

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

**Genotypische Charakterisierung von Resistenzmutationen  
in der Hepatitis C Virus-Quasispezies unter Therapie mit  
einem Hepatitis C-spezifischen Proteaseinhibitor**

***Dissertation***  
***zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

vorgelegt von Dennis Wincheringer  
geboren am: 10. Juli 1977 in Dernbach

**Dekan:** \_\_\_\_\_ Professor Dr. med. Michael D. Menger \_\_\_\_\_

**1.Gutachter:** \_\_\_\_\_

**2.Gutachter:** \_\_\_\_\_

**Jahr der Promotion: 2008**

Teile der Daten dieser Arbeit wurden auf verschiedenen internationalen Kongressen vorgestellt und wie folgt publiziert:

Amerikanischer Leberkongress (AASLD) 2005

Sarrazin C, Kieffer T, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, **Wincheringer D**, Lin C, Grossman T, Purdy S, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong A (2005) Genetic heterogeneity in the HCV NS3 protease of untreated genotyp 1 patients has little effect on the sensitivity to VX-950. Hepatology; 42: 537A.

Sarrazin C, Kieffer T, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, **Wincheringer D**, Lin C, Grossman T, Purdy S, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD (2005) Characterization of viral variants in the HCV NS3 protease domain of genotype 1 patients that are selected during 14 days of dosing with VX-950. Hepatology; 42: 751A.

Europäischer Leberkongress (EASL) 2006

Kieffer T, Sarrazin C, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, **Wincheringer D**, Lin C, Purdy S, Weegink CJ, Reesink HW, Kwong A, Zeuzem S (2006) Wild-type HCV NS3 protease re-emerges during follow-up after 14 days of dosing with VX-950 in patients with genotype 1 HCV. J Hepatol; 44: 7A.

Publikation

Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, **Wincheringer D**, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD (2007) Dynamic Hepatitis C Virus Genotypic and Phenotypic Changes in Patients Treated With the Protease Inhibitor Telaprevir. Gastroenterology; 132: 1767-77.

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
4.1	Epidemiologie	7
4.2	Entdeckung	8
4.3	Taxonomie	8
4.4	HCV-Genotypen	9
4.5	HCV-Quasispezies	10
4.6	Genomorganisation und virale Proteine	11
4.7	Klinik	18
4.8	Diagnostik	19
4.9	Therapie	20
4.9.1	Neue Therapieansätze	24
4.9.2	Telaprevir (VX-950)	25
4.10	Fragestellung	26
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
5.1.1	Patientenpopulation und Studienaufbau	28
5.1.2	Geräte und Einwegmaterialien	29
5.1.3	Allgemeine Chemikalien	30
5.1.4	Fertige Reagenzien-Sets	30
5.1.5	Weitere Reagenzien	31
5.1.6	DNA-Längenstandards	31
5.1.7	Oligonukleotide	31
5.1.8	Bakterien	32
5.1.9	Medien	33
5.1.10	Plasmide	33
5.1.11	Puffer und Lösungen	34
<b>5.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
5.2.1	Isolierung von DNA	35
5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
5.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	40
5.2.4	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	41
5.2.5	Klonierung von PCR-Produkten	41
5.2.6	Transformation	42
5.2.7	Isolierung der Plasmid-DNA aus Escherichia coli	43
5.2.8	Sequenzierung	43
5.2.9	Sequenzanordnung	45
5.2.10	Statistische Analysen	45

<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>6.1</b>	<b>Serologische und klinische Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>6.2</b>	<b>Sequenzbestimmung</b>	<b>47</b>
6.2.1	Bestimmung von Nukleotidsequenzen	47
6.2.2	Bestimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen	48
<b>6.3</b>	<b>Quasispeziesanalytik</b>	<b>51</b>
6.3.1	Quasispezieskomplexität und –diversität zu Baseline	51
<b>6.4</b>	<b>Mutationsanalysen</b>	<b>52</b>
6.4.1	Baseline Analyse	52
6.4.2	Analyse Tag 14 (Therapieende)	53
6.4.3	Analyse nach Therapieende	57
6.4.4	Mutationen unter Therapie mit Telepravir	59
<b>6.5</b>	<b>HCV-RNA Konzentrationsverlauf</b>	<b>60</b>
<b>6.6</b>	<b>Virologische Ansprechverhalten im Verlauf</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
<b>7.1</b>	<b>Methodenkritik</b>	<b>64</b>
7.1.1	Auswahl des RNA-Extraktionsverfahrens	64
7.1.2	Optimierung der RT-PCR und der Nested-PCR-Protokolle	64
7.1.3	Kontaminationskontrollen	65
7.1.4	Validierung der Daten	66
7.1.5	Auswertung der Daten	66
<b>7.2</b>	<b>Ergebnisinterpretation</b>	<b>67</b>
7.2.1	Phänotypische Analyse der Telepravir resistenten Virusvarianten	67
7.2.2	Modell der NS3 Protease	70
7.2.3	Relative Fitness der Resistenzvarianten in vivo	71
7.2.4	Interpretation der Resistenzmechanismen	71
7.2.5	Fitness der resistenten Varianten	74
7.2.6	Ausblick	76
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>105</b>

## 2 Zusammenfassung

**Einleitung:** Über 170 Millionen Menschen weltweit sind mit dem Hepatitis C Virus (HCV) infiziert. Die dauerhaften virologischen Ansprechraten der aktuellen Standardtherapie mit pegyliertem Interferon alfa (PEG-IFN) und Ribavirin (RBV) liegen durchschnittlich bei ca. 50-60% und die Therapie ist mit zahlreichen Nebenwirkungen, wie grippalen Symptomen, hämatologische Abnormalitäten und neuropsychiatrischen Symptomen, behaftet. Die Entwicklung neuer Medikamente fokussiert auf die spezifische Hemmung HCV-kodierter Enzyme, u.a. der Nichtstruktur(NS)protein-3/4a-Protease, deren Funktion in der Prozessierung eines Teils des HCV-Polyproteins besteht, welche wiederum einen essentiellen Schritt im HCV-Replikationszyklus einnimmt. Telaprevir (VX-950) ist ein oral verfügbarer Inhibitor der HCV-NS3/4a-Protease. Unter einer Therapie mit Telaprevir kommt es bei Patienten mit einer HCV-Genotyp 1 Infektion innerhalb von 14 Tagen zu einem mittleren Abfall der HCV-RNA-Konzentration im Serum um den Faktor 1000. Aufgrund der hohen Replikationseffektivität des HCV mit der Produktion von ca.  $10^{12}$  Virionen pro Tag bei gleichzeitig niedriger Replikationsgenauigkeit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Virus, ist die HCV-Infektion durch die Ausbildung verschiedener, divergenter HCV-Varianten, der sogenannten Quasispezies, charakterisiert. Damit besteht grundsätzlich eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit für die Präexistenz von resistenten Mutanten, die unter der Therapie mit einem Proteaseinhibitor einen Selektionsvorteil besitzen und einen Wirkungsverlust der Therapie nach sich ziehen.

**Methoden:** Die HCV-RNA von 34 Patienten, die mit VX-950 über 14 Tage behandelt wurden (Placebo oder VX-950 mit 3 × 450 mg, 3 × 750 mg, 2 × 1250 mg pro Tag), wurde aus Serumproben vor, unter, am Ende und im Verlauf nach Therapie isoliert. Die für die Proteasefunktion kodierende Nukleotidsequenz des HCV-NS3-Genomabschnittes wurde amplifiziert. Anschließend erfolgte die Klonierung und Sequenzierung von im Mittel 80 Isolaten der HCV-Quasispezies pro Zeitpunkt und Patient, die für die weitere genotypische Analyse von möglichen Resistenzmutanten diente.

**Ergebnisse:** An vier Aminosäurepositionen der NS3-Protease wurden Mutationen nachgewiesen, die bei mehr als einem Patienten mit einer Frequenz von >5% unter

der Therapie auftraten (V36, T54, R155, A156). Die Entwicklung der resistenten Mutanten war mit einem Wiederanstieg der HCV-RNA-Konzentration im Serum noch während der 14-tägigen Therapie bei einem Teil der betroffenen Patienten verbunden. Eine optimale Dosierung mit hohen Plasmaspiegeln des Proteaseinhibitors und ein rascher initialer Abfall der HCV-RNA-Konzentration waren entscheidend für einen kontinuierlichen Abfall der HCV-RNA-Serumkonzentration über den gesamten Therapiezeitraum von 2 Wochen. Im Langzeitverlauf von 3 bis 7 Monaten nach Therapieende fanden sich bei 12 Patienten weiterhin NS3-Varianten mit Resistenzmutationen.

**Schlussfolgerung:** Unter der Therapie mit dem Proteaseinhibitor VX-950 können innerhalb einer zweiwöchigen Therapie resistente Mutanten mit einem entsprechenden Wirkungsverlust selektioniert werden. Ein steiler initialer Abfall der HCV-RNA-Konzentration und eine optimale Dosierung sind entscheidende Faktoren, die mit einer geringen Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Resistenzen einhergehen. Resistenzvermittelnde Mutanten konnten auch nach Beendigung der Therapie im Verlauf nach bis zu 7 Monaten noch in reduzierter Zahl nachgewiesen werden. Dies dürfte mit einer verminderten Wirkungseffektivität bei einer erneuten Therapie mit VX-950 einhergehen.

### 3 Abstract

**Introduction:** Over 170 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV). The current standard treatment with pegylated interferon alfa (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) has limited efficacy with sustained virologic response rates of approx. 50% and is associated with significant side effects like flue like symptoms, haematologic disorders and neuropsychiatric symptoms. The development of treatment options is focused on small molecules with specific inhibition of HCV-proteins crucial for replication, i.e. the non-structural protein 3/4a (NS3/4A) protease. The partial processing of the HCV-polyprotein by the NS3/4A-protease is an essential step of HCV-replication. Telaprevir (VX-950) is an oral available inhibitor of the HCV-NS3/4A-protease. Within 14 days of treatment with telaprevir, patients infected with HCV genotype 1 have shown a median HCV-RNA decline of  $4\text{-log}_{10}$  steps. Because of the high replicational turnover with production of approx.  $10^{12}$  virions every day combined with the low fidelity of RNA-dependend-RNA-polymerase slightly divergent HCV-variants, the so-called quasispecies, are continuously produced. Generally this may be associated with the pre-existence of resistant variants which during treatment with an HCV protease inhibitor will be selected resulting in the development of resistance.

**Methods:** The HCV-RNA of 34 patients treated for 14 days in a placebo-controlled, double-blind, randomized trial with VX-950 (Placebo or  $3 \times 450$  mg,  $3 \times 750$  mg,  $2 \times 1250$  mg per day) were isolated from samples collected before, at the end of treatment and during follow up. The NS3 protease gene was than amplified, cloned and sequences of approximately 80 clones per patient and time point were generated.

**Results:** At 4 amino acid positions within the HCV NS3 protease mutations at a  $>5\%$  frequency were detected in more than one patient (V36, T54, R155, A156). The development of resistant variants correlated with the breakthrough of replication and the increase of HCV-RNA-concentration during therapy. Optimal drug levels with high plasma telaprevir concentrations and a sharp initial decline were correlated with a continuous decline of HCV-RNA-levels during therapy. At long term follow up 3-7 months after the end of treatment in 12 patients a small amount of low-level resistant variants were still detectable.

**Conclusion:** Resistant HCV isolates are selected rapidly during a 14 day therapy with the protease inhibitor VX-950. A sharp initial decline of the HCV-RNA-concentration in serum combined with optimal drug plasma levels are essential to avoid development of drug resistance. A long-term persistence of selected resistant variants for up to 7 months is possible. It is most likely that this would be associated with a decreased efficacy of re-treatment with VX-950.

