich keine signifikanten Unterschiede

zwischen den vorhergesagten oberflächlich oder verdeckt liegenden Bereichen des NS5A sowohl in der allgemeinen Mutationsanalyse als auch in der Untersuchung der geglätteten Mutationshäufigkeit verzeichnen.

Im Anschluss an diese Untersuchung wurde eine Analyse des Proteinabschnitts auf der Suche nach konservierten und nicht konservierten Aminosäureaustauschen vorgenommen. Hintergrund dieser Untersuchung ist die Vorstellung, dass die festgestellten Mutationen zu einem Wechsel der funktionellen Aminosäuregruppen führen könnten. Diese Tatsache wäre mit einer Konformationsänderung oder funktionellen Änderung des Proteins vereinbar. Dabei zeigte sich in dieser Untersuchung ein signifikanter Unterschied der geglätteten Mutationshäufigkeit bei Patienten mit einem dauerhaften Therapieansprechen (SVR) gegenüber den Patienten mit einem Ansprechen bis zum Therapieende (ETR) und ohne Therapieansprechen (NR).

Unter Berücksichtigung der Einteilung des Therapieansprechens innerhalb der ersten vier Wochen zeigte sich bei der Betrachtung konservierter gegenüber nicht-konservierter Aminosäurebereiche des NS5A-Proteins ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Patientengruppen mit einem Abfall der Viruslast (RVR, SVR, FPR) gegenüber den Patienten ohne einen wesentlichen Viruslastabfall (NUR).

Die Untersuchungen der Viruskinetik in den ersten vier Therapiewochen zeigte eine relevante Korrelation der geglätteten Mutationshäufigkeit mit dem initialen und dem anhaltenden virologischen Therapieansprechen. Dabei fand sich auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem schnellen virologischen Ansprechen (RVR) und dem anhaltenden virologischen Ansprechen (SVR). Ein anhaltendes Therapieansprechen (SVR) und ein schneller Abfall der Viruslast (RVR) korrelieren demnach mit einer erhöhten Heterogenität innerhalb des untersuchten Proteinabschnitts. Demgegenüber wiesen statistisch signifikant viele Patienten, die keinen schnellen Virusabfall aufwiesen (FPR, SVR, und NUR), auch keine dauerhafte Viruselimination auf. Somit korreliert ein „nicht-dauerhaftes“ Therapieansprechen (NR und ETR) auch mit einem langsamen Virusabfall bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen bezüglich des Gesamtkollektivs der DITTO-Studie überein.¹⁵⁹

Aufgrund der Bedeutung des NS5A im Rahmen der Hepatitis C Virus-Infektion und der viel diskutierten Beteiligung an der Interferonresistenz wurden die Funktionen des NS5A-Proteins bisher weitreichend untersucht. Als allgemein anerkannt gilt, dass das

Protein als Bestandteil des Replikationskomplexes einen wichtigen Faktor der Virusvermehrung darstellt. Im Bezug auf eine Hepatitis C Virus-Infektion und der Kombinationstherapie mit Interferon konnten mehrere Interaktionsmöglichkeiten funktioneller Abschnitte des NS5A mit zellulären Proteinen gezeigt werden. Diese Mechanismen könnten ein Bindeglied zur Interferonresistenz darstellen.