## 4 Einleitung

### 4.1 Epidemiologie

Bei der Hepatitis C Virusinfektion (HCV) handelt es sich eine weit verbreitete Erkrankung die eine Hauptursache für chronische Lebererkrankungen darstellt (Seeff, 2002). Nach Schätzungen der WHO sind weltweit über 170 Millionen Menschen infiziert, was einer Prävalenz von 3% der Weltbevölkerung entspricht. Es werden verschiedene Geno- und Subtypen unterschieden; die Häufigkeit dieser weist starke regionale Schwankungen auf (Robertson et al., 1998). In Europa ist der Subtyp 1b vorherrschend, gefolgt von 1a und den Genotypen 3 und 2 (Berg et al., 1997). Die Seroprävalenz bzgl. des Vorliegens von anti-HCV-Antikörpern liegt in Deutschland zwischen 0,4-0,7% (Thierfelder et al., 1999). Allerdings wird von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen, zumal bei der chronischen HCV-Infektion in 20–40% der Fälle Verläufe mit persistierend normalen Transaminasen zu beobachten sind (Alberti, 2005). Aufgrund einer Chronifizierungsrate von 50–80% (Villano et al., 1999) wird die Prävalenz von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C in Deutschland auf 400.000-500.000 geschätzt.

Die Transmission erfolgt parenteral, früher hauptsächlich über kontaminiertes Blut oder Blutprodukte. Durch die Einführung standardisierter Testverfahren mit Nachweis von HCV-Antikörpern und seit neuestem auch der HCV-RNA konnte das Risiko der transfusionsassoziierten Hepatitis C praktisch fast vollständig eliminiert werden (Stramer, 2007).

Als besonders risikoreich für eine HCV-Transmission gilt heute ein intravenöser Drogenkonsum (IVDA), insbesondere bei Nutzung derselben Nadel durch verschiedene Personen ("needle-sharing"). Weltweit sind zwischen 50–95% aller Konsumenten von intravenösen Drogen mit dem HCV infiziert (Bolumar et al., 1996; Bell et al., 1990; Patti et al., 1993; Thomas et al., 1995a; Stark et al., 1995).

Auch eine sexuelle Übertragung ist möglich, allerdings steht dieser Übertragungsweg epidemiologisch nicht im Vordergrund (Feldman et al., 2000; Leruez-Ville et al., 2000). Begünstigt wird die Übertragung des Virus bei Verletzungen im Genitalbereich, dem Vorliegen von Hämaturie oder der Menstruation (Dienstag, 1997) (Thomas et al., 1995b).

Ebenso besteht ein perinatales Infektionsrisiko von 4–7% bei aktiver HCV-Infektion der Mutter, wobei die meisten Übertragungen peripatal stattfinden (Zanetti et al., 1999, Ohto et al., 1994). Eine *Sectio caesarea* zur eventuellen Verminderung des Transmissionsrisikos auf das Kind wird aufgrund identischer Übertragungsrisiken für die vaginale Geburt und die Sectio nicht empfohlen. Stillen wird nicht als Risiko für eine Virusübertragung angesehen, so lange keine Verletzungen der Mamille vorliegen (Polywka et al., 1999)

Bei vielen Patienten kann die Infektionsquelle retrospektiv nicht identifiziert werden (Herrine, 2002). Das Robert Koch-Institut in Berlin gibt die Inzidenz einer HCV-Infektion in Deutschland aktuell auf ca. 5000 pro Jahr an.

## 4.2 Entdeckung

In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden zunehmend Posttransfusionshepatitiden beobachtet, welche nicht auf die damals bekannten Viren (Hepatitis-A-Virus, HAV; Hepatitis-B-Virus; HBV) zurückzuführen waren. Ein infektiöses Agens wurde vermutet, war aber unbekannt. Diese Form der Hepatitis wurde als Non-A-Non-B-Hepatitis (NANBH) bezeichnet (Prince et al., 1974). Durch Klonierung von Genomfragmenten, die aus dem Serum eines mit HCV infizierten Schimpansen stammten, gelang 1989 die Isolierung des Erregers und mit der Sequenzierung sich überlappende cDNA-Klone die komplette Identifizierung des dann Hepatitis-C-Virus genannten Erregers (Choo et al., 1989; Kato et al., 1990b). Durch die rasche Etablierung von speziellen HCV-Antikörpernachweissystemen und durch die Anwendung von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken zum direkten HCV-Genomnachweis wurden epidemiologische Studien zur Verbreitung der HCV-Infektion möglich.

## 4.3 Taxonomie

Das HCV ist als eigene Gattung der Hepaciviren in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet (Francki, 1991). Weitere Genera dieser Familie sind die Flaviviren und die Pestiviren, zu denen HCV vor allem Ähnlichkeiten im Bereich der Genomorganisation und den physikochemischen Eigenschaften aufweist. Zu den *Flaviviridae* zählt man unter anderem das Gelbfiebervirus, welches als Prototyp gilt,

das FSME-Virus und das Dengue-Virus. Die Pestiviren sind nach jetzigem Wissenstand lediglich tierpathogen (Rice, 1996).

Sequenzvergleiche und Hydrophobizitätsprofile weisen darauf hin, dass das HCV phylogenetisch eine größere Homogenität mit den Pestiviren als mit den Flaviviren hat. Dies wird auch durch die Organisation der Genomstruktur bestätigt (Miller et al., 1990).

#### 4.4 HCV-Genotypen

Aufgrund von Sequenzunterschieden wurde eine Gruppierung der HCV-Isolate in Genotypen und Subtypen vorgenommen. Übereinkommend wurde festgelegt, dass es sich um unterschiedliche HCV-Genotypen handelt, wenn die Homologie der Aminosäuren-Sequenz von zwei Isolaten, gemessen am Gesamtgenom, weniger als 72% beträgt. Falls eine Sequenzhomologie zwischen 75% und 86% vorliegt, handelt es sich um Subtypen des gleichen Genotyps. Bei einer Homologie größer 86% wird vom gleichen Subtyp ausgegangen (Simmonds et al., 1994). Unterschiedliche Genotypen werden gemäß der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit arabischen Ziffern, die Subtypen zusätzlich mit kleinen lateinischen Buchstaben versehen. Derzeit werden die HCV-Isolate in 6 allgemein anerkannte Genotypen eingeteilt (Robertson et al., 1998) (Simmonds et al., 2005) (Abb. 1), wobei die Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen 31–34% liegen (Pawlotsky, 2003).

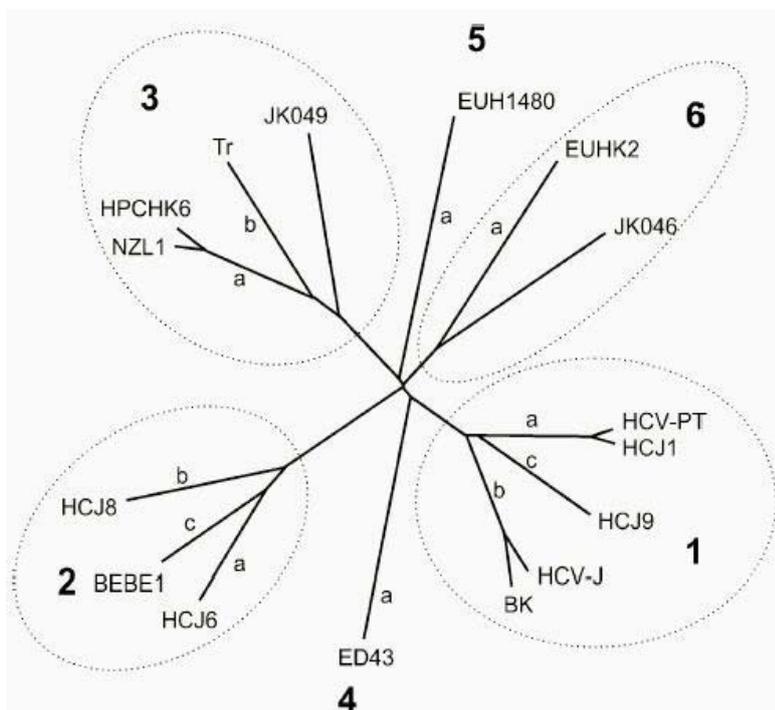


Abb. 1: Phylogenetische Analyse ausgewählter HCV-Gesamtgenomsequenzen der Genotypen 1-6 (Kulkarni-Kale et al., 2004).

In den letzten Jahren wurde die Entdeckung weiterer Genotypen durch Sequenzierung von HCV-Isolaten aus Südostasien postuliert (Tokita et al., 1996). Genauere Untersuchungen ergaben allerdings, dass diese eher unter die bekannten sechs Genotypen zu subsumieren sind (Robertson et al., 1998). Epidemiologische Studien haben merkliche Unterschiede zwischen der Genotypverteilung in geographischen Regionen und bei Patientengruppierungen gezeigt (Tabelle 1). Am weitesten verbreitet sind die HCV-Genotypen 1a und 1b, die vor allem in Europa und Amerika überwiegen (Ross et al., 2000).

Land	Vorherrschender Genotyp/ Subtyp
USA/Kanada	1a, 1b, 2a, 3°
Südamerika	1a, 1b, 2, 3°
Europa	1a, 1b, 3a
Nord- und Zentralafrika	4
Südafrika	5a, 1, 2, 3
Japan, Taiwan, China	1b, 2a, 2b
Vietnam, Thailand	6, 1b, 2
Hongkong	6a, 1b, 2a, 2b

Tab. 1: Geographische Verteilung der Genotypen (Dusheiko et al., 1994).

Unterschiede in der Virulenz der Genotypen und ihrer Subtypen ließen sich bis heute nicht sicher nachweisen (Berg et al., 1997). Als problematisch erwiesen sich in diesem Zusammenhang häufig Kofaktoren in den entsprechenden Patientenkohorten. Der Genotyp dient jedoch als wichtiger prognostischer Faktor für das Therapieansprechen und den Behandlungserfolg (siehe 4.9 Therapie) (Fried et al., 2002; National Institutes of Health, 2002).

## 4.5 HCV-Quasispezies

Ein Charakteristikum des HCV ist die Ungenauigkeit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die eine intrinsische Fehlerkorrekturfunktion („proof-reading“) fehlt. Dies führt bei der Replikation zum Einbau von nichtkomplementären Nukleotiden. Es entsteht so in einem Patienten eine komplexe Genompopulation, die man als Quasispezies bezeichnet (Martell et al., 1998). Diese Eigenschaft ist auch für andere RNA-Viren bekannt, wie zum Beispiel für das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) oder Influenza-A/B-Viren. Es ist wahrscheinlich, dass diese genetische Variabilität entscheidend zur Persistenz der Virämie, zur Änderung des Zelltropismus und zur

Resistenz gegen antivirale Substanzen beiträgt. Von besonderer Bedeutung sind hier Mutationen der Hüllproteine, da deren Epitope Angriffspunkte der humoralen und zellulären Immunantwort darstellen können.

Täglich werden bei einer HCV-Infektion im Schnitt  $10^{12}$  Virionen gebildet und wieder eliminiert, wobei die Halbwertszeit durchschnittlich 2,7 Stunden beträgt (Neumann et al., 1998). Als Folge entstehen unzählige Virusvarianten. Ein Großteil der Positionen im Genom können durch unterschiedliche Basen besetzt werden. Die Sequenz eines Isolats wird charakterisiert, indem für jede Nukleotidposition diejenige Base bestimmt wird, die nach der Sequenzierung die größte Häufigkeit der Varianten aufweist. Diese Hauptvariante bezeichnet man als Konsensussequenz. Sie kann entweder mittels Direktsequenzierung von PCR-Produkten oder durch Sequenzierung mehrerer Klone bestimmt werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Konsensussequenz des Gesamtgenoms lediglich theoretischer Natur ist. Ihr reales Vorkommen im Patienten ist nicht zwingend notwendig (Holland, 1992).