Neue Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau einzelner Domänen des NS5A-Proteins wurden mittels Oberflächenanalysen gewonnen. Dabei wäre durch Dimerbildung einzelner Domänen des NS5A-Proteins eine Interaktion mit Einzel- oder Doppelstrang-RNA vorstellbar.¹³⁵ Sequenzmutationen innerhalb der Domänen könnten Interaktion mit Ribonukleinsäuren beeinflussen und einen Zusammenhang zur Virusreplikation erklären. Dabei ist ein hemmender, aber auch ein aktivierender Einfluss auf die Virusinfektion denkbar.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich, wie bereits erwähnt, innerhalb des untersuchten NS5A-Abschnittes zwei Bereiche mit einer signifikanten Korrelation zwischen Therapieansprechen und Sequenzheterogenität. Unter den 1a-Sequenzen lag dieser Fokus am carboxyterminalen Ende des NS5A um die Aminosäureposition 2320 und damit innerhalb einer potentiellen SH3-binding Domäne, welche zwischen den Aminosäurepositionen 2321-2327 liegt.¹³² Für diesen hochkonservierten prolinreichen Bereich konnte bisher eine Bindung mit SH3-Domänen (Src-homology 3 Domäne) verschiedener Signalproteine, wie dem Adapterprotein Grb2 und einigen Tyrosinkinase der Src-family, beschrieben werden. Dabei sind diese Proteine häufig Ziel viraler Interaktionen.^{74,133} Wechselwirkungen zwischen dem konservierten prolinreichen Bereich des NS5A und den SH3-Domänen könnten eine wichtige Rolle der Virusinfektion darstellen. Mutationen in diesem Bereich wären demnach in der Lage, über eine verminderte Interaktion zwischen dem NS5A und dem Grb2-Adapterprotein eine erhöhte Apoptoseeignung der infizierten Zellen auszulösen.^{46,106} Dieser Zusammenhang könnte einen Teil zur Erklärung beisteuern, warum bei HCV-infizierten Patienten mit einem anhaltenden Therapieansprechen auf Interferon eine erhöhte Sequenzheterogenität innerhalb dieses Proteinabschnittes vorliegt. Dieser Schluss wäre anhand der vorliegenden Daten allerdings nur für den Genotyp 1a gültig. Der Fokus gehäufte Sequenzvariationen als Ergebnis der geglätteten Mutationsanalyse bei den untersuchten 1b-Sequenzen konnte zwischen den Aminosäuren an Position 2350-2370 ermittelt werden und liegt damit innerhalb der

variablen Region 3 (V3) des NS5A-Proteins. In mehreren Studien mit Standardinterferon konnte für die V3-Region bereits eine erhöhte Variabilität bei Respondern (SVR, ETR) gegenüber Nonrespondern (NR) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit liessen sich diese Ergebnisse bei einem homogenen Patientenkollektiv unter der Kombinationstherapie mit pegyliertem Interferon alfa 2a und Ribavirin bestätigen.

Zusammenfassend liess sich in den vorgelegten Untersuchungen eine Korrelation zwischen der Sequenzheterogenität des untersuchten NS5A-Abschnitts und dem Therapieansprechen bei Hepatitis C Virus-Genotyp 1-Infizierter Patienten bestätigen. Patienten mit einem anhaltenden Therapieansprechen besitzen dabei eine signifikant höhere Sequenzheterogenität innerhalb des untersuchten NS5A-Abschnittes als Patienten ohne ein dauerhaftes Therapieansprechen.

Im Kontext der bisher publizierten Daten lassen sich die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterschiedlich diskutieren. Die Korrelation zwischen allgemeiner Sequenzheterogenität des untersuchten NS5A-Abschnitts und dem Therapieansprechen könnte auf einer veränderten Proteinwirkung, ausgelöst durch die Aminosäuremutationen innerhalb der beschriebenen Bereiche beruhen. Die körpereigenen Interferon-Mechanismen zur Hemmung viraler Proteine könnten ihre Wirkung verstärkt bei strukturell veränderten NS5A-Proteinen zeigen.

Bisher konnten bereits Mutationshäufungen innerhalb SH3-bindender Domänen beschrieben werden, die eine veränderte Interaktion von Interferon-vermittelten Proteinen im Rahmen der Virusreplikation zeigten. Veränderungen der Aminosäuresequenz des NS5A-Proteins wären also in der Lage, zu einem Wegfall hemmender oder aktivierender Funktionen des Proteins zu führen.

Neben den Untersuchungen zur Sequenzheterogenität unter der Interferontherapie wurden in dieser Arbeit auch Veränderungen der HCV-Quasispezies ausgewählter Patienten nach Beginn einer Interferontherapie untersucht.

Aufgrund der fehlenden Proof-reading Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Hepatitis C Virus kommt es zu $1,5-2,0 \times 10^{-3}$ Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr.¹³ Dadurch lassen sich innerhalb eines Patienten unterschiedliche Virusvarianten finden, welche eine 98%-ige Sequenzhomologie aufweisen und als Quasispezies bezeichnet werden. Im Verlauf einer chronischen HCV-Infektion und in klinischen Studien unter einer Interferon-Therapie konnten bereits Sequenzvariationen mit einem kontinuierlichen Wechsel der Quasispeziesverteilung nachgewiesen werden.⁹⁷ Dabei

scheint eine größere Heterogenität der HVR-1-Quasispezies vor IFN- α -Therapie mit einem Nonresponse (NR) zu korrelieren.⁶⁹

Demzufolge sind bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen Quasispeziesentwicklung und Therapieversagen zwei mögliche Ursachen denkbar:

1.) Die Viruspersistenz könnte mit der hohen Komplexität der viralen Population innerhalb eines Patienten zusammenhängen, welche durch das wiederholte Auftreten neuer Virusvarianten unterstützt wird. Damit wäre es eine Konsequenz der viralen Replikation, dass diese neuen Varianten unter den Umgebungsbedingungen einer Interferontherapie überleben können. Eine immunologische Selektion von HCV-escape-Varianten könnte diese Entwicklung beeinflussen.⁵⁹ Das Vermögen durch ständige Veränderungen der Oberflächenstruktur sich dem Immunsystem zu entziehen konnte bereits bei weiteren humanotropen Viren, wie dem HI-Virus, beobachtet werden.

2.) Als weitere Möglichkeit bleibt zu überlegen, ob die Veränderungen der Quasispezies-Zusammensetzung durch den Selektionsdruck der antiviralen Therapie entstehen.

In dieser Arbeit wurde an elf ausgewählten Patienten des untersuchten Kollektivs neben der direkten Sequenzanalyse auch die Quasispeziesentwicklung innerhalb der ersten zwei Wochen Kombinationstherapie untersucht. Die Auswertung der „Hamming Distanz“ und der „Shannon Entropie“, die indirekte Marker für den selektiven Druck des Immunsystems oder der indirekten Interferon-Wirkung darstellen, zeigte in den Berechnungen zur Quasispezies tendenziell einen Anstieg beider Größen. Damit lässt sich eine gesteigerte Sequenzvariabilität für den untersuchten Abschnitt der Quasispezies innerhalb der ersten beiden Therapiewochen verzeichnen. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme früherer Untersuchungen, die ebenfalls die Entstehung einer höheren Sequenzheterogenität innerhalb der ersten beiden Interferon-Therapiewochen beschreiben konnten.²⁸

In früheren Untersuchungen zur Quasispeziesentwicklung und viraler Kinetik zeigte sich trotz raschen Ansprechens auf Interferon durch potentiell Interferon-sensitive Varianten ein Wechsel innerhalb der Quasispezieszusammensetzung meist erst nach mehr als zwei Wochen einer Interferontherapie.¹⁴² Die Amplifikation von Hepatitis C Virus-RNA ist allerdings nach mehr als zwei Therapiewochen bei Respondern nicht mehr möglich. Aufgrund dieser Tatsache wurden für die vorliegende Untersuchung die Daten zum Therapiezeitpunkt nach zwei Wochen herangezogen.

Ziel dieser Arbeit war es, Mutationshäufigkeiten innerhalb eines vorbeschriebenen Bereichs des NS5A-Proteins des Hepatitis C Virus zu suchen, die eine Korrelation zwischen dem Ansprechen bzw. Nicht-Ansprechen auf eine Interferontherapie zeigen. Dies wurde unter Anwendung eines mathematischen Modells realisiert, welches geglättete Mutationshäufigkeiten berechnet. Im Gegensatz zur allgemeinen Mutationsanalyse konnte anhand der geglätteten Mutationshäufung jeweils ein Fokus gehäufte Sequenzvariationen gegenüber der Konsensussequenz bei beiden Subgenotypen (1a und 1b) innerhalb des untersuchten NS5A-Abschnitts festgestellt werden, die mit dem anhaltenden Therapieansprechen auf die Interferontherapie korrelieren.