Als Standardverfahren zur Analyse von HCV-Varianten bzw. bestimmten Sequenzabschnitten eines HCV-Isolats wird zuerst die Zielsequenz amplifiziert, das entsprechende PCR-Produkt kloniert und konsekutiv eine ausreichende Anzahl von Klonen sequenziert. Mittels dieser Daten kann durch Berechnungen die Variabilität des Genoms dargestellt und ihre Veränderungen in der Konsensussequenz über einen längeren Zeitraum ermittelt werden. Im Schnitt muss für das komplette Genom mit einer Variabilität von  $3,2 \times 10^{-3}$  Basenaustauschen pro Nukleotidposition und Jahr gerechnet werden (Rispeter et al., 2000).

## **4.6 Genomorganisation und virale Proteine**

Das HCV ist ein lineares, einzelsträngiges, aus ca. 9.600 Nukleotiden bestehendes, umhülltes RNA-Virus mit Plusstrang-Polarität (Kato et al., 1990a) Die HCV-RNA kodiert für einen offenen Leserahmen („open reading frame“, ORF), der sowohl am 5'-Ende, als auch am 3'-Ende von nicht codierten Regionen flankiert wird. Das Translationsprodukt dieses ORF ist ein Vorläufer-Polyprotein, das je nach Genotyp, 3010 bzw. 3033 Aminosäuren (AS) lang ist (Lohmann et al., 1999a). Das Genom beginnt bei allen Isolaten mit einem hochkonservierten, nicht codierenden Bereich von 341 Nukleotiden. Dieser hat replikationsregulatorische Funktionen, da er eine interne Ribosomenbindungsstelle („internal ribosome entry site“, IRES) enthält, die

entscheidend für die Translation des HCV-Polyproteins ist (Bartenschlager et al., 2004). Sie ermöglicht die cap-unabhängige Initiation der Translation des Plusstrang-RNA-Genoms.

Dem nicht kodierenden 5'-Ende folgt ein offener Leserahmen von etwa 9033 Nukleotiden Länge, der für das oben angeführte Polyprotein codiert. Von diesem Polyprotein werden an determinierten Schnittstellen zehn verschiedene Polypeptide von wirtskodierten Signalasen und viral kodierten Proteasen abgespalten. Dies geschieht sowohl ko- als auch posttranslational.

Die unterschiedlich lange nicht codierte Region am 3'-Ende besteht aus einer relativ konservierten Region, der sich ein poly-Uracil-Trakt anschließt, der wiederum von mehreren Cytidin-Resten unterbrochen sein kann (Tanaka et al., 1996). Abschließend folgt nochmals ein hochkonservierter Bereich von 98 Nukleotiden (Kolykhalov et al., 1996). Dieser besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur (X-Struktur) und scheint von großer Bedeutung für die Replikation *in vivo* zu sein (Yanagi et al., 1999).

Neben dem ORF besitzt das HCV einen weiteren Leserahmen, der als alternativer Leserahmen („alternate reading frame“, ARF) bezeichnet wird. Dieser bewirkt, dass neben dem Vorläuferpolyprotein und dem in ihm enthaltenen Strukturproteinen und Nichtstrukturproteinen weitere Eiweiße, so genannte „alternate reading frame proteins“ (AFPR) exprimiert werden. Der AFR ist in einem, den ORF überlappenden, Bereich in der aminoterminalen Region des Polyproteins codiert (Walewski et al., 2001). Obwohl *in vivo* Antikörper gegen eines dieser Proteine (F-Protein) nachgewiesen werden konnten, scheint der AFR keine essentielle Rolle bei der Virusreplikation im Wirt zu spielen (Lohmann et al., 1999a; McMullan et al., 2007). Seine eigentliche Bedeutung konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Das Polyprotein enthält drei Strukturproteine, das Kapsid („core“, C) und zwei Hüllproteine (E1 und E2) sowie die Nicht-Strukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B.

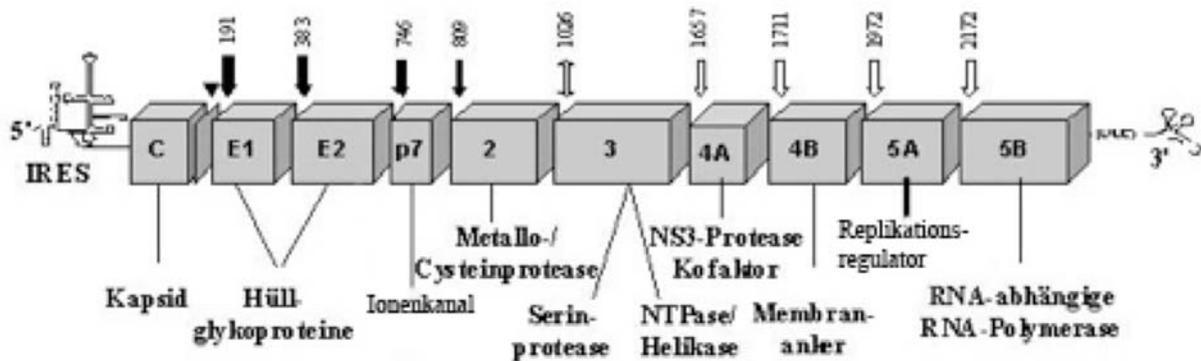


Abb. 2: Darstellung des HCV-Genoms (mit freundlicher Genehmigung aus Sarrazin C *et al.* (2004). Hepatitis C-virus - virus kinetics and resistance mechanisms. *Z Gastroenterol* 42:387-396).

Das selbst bei unterschiedlichen Genotypen hochkonservierte HCV Kapsid-Gen ist am aminoterminalen Ende des HCV-Polyproteins lokalisiert und codiert für ein Strukturprotein, aus dem das Nukleokapsid gebildet wird. Es existiert in drei verschiedenen Formen und hat in seiner maturierten Form eine Größe von 191 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 21 kDa entspricht. Ferner kann es gemäß seines Hydrophobizitäts-Profiles in drei primäre Domänen unterteilt werden. Die erste Domäne (AS 1-122) enthält eine große Anzahl von basischen Residuen. Die zweite Region (AS 123-174) ist hydrophober und die dritte Domäne (AS 175-191) ist höchst hydrophob. Sie beinhaltet eine Signalsequenz für das Protein E1 (McLauchlan, 2000). Die Interaktion mit dem Hüllprotein E1 ist für die Zusammensetzung der Viruspartikel notwendig. Neben der Bildung des Nukleokapsids sind für das Kapsid-Protein weitere Funktionen beschrieben: Beeinflussung von Apoptose, Lipidmetabolismus, Transkription, zellulärer Transformation und Interaktion mit der Immunantwort des Wirts (McLauchlan, 2000). Experimentell konnte eine Interaktion des Kapsid-Proteins mit der viralen HCV-RNA nachgewiesen werden (Shimoike *et al.*, 1999). Somit ist davon auszugehen, dass das Kapsid-Protein auch eine regulatorische Funktion bei der Expression spezifischer viraler Proteinen hat (Krekulova *et al.*, 2006). Auch das Translationspotenzial der IRES, die am 5'-Ende des viralen Genoms lokalisiert ist, wird beeinflusst (Honda *et al.*, 1996). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass

durch die Bindung des Kapsid-Proteins an so genannte Lipid-droplets, eine Steatosis hepatis induziert wird (Barba et al., 1997). Die Bindung des Kapsid-Proteins an Lipidtröpfchen ist zudem entscheidend für die Bildung und Freisetzung von neuer Hepatitis C Viren. Ebenfalls wurden für das HCV Kapsid-Protein auch antiapoptotische Eigenschaften beschrieben. Durch Interaktionen mit Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptoren (LT $\beta$ R), dem Tumornekrosefaktor (TNF), dem onkogenen Transkriptionsfaktor c-myc, dem Tumorsuppressorgen p53 und dem zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors p21 wird die Immunantwort des Wirts alteriert (Lu et al., 1999; Saito et al., 2006; Yang et al., 1999). Dies könnte eine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese der HCV-Infektion haben.

Bei den Hüllproteinen E1 (30-35 kDa) und E2 (70-72 kDa) handelt es sich um Transmembranproteine. Prinzipiell werden „singlepass-Transmembranproteine“, die die Membran nur einmal durchqueren, von „multipass-Transmembranproteinen“, die die Membran mehrmals durchqueren, unterschieden. Die singlepass-Transmembranproteine werden als Typ-1-Transmembranprotein bezeichnet, wenn das aminoterminal Ende extrazellulär liegt, und als Typ-2-Transmembranprotein bezeichnet, wenn dieses intrazellulär liegt. Sowohl E1 als auch E2 sind Transmembranproteine des Typs 1 (Dubuisson, 2000). Beide Proteine sind mehrfach glykosiliert. (Meunier et al., 1999). An ihrer Biogenese sind spezifische Chaperone des Endoplasmatisches Retikulums (ER) beteiligt. Nach Faltung der Glykoproteine entstehen nichtkovalente Bindungen zwischen den beiden Proteinen mit der Ausbildung natürlicher Heterodimere (Dubuisson et al., 1994). Zudem wurden auch Disulfid-Brücken zwischen beiden Proteinen nachgewiesen. Bei diesen Aggregaten handelt es sich jedoch vermutlich um falsch gefaltete Proteine (Grakoui et al., 1993). Das Hüllprotein E2 besitzt zwei hypervariable Regionen (HVR1/2), die im Vergleich zu anderen Genomregionen eine höhere Variabilität aufweisen (Weiner et al., 1992). E2 vermittelt die Anheftung des Virus an die Wirtszelle. Ein unverzichtbarer Rezeptor hierfür ist das CD81-Molekül, dass von vielen Zelllinien an der Oberfläche exprimiert wird, darunter auch von Hepatozyten und B-Lymphozyten (Pileri et al., 1998). Jedoch ist diese Bindung relativ schwach und abhängig vom viralen Genotyp. Weiterhin ist für die Aufnahme des HCV in die Zellen die direkte Interaktion mit dem Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) sowie Claudin 1 Rezeptor von wesentlicher Bedeutung (Bartosch et al., 2003) (Harris et al., 2008) (Evans et al., 2007). Das Protein E1 scheint diesen

Fusionsprozess mit der Wirtszelle zu unterstützen. Des Weiteren wird vermutet, dass das E2-Protein *in vitro* mit der Interferon-induzierten, Doppelstrang-RNA-aktivierten Proteinkinase (PKR) interagiert (Tan et al., 2001). Dieses Enzym reguliert die Proteinsynthese herunter, indem es durch Phosphorylierung den Translationsinitiationsfaktor eIF2 inhibiert. Da das Hüllprotein E2 eine Phosphorylierungs-Homologiedomäne (PePHD) besitzt, führt der Kontakt mit der PKR zur Aufhebung der inhibitorischen Effekte des Enzyms auf die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum (Taylor et al., 1999). Dieser Prozess könnte verantwortlich für eine Interferonresistenz bzw. -sensitivität bestimmter HCV Genotypen sein.

Das p7-Protein ist ein höchst hydrophobes Polyprotein. Die genaue Funktion ist immer noch unbekannt. In Analogie zum p7-Protein des Pestivirus kann vermutet werden, dass auch das HCV-P7 kein wirkliches Strukturprotein ist (Elbers et al., 1996). Es wird vermutet, dass das p7-Protein eine wichtige Funktion beim Zusammenbau des Virus hat und an der Freisetzung des Virus im Cytoplasma der infizierten Zelle beteiligt ist (Sakai et al., 2003). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass das p7 Protein oligomerisiert und auf diese Weise Ionenkanäle ausbildet, die für seine Funktion essentiell sind. Eine *in vitro* beschriebene Blockade der p7 Ionenkanäle durch die Substanz Amantadin konnte in Replikonstudien nicht bestätigt werden (Griffin et al., 2003) (Steinmann et al., 2007).

Das Nichtstrukturprotein 2 (NS2) hat eine Molekulargewicht von 21-23 kDa. Es bildet zusammen mit dem NS3-Protein eine Autoprotease (NS2/3 Protease), welche die Spaltung von NS2 und NS3 katalysiert (Hijikata et al., 1993). Diese Prozessierung ist zinkabhängig. Es gibt Hinweise, dass zusätzlich das zelluläre Chaperon Hsp90 benötigt wird (Waxman et al., 2001). Als weitere Funktion ist das NS2-Protein für die Phosphorylierung des NS5A-Proteins notwendig (Liu et al., 1999).

Als größtes Nichtstrukturprotein mit einem Molekulargewicht von 70-72 kDa spielt das NS3-Protein eine entscheidende Rolle sowohl bei der Prozessierung des Polyproteins als auch bei der RNA-Replikation. Es besitzt vier enzymatische Aktivitäten: Autoprotease zusammen mit NS2, Serinprotease, RNA-Helikase und NTPase. Die aminoterminal Domäne des NS3-Proteins beinhaltet eine Serinprotease, die zur Chymotrypsin Familie gezählt wird (Lesk et al., 1996). Durch Sequenzvergleiche mit anderen Gattungen der Flaviviren konnten drei hoch konservierte Aminosäuren an den Positionen His-1083, Asp-1107 und Ser-1165 des

HCV-Genoms identifiziert werden. Diese bilden die sogenannte katalytische Triade der Serinprotease (Chambers et al., 1990). Nachdem die Abspaltung vom NS2 noch autokatalytisch geschieht, wird für die Spaltung von NS3/4A, NS4A/4B und NS4B/5A und NS5A/5B das NS4A-Protein als Co-Faktor benötigt (Krekulova et al., 2006). Nach einer Heterodimerbildung mit dem NS4A-Protein katalysiert die NS3-Protease die Abspaltung aller nachfolgenden Nichtstrukturproteine (Neddermann et al., 1997). Additiv stabilisiert das NS4A-Protein die Struktur der Serinprotease (Failla et al., 1994).

Die Helikase und NTPase sind im carboxyterminalen Bereich des NS3-Proteins lokalisiert. Die Helikase wird benötigt, um die Sekundärstrukturen der Doppelstrang-RNA in 3'→5'-Richtung zu entwinden. Die erforderliche Energie wird durch die NTPase mittels Hydrolyse von Nukleosidtriphosphat (NTP) zur Verfügung gestellt (Morgenstern et al., 1997).

Allgemein wird dem NS3-Protein bei Flaviviren eine essentielle Bedeutung für die Virusreplikation zugeschrieben (Gallinari et al., 1998). Seit der genauen Analyse der kristallinen Struktur (Kim et al., 1996) ist in zahlreichen pharmakologischen Ansätzen versucht worden, spezifische Inhibitoren für die Serinprotease zu entwickeln. Einer dieser Inhibitoren, ein an die katalytische Domäne des NS3-Proteins bindendes synthetisches Peptid, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation näher untersucht werden.

Das relativ kleine NS4A-Protein stellt einen wichtigen Kofaktor für die NS3-Protease dar. Das Molekulargewicht liegt bei insgesamt 54 Aminosäuren bei 8 kDA. Gemäß seines Hydrophobizitätsprofils wird das NS4A-Protein in drei Regionen mit unterschiedlichen Funktionen eingeteilt. Region I (AS 1-20) scheint eine Transmembran- $\alpha$ -Helices auszubilden (Rost et al., 1995) und die Bindung an NS3 zu vermitteln (Bartenschlager et al., 1995). Die Region II (AS 21-34) soll eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ausbilden (Tomei et al., 1996); ihr wird eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Serinproteaseaktivität vom NS3 zugeschrieben (Butkiewicz et al., 1996). Die Region III (AS 35-54) ist stärker hydrophil. Für sie wird eine  $\alpha$ -helikale Konformation prädiziert. Des Weiteren wird angenommen, dass das NS4A-Protein wahrscheinlich die Bildung von membranassoziierten Replikationskomplexen ermöglicht (Moradpour et al., 2003), indem es mit der ER-Membran assoziiert (Hugle et al., 2001).

Die Funktion des 27 kDa großen NS4B-Proteins konnte noch nicht vollständig charakterisiert werden. Vermutlich induziert und verankert das NS4B-Protein mit seinen mindestens 4 Transmembranösen Domänen jedoch den viralen Replikationskomplex am ER. Dort induziert es licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbare Alterationen des ER, die als „membranous web“ bezeichnet werden. In diesem wurden sowohl sämtliche Virusproteine als auch RNA von positiver und negativer Polarität nachgewiesen (Gosert et al., 2003; Lindstrom et al., 2006; Welsch et al., 2007).

Das NS5A-Protein kommt in einer 56 kDa und einer hyperphosphorylierten 58 kDa großen Form vor (Koch et al., 1999). Die Phosphorylierung erfolgt hauptsächlich durch zahlreiche Caseinkinasen an Serinresten, weniger häufig an Threonin (Reed et al., 1999). Die biologische Funktion dieser Modifikation ist noch nicht eindeutig erklärt (Hirota et al., 1999). Jedoch scheint die HCV-Replikation durch den Phosphorylierungsstatus von NS5A moduliert werden zu können. So konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der hyperphosphorylierten Form zu einer Steigerung der HCV-Replikation führt (Appel et al., 2005). Kürzlich wurde die erste von 3 Domänen des NS5A Protein kristallographisch dargestellt (Tellinghuisen et al., 2005).

Des Weiteren scheint das NS5A-Protein eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit der IFN assoziierten, antiviralen Wirkung einzunehmen. Besondere Bedeutung kommt hierbei einem 40 AS langen Sequenzabschnitt (AS 2209-2248) zu, der als Interferon-Sensitivity-Determining-Region (ISDR) bezeichnet wird (Enomoto et al., 1995; Enomoto et al., 1996). Funktionell wurde eine doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (PKR)-bindende Domäne beschrieben, die die ISDR beinhaltet (Korth et al., 2000), was jedoch in Folgeuntersuchungen bei fehlender Kopräzipitation des NS5A und der PKR nicht bestätigt werden konnte. Multiple Mutationen im Bereich der ISDR waren mit einem virologischen Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie korreliert (Wohnsland et al., 2007).

Die Bindung von E2-, bzw des NS5A-Protein an den PKR-Rezeptor führt zu einer Aktivitätsminderung des Rezeptors selbst. Als Folge dessen ist die Apoptosebereitschaft der Zelle herabgesetzt (Ghosh et al., 2000a; Majumder et al., 2002; Taylor et al., 1999). Das NS5A-Protein interagiert zudem mit einer Vielzahl zellulärer Proteine (z.B. hVAP-33, SRCAP, snare-like Protein) deren Bedeutung Bestandteil zahlreicher Studien ist (Ghosh et al., 2000b).

Die NS5B-Region weist zwischen verschiedenen Genotypen eine spezifische Variabilität auf. Diese Heterogenität wurde genutzt, um jenes Klassifikationssystem zu etablieren, nachdem die HCV-Isolate in Genotypen und Subtypen eingeteilt werden (Simmonds et al., 1993). Das NS5B-Protein selbst hat ein Molekulargewicht von 68 kDa und entspricht in seiner Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp). Diese synthetisiert einen komplementären Gegenstrang zur viralen Plusstrang-RNA, welcher im weiteren Verlauf als Matrize für die Bildung weiterer Plusstränge dient. Die kristallisierte Form des NS5B-Proteins erinnert an die Gestalt einer Hand. Die „Finger“ stellen hierbei verschiedenen Domänen dar (Lesburg et al., 1999). Das NS5B Protein ist Ziel neuer, spezifischer nukleosidischer und nicht-nukleosidischer Enzyminhibitoren im Rahmen neuer antiviraler Therapiestrategien.

## **4.7 Klinik**

Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 180 Tagen führt das HCV zu einer diffusen Leberentzündung (Alberti, 1991). Bei ca. 75% der Infizierten verläuft die akute Hepatitis asymptomatisch oder es entwickeln sich nur unspezifische Symptome. Lediglich bei etwa 25% der Erkrankten zeigen sich nach diesem Prodromalstadium mit grippalen Symptomen, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und gastrointestinalen Beschwerden, typische Zeichen einer hepatischen Organmanifestation. Diese ist oft gekennzeichnet durch Hepatomegalie, Ikterus und Pruritus. Im Labor ist meist nur eine mäßige Erhöhung der Transaminasen festzustellen. Nur äußerst selten kommt es zu einem fulminanten Verlauf.

In 50–85% der Fälle geht die Infektion in ein chronisches Stadium über, das sich klinisch wiederum unspezifisch präsentiert. Der Nachweis von HCV-RNA im Serum über 6 Monate definiert die Chronizität der Erkrankung. Ähnlich wie im Prodromalstadium klagen die Patienten über pathologisch erhöhte Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit, diffuse Oberbauchschmerzen, Pruritus und Gelenkbeschwerden. Typisches laborchemisches Charakteristikum ist eine - oft fluktuierende - Erhöhung der Transaminasen. Der natürliche Verlauf der chronischen Hepatitis C ist nicht genau bekannt. Über einen Zeitraum von ca. 30 Jahren entwickelt sich jedoch bei etwa 20% der chronisch Erkrankten eine Leberzirrhose (Seeff et al., 2003) (Ferenci et al., 2007). Mit einer jährlichen Rate von 1 bis 5% haben Patienten mit einer HCV induzierten Leberzirrhose ein erhöhtes Risiko ein

hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln (Hoofnagle, 1997). Im chronischen Stadium stellt die spontane Elimination des Virus eine Rarität dar. Mögliche extrahepatische Manifestationen der chronische HCV-Infektion sind: Kryoglobulinämie-Syndrom mit Arthralgien, vaskulitischer Purpura, Polyneuropathie und / oder membranoproliferativer Glomerulonephritis, lymphoproliferative Erkrankungen, Sicca- (Sjögren-) Syndrom, Lichen ruber planus und Porphyria cutanea tarda (Manns et al., 2001) (Zignego et al., 2007).