Erst vor wenigen Jahren konnte durch die Entwicklung des Hepatitis C Virus-Replikons die Replikation des Hepatitis C Virus *in vitro* untersucht und dabei die Funktion viraler Proteine detaillierter beschrieben werden.⁶⁸ Mithilfe des weiterentwickelten Zellkulturmodells könnte in Zukunft beispielsweise auch die genaue Rolle des NS5A-Proteins im Hepatitis C Virus-Replikationszyklus ebenso wie die Resistenz gegenüber Interferon weiter aufgeklärt werden.

Ein besseres Verständnis des Hepatitis C Virus-Replikationszyklus hat zudem in jüngster Zeit zur Entwicklung antiviral wirksamer Substanzen geführt, die direkt in den Replikationszyklus eingreifen und diesen inhibieren können (specifically targeted antiviral therapy in hepatitis C, STAT-C).

Während für einige dieser neuen Medikamente in präklinischen bzw. ersten klinischen Studien eine hohe antivirale Potenz nachgewiesen werden konnte, zeigten sich gleichzeitig die Beschränkungen dieser Substanzen, die in erster Linie in einer hohen Resistenzentwicklung zu liegen scheinen. Aus diesem Grunde wird wohl grundsätzlich eine dauerhafte Viruselimination auf Jahre hinaus nur in einer Kombinationstherapie mit Interferon alfa zu erreichen sein, was eine intensive Erforschung der viralen Resistenz- bzw. Sensitivitätsmechanismen gegenüber dieser Substanz umso wichtiger erscheinen lässt.

6 Literaturverzeichnis

1. Hepatitis C: 170 Million Infected Worldwide and Still no Vaccine. (1998) WHO/36
2. Aguet M, Blanchard B (1981) High affinity binding of 125I-Labeled mouse interferon to a specific cell surface receptor. II. Analysis of binding properties. *Virology* 115, 249-261
3. Alter MJ (1997) Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26, 62S-65S
4. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H (1993) Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 67, 3835-3844
5. Bastie A, Pawlotsky JM, Roudot-Thoraval F, Dhumeaux D (1995) Hepatitis C virus infection. *Epidemiology. Pathologie Biologie* 43, 674-680
6. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15, 12-22
7. Bellentani S *et al.* (1993) Ursodiol in the long-term treatment of chronic hepatitis: a double-blind multicenter clinical trial. *J. Hepatol.* 19, 459-464
8. Blatt LM *et al.* (2000) Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J. Viral Hepat.* 7, 196-202
9. Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, Gowans EJ. (1994) Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 20, 553-557
10. Brass V *et al.* (2002) An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 277, 8130-8139
11. Braun JV *et al.* (1998) Statistical methods for DNA sequence segmentation. *Stat. Sci.* 13, 142-146
12. Brillanti S *et al.* (1994) A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 107, 812-817
13. Bukh J, Miller RH, Purcell RH (1995) Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* 15, 41-63

-
14. Carrere-Kremer S *et al.* (2004) Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J. Biol. Chem.* 279, 41384-41392
 15. Castelain S *et al.* (2002) Variability of the nonstructural 5A protein of hepatitis C virus type 3a isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Infect. Dis.* 185, 573-583
 16. Choo QL *et al.* (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362
 17. Choo QL *et al.* (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2451-2455
 18. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15623-15628
 19. Diepolder HM *et al.* (1998) Immunopathogenesis of HCV infection. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 135-151
 20. Duverlie G *et al.* (1998) Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 6), 1373-1381
 21. Eckart MR *et al.* (1993) The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 399-406
 22. El Hage N, Luo G (2003) Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J. Gen. Virol.* 84, 2761-2769
 23. Elazar M *et al.* (2003) Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 77, 6055-6061
 24. Enomoto N *et al.* (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest* 96, 224-230

-
25. Enomoto N *et al.* (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* 334, 77-81
 26. Evans T, Secher D (1984) Kinetics of internalisation and degradation of surface-bound interferon in human lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 3, 2975-2978
 27. Failla C, Tomei L, De Francesco R (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68, 3753-3760
 28. Farci P *et al.* (2002) Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3081-3086
 29. 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
 30. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791
 31. Foy E *et al.* (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300, 1145-1148
 32. Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (1991). Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 2 suppl, 223
 33. Fried MW *et al.* (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 975-982
 34. Friedman RM, Sonnabend JA (1970) Mechanism of action of interferon. *Arch. Intern. Med.* 126, 51-63
 35. Gale M Jr *et al.* (1998) Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol. Cell Biol.* 18, 5208-5218
 36. Gale M Jr, Foy EM (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436, 939-945
-

-
37. Gale MJ Jr, Korth MJ, Katze MG (1998) Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin. Diagn. Virol.* 10, 157-162
 38. Gale MJ Jr *et al.* (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230, 217-227
 39. Gardner JP *et al.* (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4498-4503
 40. Gomez J, Martell M, Quer J, Cabot B, Esteban JI (1999) Hepatitis C viral quasispecies. *J. Viral Hepat.* 6, 3-16
 41. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 67, 1385-1395
 42. Gutterman JU (1994) Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1198-1205
 43. Gwack Y, Kim DW, Han JH, Choe J (1996) Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 654-659
 44. Hadziyannis SJ *et al.* (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
 45. Han JH *et al.* (1991) Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1711-1715
 46. He Y *et al.* (2002) Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Virol.* 76, 9207-9217
 47. Hijikata M *et al.* (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* 67, 4665-4675
 48. Hofmann WP *et al.* (2007) Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132, 921-930
-

-
49. Honda K *et al.* (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777
 50. Hoofnagle JH (1997) Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26, 15-20
 51. Hoofnagle JH (1999) Management of hepatitis C: current and future perspectives. *J. Hepatol.* 31 Suppl 1, 264-268
 52. Hoofnagle JH (2002) Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36, 21-29
 53. Inchauspe G *et al.* (1991) Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10292-10296
 54. Isaacs A, Lindenmann J (1987) Virus interference. I. The interferon. by A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J. Interferon Res.* 7, 429-438
 55. Kao CC, Del Vecchio AM, Zhong W (1999) De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant flaviviridae RNA- dependent RNA polymerase. *Virology* 253, 1-7
 56. Khorsi H *et al.* (1997) Mutations of hepatitis C virus 1b NS5A 2209-2248 amino acid sequence do not predict the response to recombinant interferon-alfa therapy in French patients. *J. Hepatol.* 27, 72-77
 57. Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge University Press*. Cambridge, UK
 58. Kirchner H (1984) Interferons, a group of multiple lymphokines. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 347-374
 59. Klenerman P *et al.* (2003) Viral escape and the failure of cellular immune responses. *Science* 289
 60. Koch JO, Bartenschlager R (1999) Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J. Virol.* 73, 7138-7146
 61. Kuo G *et al.* (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244, 362-364
 62. Kurosaki M *et al.* (1997) Analysis of genotypes and amino acid residues 2209 to 2248 of the NS5A region of hepatitis C virus in relation to the response to interferon- beta therapy. *Hepatology* 25, 750-753
 63. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339, 237-238
-