## **4.8 Diagnostik**

Aufgrund der hohen Dunkelziffer der HCV-Infektionen empfiehlt das Robert Koch-Institut bei unspezifischen körperlichen Symptomen die laborchemische Bestimmung der Leberfunktionsparameter. Auch bei nur leicht erhöhten Transaminasen sollte anschließend ein HCV-Antikörpertest erfolgen. Bei den Transaminasen handelt es sich um die Alanin-Aminotransferase (ALT oder ALAT; früher Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GPT) und die Aspartat-Aminotransferase (AST oder ASAT; früher Glutamat-Oxalazetat-Transferase, GOT). Erhöhte Transaminasen sind Ausdruck einer Zellpermeabilitätsstörung oder eines Zelluntergangs. Die ALT stammt aus Zytoplasma der Hepatozyten, die AST aus Zytoplasma und Mitochondrien von Hepatozyten, Herzmuskel- und Muskelzellen. Bei Verdacht auf Vorliegen einer HCV-Infektion erfolgt als Standarddiagnostik somit zunächst der Nachweis spezifischer Antikörper gegen HCV-Proteine mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Hierbei macht man sich die spezifische Bindungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper zunutze und koppelt diese an eine enzymgesteuerte Farbreaktion. Die Sensitivität und Spezifität der derzeit zur Verfügung stehenden serologischen Enzymimmunoassays der 3. Generation (EIA3) liegen bei 97–99% (Colin et al., 2001). In der Regel können bereits 4 bis 6 Wochen nach Erstinfektion Antikörper nachgewiesen werden. In Einzelfällen kann das Zeitintervall bis zur Serokonversion aber bis zu 6 Monate betragen. Im Falle eines positiven anti-HCV-Screeningtests und bei v.a. akute Hepatitis C muss die HCV-RNA im Serum bestimmt werden. Hierdurch ist eine Unterscheidung zwischen einer abgelaufenen Infektion mit persistierenden Antikörpern bei fehlendem Nachweis von HCV-RNA im Serum und einer akuten als auch persistierenden Infektion mit Nachweis von Antikörpern und HCV-RNA im Serum möglich. Der HCV-RNA-Nachweis erfolgt über einen hochsensitiven (untere Nachweisgrenze unter 10-50 IU/ml) molekulargenetischen

Test, der meist auf PCR-Technologie basiert. Falls der PCR-Befund bei nachweisbaren anti-HCV-Antikörpern negativ ausfällt, sollte die PCR nach 3 bis 6 Monaten wiederholt werden, um einen Verlauf mit nur intermittierend unter der Nachweisgrenze liegender Viruslast auszuschließen. Bei Neugeborenen sollte bei Infektion der Mutter generell eine PCR erfolgen, da maternale Antikörper bis zu 18 Monate post partum im kindlichen Blut detektierbar sein können.

Bei chronischen Verläufen kann eine Leberbiopsie zur Beurteilung der entzündlichen Aktivität (Grading) und des Fibrorestadiums (Staging) sinnvoll sein (Gebo et al., 2002).

Vor Einleitung einer antiviralen Therapie sollte überprüft werden, ob konkordante Lebererkrankungen (Hepatitis A, B/D, E, hereditär/metabolische, autoimmune, exogen-toxische Hepatopathie) oder Koinfektionen (HIV-Infektion) vorliegen.

## 4.9 Therapie

Therapieziel sowohl bei akuter als auch bei chronischer Hepatitis C ist der fehlende Nachweis von HCV-RNA im Serum 24 Wochen nach Therapieende (anhaltendes virologisches Ansprechen, sustained virologic response; SVR).

Zur Behandlung der Hepatitis C sind folgende Medikamente in Deutschland zugelassen:

- Interferon- $\alpha$ 2a (Roferon®) zugelassene Dosierung: 3 x 3-4,5 MIU pro Woche alleine oder in Kombination mit Ribavirin
- Interferon- $\alpha$ 2b (Intron A®); zugelassene Dosierung: 3 x 3 MIU pro Woche alleine oder in Kombination mit Ribavirin
- Peginterferon- $\alpha$ 2a (Pegasys®); zugelassene Dosierung: 180  $\mu$ g einmal pro Woche allein oder in Kombination mit Ribavirin
- Peginterferon- $\alpha$ 2b (PegIntron®); zugelassene Dosierung: 0,5-10  $\mu$ g/kg Körpergewicht (KG) einmal pro Woche in der Monotherapie und 1,5  $\mu$ g/kg KG einmal pro Woche in Kombination mit Ribavirin
- Ribavirin (Rebetol®); zugelassene Dosierung: 800 mg/Tag für Patienten mit einem KG < 65 kg, 1000 mg/Tag für Patienten mit einem KG von 65–85 kg,

1200 mg/Tag für Patienten über 85 kg KG, 1400 mg/Tag für Patienten ab 105 kg KG

- Ribavirin (Copegus®); zugelassene Dosierung: Genotyp HCV-1: 1000 mg/Tag für Patienten < 75 kg KG, 1200 mg/Tag für Patienten ≥ 75 kg KG; bei Genotyp HCV-2/3 800 mg/Tag unabhängig vom KG

#### - Interferon- $\alpha$ (IFN)

Bei Interferon- $\alpha$ 2a und Interferon- $\alpha$ 2b handelt es sich um Glykoproteine, die dem natürlichen Interferon- $\alpha$ 2 entsprechen. Sie werden rekombinant hergestellt und unterscheiden sich untereinander nur in einer Aminosäure. Interferone haben antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Aktivität (Zeuzem, 2004). Es wird vermutet, dass durch Induktion von zellulären Enzymen die virale Proteinsynthese gestört wird. Höchstwahrscheinlich hemmt Interferon die virale RNA-Transkription und -Translation und verstärkt die zelluläre Immunantwort (Shin et al., 2006; Takeda et al., 2004).

#### - Pegyliertes Interferon- $\alpha$ (PEG-IFN)

Durch Kopplung des Interferons an ein Polyethylenglykol-Molekül (PEG) wird die Immunogenität gegen den Wirkstoff verringert, eine signifikant höhere Proteasestabilität erzielt und die renale Clearance erniedrigt. Halbwertszeit und Wirkdauer sind im Vergleich zu nicht pegylierten Interferonen verlängert, so dass eine einmal wöchentliche subkutane Applikation ausreichend ist (Kozlowski et al., 2001). Es sind zwei verschiedene pegylierte Formen von Interferon- $\alpha$ 2 verfügbar. Interferon- $\alpha$ 2a ist mit einem 40-kDa-verzweigt-kettigen Methoxy-PEG-Molekül kovalent verbunden (Zeuzem et al., 2001). Interferon- $\alpha$ 2b hingegen ist mit einem 12-kDa-linear-aufgebauten PEG-Molekül konjugiert (Wang et al., 2002).

#### - Ribavirin (RBV)

Bei Ribavirin handelt es sich um ein oral verfügbares Guanosinanalogen. Es besitzt eine virostatistische Aktivität gegen verschiedene DNA- und RNA-Viren (Adeno-, Influenza-, Parainfluenzaviren, Respiratory-Syncytial-Virus (RSV)). In der Monotherapie konnte keine Wirksamkeit von Ribavirin gegen das HCV nachgewiesen werden (Bodenheimer et al., 1997; Di Bisceglie et al., 1995). Für

den Einsatz bei der HCV-Infektion werden 4 verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert (Wohnsland et al., 2007). Der genaue Wirkmechanismus in der Kombinationsgabe mit IFN ist bisher jedoch nicht geklärt (Lau et al., 2002).

Als Standardtherapie bei akuter Hepatitis C gilt zurzeit die 24-wöchige Gabe von (Peg-)IFN. In zirka 94% aller Fälle kann ein SVR induziert werden. Allerdings liegt das virologische Ansprechen über einen längeren Zeitraum nur bei 89% (Wiegand et al., 2006). Patienten mit akuter Hepatitis C sollten deswegen weiterhin in kontrollierten Therapieprotokollen behandelt werden. In aktuellen Studien wird unter anderem der Stellenwert einer Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin evaluiert (Kamal et al., 2004). Bei symptomatischen Verläufen einer akuten Infektion wurde ein höherer Anteil an spontanem Verlust von HCV-RNA im Serum beobachtet als bei einem asymptomatischem Verlauf (Gerlach et al., 2003). Es herrscht bislang Uneinigkeit bezüglich des optimalen Behandlungszeitpunktes, da es einerseits gilt eine Chronifizierung zu verhindern (Kamal et al., 2006), aber andererseits aufgrund des relevanten Nebenwirkungsprofils der Standardmedikamente eine unnötige Behandlung zu vermeiden ist. Eine bis zu 3-4 Monate abwartende Haltung scheint die Ansprechraten möglicherweise nicht zu verringern (Jaeckel et al., 2001).

Bei einer chronischen HCV-Infektion, die durch den Nachweis von HCV-RNA im Serum über mehr als 6 Monate gekennzeichnet ist, gilt zurzeit als Standard eine Behandlung mit PEG-IFN in Kombination mit Ribavirin in Abhängigkeit von Genotyp, Ausgangsviruslast und Viruskinetik unter Therapie über 24 (Genotyp 2, 3) oder 48 Wochen (Genotyp 1) (Fried et al., 2002; Hadziyannis et al., 2004; Zeuzem, 2004). Durch die Einführung der Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin konnten die dauerhaften virologischen Ansprechraten bei HCV-Genotyp-1b-Infektion auf 48–52% gesteigert werden (Zeuzem et al., 2006).

Als negative Prädiktoren für das Erreichen eines SVR wurden auf Basis multifaktorieller Analysen in klinischen Studien folgende Faktoren identifiziert (Reichard et al., 1998; Poynard et al., 1998):

- HCV-Genotyp 1-Infektion
- Männliches Geschlecht
- Alter > 40 Jahre

- Hohes Körpergewicht/ hoher BMI
- Fortgeschrittene Fibrose/ Zirrhose
- Erhöhter  $\gamma$ GT-Wert im Serum vor Therapiebeginn
- Hohe Viruslast (HCV-RNA > 800 000 IU/ml)

Bei einer Infektion mit den HCV-Genotypen 2 oder 3 ist mit einem Ansprechen der Therapie nach aktueller Studienlage in 79–82% der Fälle zu rechnen (Zeuzem, 2004). Das Nebenwirkungsprofil der Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin ist komplex und begrenzt häufig die optimale Dosis bzw. Therapiedauer. Sehr häufige Nebenwirkungen - gemäß Fachinformation (> 10%) sind: Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Depressionen, Myalgien, Arthralgien, Alopezie, Pruritus und Dermatitisen. Häufige Nebenwirkungen (1-10%) sind: Leukopenie, Thrombopenie, Anämie, Stimmungsschwankungen, Konzentrationsschwäche, Appetitlosigkeit, Infektionsneigung, Hypo- oder Hyperthyreose, Neurologische und kardiale Störungen, Impotenz. Gelegentliche/ seltene Nebenwirkungen (0,01-1%) sind: Induktion von Autoimmunerkrankungen, massive Verschlechterung der Leberfunktion und schwere depressive, psychotische Veränderungen.

Wichtige absolute oder relative Kontraindikationen sind: Schwangerschaft/Stillzeit, fortgeschrittene dekompensierte Leberzirrhose (Child-Phugh B/C), schwere kardiopulmonale (NYHA III-IV) oder vaskuläre Erkrankung, Autoimmunerkrankungen, psychiatrische Erkrankungen sowie schwere Zytopenien. Besonderes Augenmerk ist auf die Schilddrüsenfunktion zu richten, da unter Therapie sowohl Hypo- als auch Hyperthyreosen auftreten können.

Ribavirin kann zudem eine klinisch relevante Anämie induzieren. Aufgrund der Nebenwirkungen erfolgen in ungefähr 40% Dosisreduktionen, in 14–22% ist ein vorzeitiger Therapieabbruch notwendig (Fried et al., 2002; Manns et al., 2001).

Die sogenannte Therapieadhärenz ist ausschlaggebend für ein optimales Behandlungsergebnis. Gemäß der 80/80/80-Regel sollten mindestens 80% der empfohlenen PEG-Interferon-Dosis und 80% der Ribavirin-Dosis über mindestens 80% der vorgesehenen Therapiedauer appliziert werden, da sonst das dauerhafte virologische Therapieansprechen signifikant sinkt. Hierbei scheint die Adhärenz in den ersten Wochen der Therapie eine größere Bedeutung zu haben als gegen Ende (McHutchison et al., 2002).

### 4.9.1 Neue Therapieansätze

Die Erfolgsquote der Kombinationstherapie ist insbesondere für eine HCV-Genotyp 1-Infektion weiterhin unbefriedigend. Zudem wären besser verträgliche Therapieregime bei zumindest gleichen therapeutischen Chancen wünschenswert.