-
64. Lai MY *et al.* (1996) Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 111, 1307-1312
 65. Lakina EI *et al.* (2000) [Use of PCR for detection of positive (genomic) and negative (replicative) RNA chains of hepatitis C virus in the serum, lymphocytes, and liver of patients with chronic hepatitis C]. *Vopr. Virusol.* 45, 37-41
 66. Lam NP *et al.* (1997) Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 26, 226-231
 67. Lanford RE, Chavez D, Chisari FV, Sureau C (1995) Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* 69, 8079-8083
 68. Lauer GM, Walker BD (2001) Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 345, 41-52
 69. Lee JH *et al.* (1998) Effect of ribavirin on virus load and quasispecies distribution in patients infected with hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 29, 29-35
 70. Lerat H *et al.* (1996) Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J. Clin. Invest* 97, 845-851
 71. Lindenmann J (1981) Induction of chick interferon: procedures of the original experiments. *Methods Enzymol.* 78, 181-188
 72. Lohmann V, Roos A, Korner F, Koch JO, Bartenschlager R (2000) Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 7, 167-174
 73. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA (2000) Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* 77, 5428-5438
 74. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M (2004) The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J. Gen. Virol.* 85, 721-729
 75. Macdonald A, Harris M (2004) Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* 85, 2485-2502
 76. Magrin S *et al.* (1994) Hepatitis C viremia in chronic liver disease: relationship to interferon-alpha or corticosteroid treatment. *Hepatology* 19, 273-279
 77. Mangia A *et al.* (2005) Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N. Engl. J. Med.* 352, 2609-2617
 78. Manns MP *et al.* (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
-

-
79. Marcellin P (1999) Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J. Hepatol.* 31 Suppl 1, 9-16
 80. McMahon BJ *et al.* (2004) Epidemiology and risk factors for hepatitis C in Alaska Natives. *Hepatology* 39, 325-332
 81. Mellor J *et al.* (1996) Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 417-423
 82. Mizushima H *et al.* (1994) Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* 68, 6215-6222
 83. Moradpour D, Brass V, Penin F (2005) Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* 42, 732-735
 84. Murphy FA (2005) Classification and nomenclature of viruses: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. 424-426
 85. Naoumov NV (1999) Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J. Hepatol.* 31 Suppl 1, 84-87
 86. Neddermann P *et al.* (2004) Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J. Virol.* 78, 13306-13314
 87. Neumann AU *et al.* (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103-107
 88. Ning Q *et al.* (1998) Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J. Immunol.* 160, 3487-3493
 89. Njouom R *et al.* (2003) High rate of hepatitis C virus infection and predominance of genotype 4 among elderly inhabitants of a remote village of the rain forest of South Cameroon. *J. Med. Virol.* 71, 219-225
 90. Nousbaum J *et al.* (2000) Prospective characterization of full-length hepatitis C virus NS5A quasispecies during induction and combination antiviral therapy. *J. Virol.* 74, 9028-9038
 91. Oh JW, Ito T, Lai MM (1999) A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J. Virol.* 73, 7694-7702
 92. Owerbach D *et al.* (1981) Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3123-3127
-

-
93. Pavlovic D *et al.* (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6104-6108
 94. Pawlotsky JM (2000) Virus-host interactions in hepatitis C virus infection and biological diagnosis. *Medecine et Maladies Infectieuses* 30, 14S-20S
 95. Pawlotsky JM (2002) Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36, S65-S73
 96. Pawlotsky JM, Germanidis G (1999) The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 6, 343-356
 97. Pawlotsky JM *et al.* (1999) Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J. Virol.* 73, 6490-6499
 98. Pawlotsky JM *et al.* (1998) Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* 72, 2795-2805
 99. Penin F *et al.* (2004) Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 279, 40835-40843
 100. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987) Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 727-777
 101. Peters M (1989) Mechanisms of action of interferons. *Semin. Liver Dis.* 9, 235-239
 102. Polyak SJ *et al.* (1998) Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J. Virol.* 72, 4288-4296
 103. Poynard T *et al.* (1998) Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 352, 1426-1432
 104. Reichard O, Andersson J, Schvarcz R, Weiland O (1991) Ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Lancet* 337, 1058-1061
 105. Reichard O *et al.* (1998) Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of interferon alpha-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. The Swedish Study Group. *Lancet* 351, 83-87
 106. Reyes GR (2002) The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J. Biomed. Sci.* 9, 187-197
-