Folgende Strategien werden verfolgt:

1. Weiterentwicklung von Interferonen
2. Entwicklung Ribavirin-ähnlicher Substanzen
3. Entwicklung neuer antiviraler Substanzen (Zielenzyme)
4. Immuntherapien

Besondere Bedeutung bei der Entwicklung von so genannten spezifisch gezielten antiviralen Therapien für HCV („specifically targeted antiviral therapies against hepatitis C“; STAT-C) kommt Proteaseinhibitoren zu. Die Prozessierung des viralen Polyproteins wird durch zelluläre Peptidasen, durch virale Proteasen und im Besonderen der HCV-NS3-Serinprotease katalysiert. Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur dieser NS3-Serinprotease ermöglichten die Entwicklung von sogenannten HCV-Proteaseinhibitoren. Sie blockieren die von der NS3/NS4A-Protease abhängige Spaltung des HCV Polyproteins.

Einige dieser peptidomimetischen Inhibitoren der NS3-4A-Protease wurden in HCV-Replikonmodellen identifiziert und in klinischen Studien untersucht. Als erste Substanz wurde der NS3-Serin-Proteaseinhibitor BILN-2061 (Boehringer Ingelheim, Biberach, Deutschland) in klinischen Studien evaluiert. Er führte bei mit HCV-Genotyp 1 infizierten Patienten bereits nach zwei Tagen zu einem schnellen Absinken der HCV-Plasmakonzentration (Hinrichsen et al., 2004; Lamarre et al., 2003; Reiser et al., 2005). Dabei ist eine dosisabhängige Reduktion der Viruslast zu beobachten, die für die Dosis von 200 mg pro Verabreichung nach 48 Stunden mehr als zwei  $\log_{10}$ -Stufen bei allen Patienten betrug. Bei Patienten mit einer Genotyp 2- oder 3-Infektion zeigten sich hingegen deutlich geringere Ansprechraten (Reiser et al., 2005) (Richman, 2006). Die weitere Entwicklung dieser Substanz wurde allerdings aufgrund einer Kardiotoxizität im Tiermodell gestoppt (Reiser et al., 2005). Ein weiterer Proteaseinhibitor, SCH 503034 (Boceprevir; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) führte ebenfalls zu einer Verringerung der HCV-RNA-Plasmakonzentration um mehr als zwei  $\log_{10}$ -Stufen nach einer Monotherapie über 14 Tage (Sarrazin et al., 2007).

Der von der Firma Vertex Pharmaceuticals entwickelte Proteaseinhibitor VX-950, (Telaprevir, Vertex Pharmaceuticals Incorporated, Cambridge, MA, USA) hat im HCV-Replikonsystem ein hohes Potenzial gezeigt und wird im Folgenden gesondert dargestellt.

#### **4.9.2 Telaprevir (VX-950)**

Telaprevir (VX-950) ist ein oraler, selektiver, peptidomimetischer Inhibitor der HCV NS3/NS4A-Serinprotease, der in präklinischen *in vitro*-Studien eine sehr gute antivirale Aktivität sowohl bei Genotyp 1a als auch 1b gezeigt hat (Perni et al., 2006). Nachdem im Replikonmodell (HCV-Genotyp 1b) eine Reduktion der HCV-RNA-Konzentration beobachtet werden konnte, zeigte sich auch ein gutes antivirales Ansprechen bei humanen, fetalen Hepatozyten, die mit Genotyp 1a-positiven Patientensera inkubiert wurden (Perni et al., 2006). VX-950 bildet mit der NS3-A4-Protease von HCV-Genotyp 1a einen kovalenten, aber reversiblen Komplex mit einer dauerhaften Inhibitionskonstante ( $K_i^*$ ) von 7 nM. Die Dissoziation dieses kovalenten Enzyminhibitorkomplexes aus VX-950 und der HCV Genotyp 1a-Protease hat eine biologische Halbwertszeit von etwa einer Stunde. Nach einer zweiwöchigen Inkubation von Replikonzellen mit VX-950 konnte eine Reduktion der HCV-RNA-Konzentration von über vier  $\log_{10}$ -Stufen beobachtet werden. Trotz Absetzen des Inhibitors kam es zu keinem Wiederanstieg der viralen RNA (Lin et al., 2004). In tierexperimentellen Studien zeigte VX-950 ein günstiges pharmakokinetisches Profil mit hoher Konzentration in der Leber. Speziell bei einem HCV-Protease-Modell mit Mäusen könnte eine Inhibition der NS3/4A-Proteaseaktivität in der Leber gezeigt werden.

Generell muss ein Medikament, bevor es zugelassen wird, mehrere Entwicklungsphasen durchlaufen. Zuerst werden Substanzen in einer präklinischen Phase im Labor und im Tiermodell getestet. Zeigt sich hier eine spezifische Wirksamkeit ohne relevante Nebenwirkungen, so kann die Substanz in einer Phase I-Studie getestet werden. Meist an gesunden Probanden werden initial in niedrigen Dosierungen die allgemeine Verträglichkeit, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Testsubstanz sowie mögliche Nebenwirkungen untersucht. Auch können schon in geringem Umfang Patienten in die Testung miteinbezogen werden. Verläuft diese Phase positiv, werden im nächsten Schritt eine größere Gruppe von Patienten mit

der neuen Substanz behandelt um die längerfristige Verträglichkeit, die Ansprechraten und das optimale Therapieregime zu definieren (Phase II-Studie). Zuletzt wird in einer Phase III-Studie die Substanz mit der bisherigen Standardbehandlung über einen ausreichenden Zeitraum bei einer großen Patientenpopulation verglichen. An die Zulassung und Markteinführung schließen sich meist Studien der Phase IV an. In ihnen werden Arzneimittel unter breiter Anwendung und Routinebedingungen auf Langzeitwirkung, Wirksamkeit, Verträglichkeit, sowie auf mögliche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten geprüft.

Das Hauptproblem bei der Entwicklung von STAT-C könnte äquivalent zu anderen Virusinfektion wie der HIV-Infektion die Entstehung von Medikamenten-resistenten Virusstämmen sein. Durch die hohe Replikationsrate des HCV und die fehleranfällige RNA-abhängige RNA-Polymerase entsteht wie oben beschrieben eine virale Quasispezies. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von resistenten Varianten steigt mit der Höhe der Viruskonzentration und der Komplexität der Quasispezies. Unter dem Selektionsdruck einer antiviralen Therapie können resistente Varianten einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp aufweisen, so dass es zu einer Veränderung der Quasispezies mit der Folge einer Resistenzentwicklung kommen kann. Bereits *in vitro* konnte eine solche Resistenzentwicklung bei Telepravir nachgewiesen werden (Lin et al., 2004; Lu et al., 2004; Trozzi et al., 2003; Yi et al., 2006;).

## 4.10 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die genotypische Analyse der dynamischen Veränderung der Quasispezies unter Therapie mit dem Proteaseinhibitor Telepravir im Rahmen einer Phase 1b-Studie. Hierzu wurde eine hochsensitive, klonale Sequenzierungsmethode etabliert. Besonderes Augenmerk bei der Analyse der Daten lag auf der potenziellen Entwicklung resistenter Varianten, zumal solche im Replikonmodell bereits beschrieben waren. Zudem sollte die Wirksamkeit der Substanz *in vivo* unter besonderer Berücksichtigung von möglichen Resistenzentwicklungen untersucht werden. Anhand der Daten sollten mögliche Mechanismen detektiert werden, die Genommutationen zugrunde liegen. Zudem wurde analysiert, in wieweit eventuell identifizierte, virale Varianten einen Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp haben

und gegebenenfalls wie sich bestimmte Mutationen auf die klinisch messbare virale Replikationseffizienz auswirken.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Patientenpopulation und Studienaufbau

Eine randomisierte, doppel-blind, Plazebo-kontrollierte Studie mit 34 Patienten wurde an zwei Studienorten (Amsterdam Medical Center, Niederlande und Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Innere Medizin II, Deutschland) durchgeführt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen erhielten die Probanden in einer Phase 1b-Studie mehrere Dosen des Wirkstoffes VX-950 (Telaprevir). Die Behandlung erfolgte unter stationären Bedingungen. Im Studiendesign wurden drei verschiedene Dosierungen evaluiert: 10 Patienten erhielten 450 mg alle 8 Stunden, 8 Patienten 750 mg alle 8 Stunden und 10 Patienten 1250 mg alle 12 Stunden. In jeder Gruppe erhielten zudem 2 Patienten ein Placebo (Reesink et al., 2006).

Bei allen Patienten lag eine chronische HCV-Genotyp 1a/1b-Infektion vor. Es wurden Patienten ohne Vortherapie als auch solche mit Rückfall oder fehlendem Ansprechen auf eine vorangegangene Behandlung mit PEG-Interferon und Ribavirin eingeschlossen. Die Konzentrationen der HCV-RNA im Blut vor Therapiebeginn lagen bei  $10^5$  IU/ml oder höher. Eine Koinfektion mit HBV oder HIV-1/2 waren Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie.

Die Studie wurde nach den Richtlinien der „Good Clinical Practice“ und der 1975 verfassten Deklaration von Helsinki durchgeführt. Für die genotypische Analyse wurden die Blutproben der Patienten gesammelt und nach Abnahme und Zentrifugation das Serum bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurden die Proben vor Beginn der Therapie („Baseline“), nach Ende der Therapie (Tag 14) und während der Nachbeobachtung („Follow-up“) zwischen 7 und 10 Tagen nach Einnahme der letzten Dosis verwandt.

Die klinische Prüfung erfolgte ebenfalls an zwei Standorten. Um einen Bias zu vermeiden, sah das Protokoll vor, dass in unserem Labor lediglich Proben des anderen Studienzentrums analysiert werden durften. Die für die Untersuchung der NS3/4A-Protease notwendigen Amplifikations- und Sequenzierungsmethoden wurden in unserem Labor etabliert und identisch für die Analyse aller 34 Proben verwendet.

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich, wenn nicht anders erwähnt, auf eine Subgruppe von 15 Patienten, die aus allen 3 verschiedenen Behandlungsgruppen

stammen und deren Proben im Universitätsklinikum des Saarlandes im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit analysiert wurden.

### 5.1.2 Geräte und Einwegmaterialien

Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL, Karlsruhe
Analysenwaagen	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Einwegeskalpell	B. Braun, Melsungen
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Foto-Apparatur	Polaroid, Cambridge, England
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich
Mikrowellenofen	Hettachi, Eschborn
Petrischalen (Ø 10 cm)	Falcon, Heidelberg
pH-Messgerät	Knick Calimatic, Essen
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Basic MCBB100	Sartorius, Göttingen
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Certomat U, B. Braun, Berlin
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Kapillar-Elektrophorese-	
Sequenzierautomat, 310 und 3100	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektralphotometer U-2000	Hitachi, Tokio, Japan
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products, California, USA
Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Rotilab®-Mini Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York, USA

### 5.1.3 Allgemeine Chemikalien

Agarose peqGold Universal	PeqLab, Erlangen
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Nukleotid-Mix dNTPs (250 µM je dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Reinstwasser	Braun, Melsungen
RNase freies Wasser (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Trypton (Bakterienmedium)	Sigma, Taufkirchen

### 5.1.4 Fertige Reagenzien-Sets

Accuprime Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
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 Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III One-Step RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 5.1.5 Weitere Reagenzien

Spezifische Primer

Invitrogen, Karlsruhe

### 5.1.6 DNA-Längenstandards

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

Fragmentlängen in bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2642

### 5.1.7 Oligonukleotide

#### 5.1.7.1 Standardprimer für RT-, Seminested- und Sequenzierungs-PCR

Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme, wie beispielsweise die DNA-Polymerase, dienen. Primer können sowohl aus DNA als auch aus RNA bestehen.