-
107. RKI. Ratgeber Infektionskrankheit (2004) Merkblätter für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin* 17, 141-148
 108. Roberts EA, Yeung L (2002) Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 36, S106-S113
 109. Rosenberg S (2001) Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J. Mol. Biol.* 313, 451-464
 110. Ross RS, Viazov S, Renzing-Kohler K, Roggendorf M (2000) Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J. Med. Virol.* 60, 122-125
 111. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425
 112. Samuel C E (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778-809, table
 113. Sarcar B, Ghosh AK, Steele R, Ray R, Ray RB (2004) Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology* 322, 51-60
 114. Sarrazin C *et al.* (1999) Correlation of treatment response and mutations in the PKR-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a. *Hepatology* 30, 308A
 115. Sarrazin C *et al.* (2000) Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J. Infect. Dis.* 181, 432-441
 116. Sarrazin C *et al.* (1999) Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J. Hepatol.* 30, 1004-1013
 117. Sarrazin C *et al.* (2001) Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 289, 150-163
 118. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S (2002) Hepatitis C virus non-structural (NS)5A protein and interferon resistance: Challenge of simple mutational analyses by a new bio-mathematical model. *J. Hepatol.* 36, 93
 119. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S (2002) Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J. Virol.* 76, 11079-11090
-

-
120. Sarrazin C *et al.* (2000) Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3A and correlation with treatment response. *Gastroenterology* 118, A948
 121. Sarrazin C *et al.* (1997) Analysis of the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa and ribavirin. *Hepatology* 26, 347
 122. Scarselli E *et al.* (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017-5025
 123. Sharara AI, Hunt CM, Hamilton JD (1996) Hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* 125, 658-668
 124. Shimizu YK *et al.* (1994) Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J. Virol.* 68, 1494-1500
 125. Sidwell RW *et al.* (1972) Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177, 705-706
 126. Silverman BW (1996) Smoothed functional principal components analysis by choice of norm. *Ann. Statist* 24, 1-24
 127. Simmonds P *et al.* (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
 128. Smith DB *et al.* (1997) The origin of hepatitis C virus genotypes. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2), 321-328
 129. Smuts HE, Kannemeyer J (1995) Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1679-1681
 130. Squadrito G *et al.* (1997) Mutations in the nonstructural 5A region of hepatitis C virus and response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Gastroenterology* 113, 567-572
 131. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264
 132. Tan SL, Katze MG (1999) The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death?. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 543-554
 133. Tan SL *et al.* (1999) NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5533-5538
-

-
134. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM (2004) The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 48576-48587
 135. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM (2005) Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379
 136. Terrault NA (2002) Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 36, S99-105
 137. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 19-29
 138. Thomssen R *et al.* (1992) Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 181, 293-300
 139. Trepo C, Pradat P (1999) Hepatitis C virus infection in Western Europe. *J. Hepatol.* 31 Suppl 1, 80-83
 140. Vengris VE, Stollar BD, Pitha PM (1975) Interferon externalization by producing cell before induction of antiviral state. *Virology* 65, 410-417
 141. von Wagner M *et al.* (2005) Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 129, 522-527
 142. von Wagner M *et al.* (2003) Dynamics of hepatitis C virus quasispecies turnover during interferon alfa treatment. *J. Hepatol.* 38, 120
 143. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA.* 7, 710-721
 144. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* 67, 3338-3344
 145. Wei X *et al.* (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-122
 146. Weiner AJ *et al.* (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842-848
 147. Weissmann C, Weber H (1986) The interferon genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 33, 251-300
-

-
148. Wolinsky SM (1996) *et al.* Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272, 537-542
 149. Wyatt CA *et al.* (1998) Immunity in chimpanzees chronically infected with hepatitis C virus: role of minor quasispecies in reinfection. *J. Virol.* 72, 1725-1730
 150. Xu Z *et al.* (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20, 3840-3848
 151. Yasui K *et al.* (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72, 6048-6055
 152. Zekri AR *et al.* (2001) Hepatitis C virus genotyping versus serotyping in Egyptian patients. *Infection* 29, 24-26
 153. Zeuzem S (1999) Interferon-alpha and ribavirin: advances in the treatment of chronic hepatitis C. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 124, 636-642
 154. Zeuzem S (2000) Treatment of chronic hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis. *J. Viral Hepat.* 7, 327-334
 155. Zeuzem S (2004) Hepatitis C im Dialog. Stuttgart
 156. Zeuzem S (2004) Treatment of hepatitis B and C - current standards. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 129, S57-S59
 157. Zeuzem S *et al.* (2000) Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 343, 1666-1672
 158. Zeuzem S, Lee JH, Roth WK (1997) Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon Alfa. *Hepatology* 25, 740-744
 159. Zeuzem S *et al.* (2005) International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 43, 250-257
 160. Zhong W *et al.* (2000) Template/primer requirements and single nucleotide incorporation by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* 74, 9134-9143

7 Publikationen/Dank

Teile dieser Arbeit wurden bei folgenden Publikationsorganen eingereicht bzw. veröffentlicht:

Abstract-Title: Virologic response to Peginterferon alfa and ribavirin in patients with chronic hepatitis C is associated with local accumulation of sequence variations in NS5A

Author(s): von Wagner M, Herrmann E, Sarrazin C, Kau A, Fernandez B, Kronenberger B, Pawlotsky JM, Neumann A, Ferrari C, Schalm S, Zeuzem S

Source: HEPATOLOGY 42 (4): 564A-565A Suppl. 1, OCT 2005

Abstract-Title: Prediction of virologic response in hcv genotype 1A-infected patients according to amino acid pattern in NS5A using statistical learning algorithms for classification

Author(s): von Wagner M, Welsch C, Herrmann E, Sarrazin C, Kau A, Welker M, Fernandez B, Merkwirth C, Pawlotsky JM, Neumann A, Ferrari C, Schalm S, Zeuzem S

Source: JOURNAL OF HEPATOLOGY 46: S247-S248 654 Suppl. 1, 2007

Dank

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Zeuzem für die Bereitstellung des Themas meiner Promotionsarbeit und die damit verbundenen Arbeitsmittel.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael von Wagner, der mich über die Jahre betreute und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sarrazin und seiner Arbeitsgruppe für die angenehme und nette Betreuung in der experimentellen und theoretischen Phase bedanken. Dabei sind besonders Frau Bihotz Fernandez und Frau Barbara Schönberger zu erwähnen, die mir die notwendigen molekularbiologischen Arbeitsschritte zeigten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Hermann für die Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung und Herrn Achim Mayer für seine Hilfe bei EDV-Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Johannes und meiner Familie für die aufgebrachte Geduld und Unterstützung vor allem in den letzten Monaten der Ausarbeitung bedanken.

8 Lebenslauf

Annika Ulrike Kau

Geboren am 6. März 1981 in Zweibrücken

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1987-1991 Grundschule in Maßweiler/Rheinland-Pfalz
1991-2000 Hofenfelsgymnasium in Zweibrücken/Rheinland-Pfalz
Juni 2000 Abitur in deutscher und französischer Sprache
Juni-September 2000 Ausbildung zur Rettungssanitäterin, Lehranstalt für
Rettungsdienst in Mainz

Universitäre Ausbildung

Okt. 2000 - Nov. 2006 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

September 2002 Ärztliche Vorprüfung
September 2003 Erstes Staatsexamen
Oktober 2005 Zweites Staatsexamen
November 2006 Drittes Staatsexamen, Gesamtnote sehr gut (1,49)

Ärztliche Tätigkeit:

Februar - November 2007 Assistenzärztin, Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
ab Dezember 2007 Assistenzärztin, Medizinische Klinik I,
J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Homburg/Saar im November 2007

Unterschrift