Die folgenden Primer wurden auf der Grundlage der Sequenz von verschiedenen HCV Prototypen zur Amplifikation des NS3 Protease Genabschnitts ausgewählt.

Name	Sequenz (5'→3')	Start	Ende
<b>NS3-1b-1s</b>	ggcgtgtggggacatcatc	3302	3320
<b>NS3-1b-3a</b>	ggtggagtacgtgatggggc	4214	4195
<b>NS3-1b-4a</b>	catatacgtctccaaagccca	4133	4113

Tab. 2: Start- und Endpositionen der Primer nach dem Prototyp HCV-J (Kato et al., 1990a).

#### 5.1.7.2 Spezifische Primer für die HCV-Isolate 2106, 2107, 2207, 2309

Bei den unten aufgeführten Proben konnte mit den Standardprimern die Zielsequenz nicht amplifiziert werden. Als wahrscheinlichste Ursache sind Abweichungen in der Sequenz der Primerbindungsregion bzw. der Sekundärstruktur der RNA im Bereich der Primerbindungsregion in den entsprechenden Proben anzusehen. Deswegen wurden in diesen Fällen individuell Primer mit einer abweichenden Zielsequenz konstruiert. Hierzu musste zuerst die Zielsequenz ermittelt werden. Dies geschah mittels Primerpaaren, die außerhalb der zu ermittelnden Zielsequenz lagen. Nach

PCR und Sequenzierung wurde diese ermittelt und spezifische Primer für die Bindungsregion synthetisiert.

Name	Sequenz (5'→3')	Start	Ende
2106 1s	tggcgtgggggacatcatc	3300	3320
2106 1a	gaccaaagtacctgtacc	4090	4072
2106 2a	gacctgggtctctgccgc	4049	4030
2107 1s	gtggggacatcatctcgggt	3307	3326
2107 1a	ggccacttgggaatgtctgc	4007	3989
2207 1s	tggcgtggggggacatcatc	3301	3320
2207 1a	gccgtagggggcgttagat	4201	4182
2207 2a	gaaagcctgcggtacagccg	4070	4051
2309 1s	ggcgtgtggggaatcat	3302	3318
2309 1a	actgccgctgccagtg	4038	4022
2309 2a	ctgcggcacggccggag	3992	3976

Tab. 3: Spezifische Primer für ausgewählte Proben nach dem Prototyp HCV-J (Kato et al., 1990a).

### 5.1.8 Bakterien

Bei den verwendeten Bakterien handelte es sich um chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E.coli*) der Firma Invitrogen (Hilden, Deutschland).

Stamm	Genotyp
Top 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Tab. 4: Spezifizierung der verwendeten Bakterien.

## 5.1.9 Medien

### 5.1.9.1 Bakterienkulturmedien

Die aufgeführten Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, und für 20 Minuten bei 1.3 bar autoklaviert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Medium

LB-Agar: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Medium, Zusatz von 7,5 g Agar.

LB-Selektionsmedien: Für die Herstellung von 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl eingewogen. Anschließend wurden die Reagenzien auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, unter ständigem Rühren aufgelöst und das Medium mit 0,1 n NaOH auf einen pH von 7,5 eingestellt. Zur Herstellung von Selektionsmedien wurde dem LB-Medium nach Autoklavierung und Abkühlung auf +50°C ein Antibiotikum zugesetzt (Kanamycin: 50 µg/ml). Das Antibiotikum wurde vorher als Stammlösung in tausendfacher Konzentration mit Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

## 5.1.10 Plasmide

### 5.1.10.1 pCR®4Blunt-TOPO®

Bei einem Vektor handelt es sich um einen DNA-Abschnitt, der gentechnisch so verändert wurde, dass die Integration von fremden DNA-Fragmenten und eine konsekutive Übertragung in eine weitere DNA möglich sind. Meist dienen Plasmide in Bakterien oder Viren als Vektoren. Für die Versuche wurde veränderte *E. coli*-DNA als Vektor verwendet, in die das aufgereinigte PCR-Produkt über Klonierung integriert wurde. Der pCR®4blunt-TOPO® Vektor ist ein linearisierter Vektor, an dessen 3'-Enden die *Vaccinia Virus* Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Diese Topoisomerase ist ein Enzym, das auf die Topologie der DNA Einfluss nimmt. Es entwindet die DNA so, dass sie in den Vektor integriert werden kann. Zudem vermittelt dieser Vektor eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin und Ampicillin.

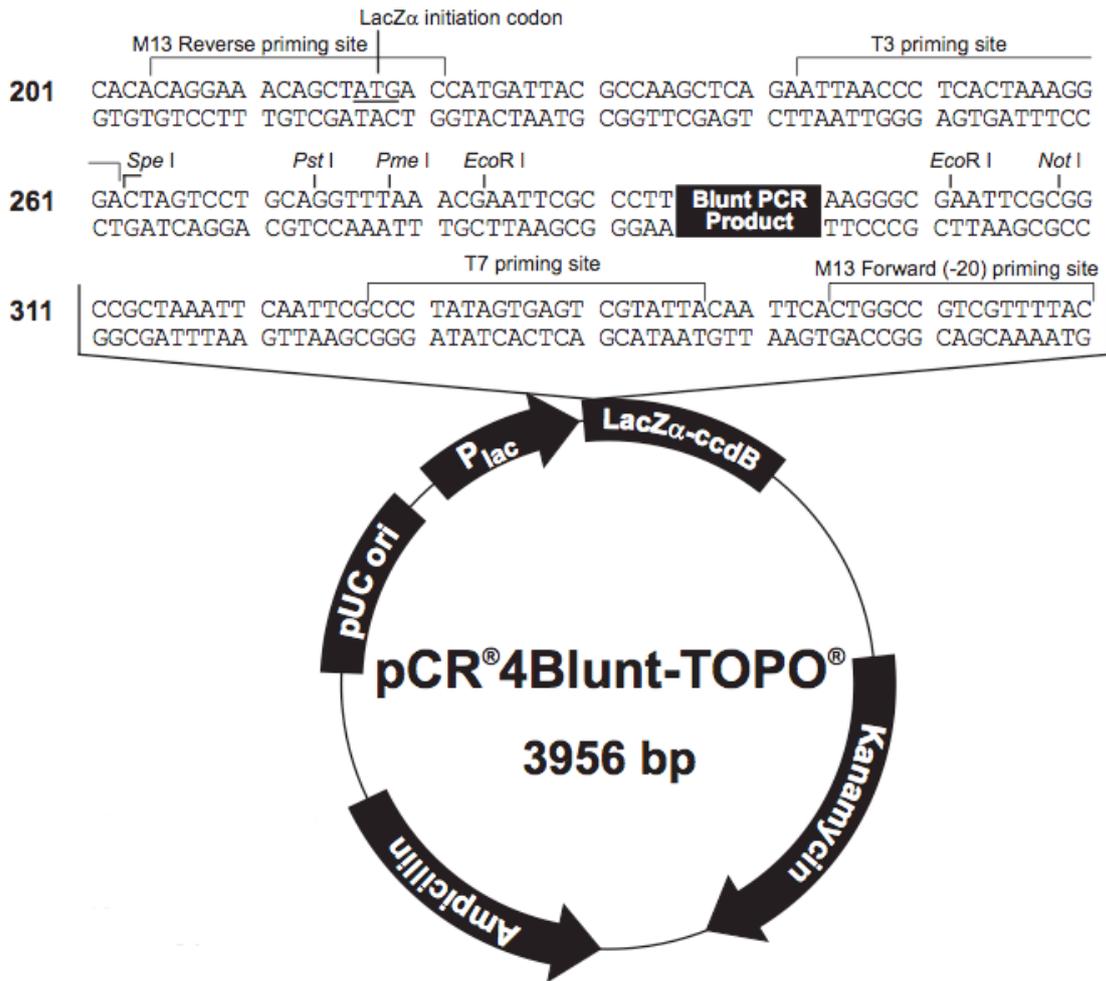


Abb. 3: Darstellung des Vektors pCR<sup>®</sup>-4Blunt TOPO<sup>®</sup>, in den die Sequenz des Protein NS3 Proteasegens kloniert wurde (aus Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Kloning Kit for Sequencing -Instruction Manuel, Invitrogen, Karlsruhe).

## 5.1.11 Puffer und Lösungen

### 5.1.11.1 Puffer für die Gelelektrophorese

TAE-Puffer, pH 8,3:

- 0,4 M Tris
- 0,2 M Na-Acetate (Trihydrat)
- 10 mM EDTA

TBE-Puffer, pH 8,3:

- 100 mM Tris
- 90 mM Borsäure
- 1 mM EDTA

Ladungspuffer für Proben: 2 g Bromphenolblau, 60 g Saccharose, 2 mmol EDTA und 36 g Harnstoff in 100 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert  
50 µl Aqua (DMPC), 50 µl Glycerin, 10 µl Loading-Dye (Fermentas)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Isolierung von DNA

Zu unterschiedlichen Therapietagen (siehe Abschnitt 5.1.1) erfolgte die Abnahme von je 10 ml Blut in einer Serummonovette. Die Proben wurden umgehend abzentrifugiert (10 Minuten, 3000 g). Das Serum aus dem Überstand wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren. Die RNA-Extraktion aus dem Serum erfolgte dann zu einem späteren Zeitpunkt standardisiert unter Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die eingesetzten Volumina ergaben sich aus dem Protokoll des Herstellers. Zunächst erfolgt hierbei chemisch eine Lyse der Viruspartikel; eventuell vorhandene RNasen wurden durch einen in dem Lysispuffer enthaltenen RNase-Inaktivator inaktiviert. Die freiwerdende virale RNA wurde an Silicagel-Membranen gebunden und anschließend eluiert. Für die Extraktion der HCV-RNA aus dem Serum der Patienten wurde dem AVL Puffer Carrier-RNA zugesetzt, die die Bindung der viralen RNA an der Säulenmembran verbessern und die Degradation der RNA durch RNasen verringern soll. Vor Beginn der Extraktion mussten die Serumproben auf Raumtemperatur erwärmt und der für die Lyse der Viren verwendete AVL-Puffer auf präzipitierte Carrier-RNA überprüft und, falls notwendig, bei +80°C inkubiert werden, um die Präzipitate in Lösung zu bringen. Die Lyse der Hepatitis-C-Viren erfolgte durch Inkubation von 140 µl Serum mit 560 µl AVL Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte der Zusatz von 560 µl Ethanol (96-100%), um die RNA in Lösung zu bringen. Durch kurzes Abzentrifugieren der Proben wurde Probenflüssigkeit an der Deckelinnenseite entfernt. Es wurden 630 µl der Probenmenge auf eine QIAamp-Säule aufgetragen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 8000 Umdrehungen pro Minute (UpM) für eine Minute. Diese Schritte wurden ein weiteres Mal wiederholt, um die verbliebene Probenmenge auf die Säule zu pipettieren. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils

500 µl Ethanol-Waschpuffer (AW1 + AW2) und einer anschließenden Zentrifugation der Proben bei 8000 UpM für eine Minute (AW1) bzw. 1400 UpM für drei Minuten (AW2) um Ethanolreste zu entfernen, die im weiteren Verlauf die enzymatische Reaktion während der PCR hemmen könnten. Die RNA wurde anschließend mit 50 µl AVE Buffer bzw. aqua dest. eluiert. Die Säulen mit den Proben wurden eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 UpM für eine Minute zentrifugiert. Die Extrakte wurden daraufhin bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotidsequenzen (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Hierdurch ist der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen möglich. Die PCR-Reaktion besteht aus repetitiven Zyklen von DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und -elongation. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von +94-96°C denaturiert. Anschließend lagern sich die zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen +50°C und +65°C an die DNA-Stränge an. Bei der Extension bindet dann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von +72°C an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert zum Originalstrang des Amplikons komplementäre DNA-Sequenzen. Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100%igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Mathematisch stellt sich dies wie folgt dar:

$$N=N_0 (1+E)^n$$

( $N$  = Anzahl der Kopien,  $N_0$  = Kopienzahl zu Beginn der Amplifikation,  $E$  = Amplifikationseffizienz der Reaktion ( $0 < E < 1$ ; wobei 0 = keine Amplifikation und 1 = maximale Amplifikation),  $n$  = Anzahl der PCR-Zyklen) (Kolmodin et al., 1997)

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der Praxis eine 100%ige Ausbeute pro Zyklus nicht zu erzielen ist. Vielmehr ist die Effizienz abhängig von der Amplifikatlänge; je kürzer das zu bildende Amplifikat ist, desto höher ist die Effizienz. In der Regel liegt der Wert für die Amplifikationseffizienz  $E$  zwischen 0,6 und 0,8. Bei 40 Reaktionszyklen kann man so eine bis zu  $10^8$ -fache Amplifizierung erreichen. Eine höhere Anzahl von Zyklen durchzuführen ist nicht sinnvoll, da es zu einer

Konkurrenzreaktion zwischen den DNA-Segmenten untereinander und den Primer/DNA-Segment-Hybriden kommen kann, die DNA-Polymerase bei hohe DNA-Konzentrationen ein Sättigungsprofil aufweist, die zugegebenen dNTPs verbraucht und außerdem die Wahrscheinlichkeit, das eine Verunreinigung anstelle der eigentlich Zielregion amplifiziert wird, deutlich zunimmt.

Bei der Auswahl der Primer ist zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperatur zwischen den eingesetzten Primern nicht größer als 2°C und zwischen +50°C und +60°C liegen sollte. Zudem sollte ein Primer möglichst 20-30 Nukleotide lang sein und zu mindestens 50% aus den Basen Guanin und Cytosin bestehen. Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein, da diese im Gegensatz zu Adenin und Thymin drei anstelle von zwei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden. Allerdings lassen sich diese Grundsätze der Primerauswahl nicht immer realisieren, wenn, wie im vorliegenden Fall, der Bereich der potentiellen Primer-Bindungsregion sehr kurz ist.

Im Folgenden sind die verschiedenen PCR-Protokolle dargestellt. Sämtliche Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Beim Ansatz wurde jeweils der Überschuss von einer Probe einkalkuliert. Die Enzyme wurden nur für die Zugabe zum Premix aus dem Gefrierfach (-20°C) entnommen und sofort danach wieder weggefroren. Nach der Zugabe der Enzyme wurde das nun vollständige Premix durchmischt und abzentrifugiert. Es wurde im Anschluss auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Danach erfolgte die Zugabe der RNA, bzw. DNA. Auch der Transport zum Thermocycler erfolgte auf Eis.

### **5.2.2.1 Verwendung von RNA als Ausgangsmaterial**

Vor Einsatz in eine PCR muss die RNA zunächst enzymatisch in eine einsträngige DNA (cDNA) transkribiert werden. Dies kann durch eine Reverse Transkriptase erfolgen. Erfolgen Reverse Transkriptase und nachfolgende PCR in einem Ansatz, spricht man von einer RT-PCR. Dieses Verfahren wurde im vorliegenden Fall angewandt.

### 5.2.2.2 Reverse Transkriptase und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)

Die Synthese von cDNA der aus den Serumproben extrahierten HCV-RNA erfolgte standardisiert (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Alle notwendigen Primer sind in einer 10 pmol/ $\mu$ l (10  $\mu$ M) Konzentration verwendet worden.

### 5.2.2.3 Nested-PCR/Seminested-PCR

Bei sehr niedriger Konzentration der Ziel-DNA im zu untersuchenden Material kann mit einer so genannten Nested-PCR die Sensitivität weiter gesteigert werden. Bei einer Nested-PCR werden sequenziell zwei Amplifikationsreaktionen durchgeführt. Nach der ersten PCR („outer PCR“) wird ein Aliquot des Amplifikats in eine zweite Amplifikationsreaktion eingesetzt. Diese zweite PCR („inner PCR“) wird mit zwei neuen Primern durchgeführt, die an Sequenzen innerhalb des ersten PCR-Produkts binden. Damit werden theoretisch nur spezifische PCR-Produkte der ersten Amplifikationsreaktion in der zweiten Reaktion selektiert. Alternativ ist es möglich, einen innen liegenden Primer zusammen mit einem Primer der ersten Reaktion in der zweiten PCR einzusetzen; diese Methode wird als Seminested-PCR bezeichnet. Im vorliegenden Fall wurden beide Verfahren durchgeführt, jedoch war das Standardverfahren die Seminested-PCR.

Komponente	Volumen in $\mu$ l
2x Reaction Mix Buffer	25,0
dH <sub>2</sub> O	8,0
Primer NS3-1b-1s (0,5 $\mu$ mol/l)	2,5
Primer NS3-1b-3a (0,5 $\mu$ mol/l)	2,5
Reverse Transkriptase/Taq (1,25 U/ $\mu$ l)	1,0
RNase Out (40 U/ $\mu$ l)	1,0
RNA-Eluat	10,0
Gesamtvolumen	50,0

Tab. 5: Outer PCR mit Verwendung der Primer NS3-1b-1s und NS3-1b-3a (Mengenangaben jeweils für eine Probe), Pipettierschema für RT-PCR.

Nachfolgend erfolgte die Amplifikation in einem Perkin Elmer Thermocycler® (Weiterstadt, Deutschland).

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen	Reaktion
+47°C	30 min	1	Reverse Transkriptase
+94°C	3 min	1	Denaturierung
+94°C	30 sec	30	Denaturierung
+51°C	30 sec	30	Primer Bindung („Annealing“)
+68°C	45 sec	30	Amplifikation
+68°C	5 min	1	Terminale Elongation
+4°C			Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Tab. 6: PCR Bedingungen für RT-PCR.

Die Proben wurden entweder nach der Reaktion bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Komponente	Volumen in µl
10x Reaction Mix Buffer	5,0
dH <sub>2</sub> O	34,0
Primer NS3-1b-1s (0,5 µmol/l)	2,5
Primer NS3-1b-4a (0,5 µmol/l)	2,5
dNTPs (0,3 mmol/l)	3,5
MgSO <sub>4</sub> (1,0 mmol/l)	1,0
AccuPrime Pfx Polymerase (1,25 U/µl)	0,5
Reaktionslösung outer PCR	1,0
Gesamtvolumen	50,0

Tab. 7: Pipettierschema für (Semi-)Nested-PCR; Voluminaangaben jeweils für eine Probe.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen	Reaktion
+94°C	3 min	1	Denaturierung
+94°C	30 sec	30	Denaturierung
+53°C	30 sec	30	Primer Bindung
+68°C	30 sec	30	Amplifikation
+68°C	5 min	1	Elongation
+4°C			Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Tab. 8: PCR Bedingungen für Seminested-PCR.

### 5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich ihrer Größe entsprechend in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix auftrennen. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zum positiv geladenen Pol im elektrischen Feld. Das Verfahren wurde sowohl zu analytischen als auch präparativen Zwecken eingesetzt. Um die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, der nach Interkalation in die DNA-Moleküle unter UV-Licht einer Wellenlänge von 300 nm rötlich fluoresziert. Die Länge von DNA-Fragmenten kann durch einen Vergleich der Höhe der Banden mit DNA-Banden eines Markers mit Fragmenten bekannter Größe abgeschätzt werden.

Nach Amplifikation erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente gemäß ihrem Molekulargewicht mittels Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße der zu trennenden DNA-Fragmente kamen Gele unterschiedlicher Agarosekonzentrationen zur Anwendung. Zur Auftrennung von Fragmenten mittlerer Größe (ca. 400 bis 1000 Basenpaare, bp) wurden zweiprozentige Agarosegele eingesetzt. Für ein zweiprozentiges Agarosegel wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und die Lösung zum Kochen gebracht, danach 1,5 µl Ethidiumbromid (230 µg/ml) zugegeben und nach Abkühlen auf etwa +60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Je nach Probenanzahl wurde ein Probenkamm mit 14-20 Taschen verwendet. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte in einer mit TAE-Puffer befüllten Horizontal-Gelapparatur. Die mit 1/10 Vol. 10x Bromphenolblau marker versetzten Proben (1 µl Probenpuffer, 5 µl Probe und 5 µl Wasser) und ein Längenmarker wurden in die Geltaschen aufgetragen. Der Molekulargewichtsmarker mit bekannten Fragmentgrößen diente zum Abschätzen der Größe der unbekannt DNA-Fragmente. Die Auftrennung der DNA erfolgte für ca. 45 Minuten bei einer Feldstärke von etwa 1-5 V/cm<sup>2</sup>. Ethidiumbromidhaltige DNA-Fragmente wurden mit UV-Licht einer Wellenlänge von 305 nm visualisiert und die spezifische Bande anhand des Längenmarkers detektiert. Die Dokumentation erfolgte mit einer Polaroidkamera durch einen Rot-Orange-Filter.

### 5.2.4 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Die Wiedergewinnung der DNA aus dem Reaktionsansatz der (Semi-)Nested-PCR erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Fragmente wurden über ein Gel aufgetrennt und die für die weitere Klonierung erforderlichen DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit 300 µl QG Puffer pro 100 mg Gel versetzt, um die Agarose zu lösen. Anschließend wurden die Proben bei +50°C ca. zehn Minuten unter kräftigem Schütteln inkubiert, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf eine Säule aufgetragen und 30–60 Sekunden bei 13000 UpM (alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13000 UpM) zentrifugiert. Um alle verbleibenden Gelreste zu entfernen, wurden weitere 500 µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert und abzentrifugiert. Abschließend wurde die DNA mit 750 µl eines ethanolhaltigen Waschpuffer („PE“) gewaschen und mit 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) eluiert. Für die Elution wurde der Puffer EB zunächst auf +60°C erhitzt, um die Lösungsbedingungen für DNA zu optimieren.

### 5.2.5 Klonierung von PCR-Produkten

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten vor Sequenzierungen erfolgte mittels des Zero Blunt TOPO PCR Cloning-Kits for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in den Vektor pCR®4Blunt-TOPO®. Dieses Klonierungssystem funktioniert, indem der Plasmid-Vektor mittels der *Vaccinia Virus* Topoisomerase I kovalent an das 3'-Ende des zu klonierenden PCR Produktes bindet. Die hierzu benötigte Energie wird durch die Spaltung von Phosphodiestern durch die Topoisomerase I gewonnen.

Vor Klonierung in den Vektor wurde das PCR-Produkt über ein Gel aufgereinigt. Der Ligationsansatz enthielt 1 µl des Ligasemix mit dem Vektor, 1 µl Salt Solution und 4 µl des vorher aufgereinigten PCR Produktes. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Fragment mit einem Ligasemix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und dem darin enthaltenen Vektor für fünf Minuten inkubiert. Unmittelbar hierauf erfolgte die Transformation.

### 5.2.6 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in kompetente *E.coli*. Hierzu werden die Bakterien mit der Fremd-DNA (meist Plasmid-DNA) gemischt, wobei Kompetenz-Faktoren, die auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert sind, die DNA binden. Durch einen kurzen Hitzeschock wird die Membran destabilisiert. Hierdurch kann die DNA in das Zytoplasma der *E.coli* aufgenommen werden. Die Antibiotika-Resistenz der Plasmid-DNA wird auf die transformierten Bakterien vermittelt, so dass man sie durch anschließende Kultivierung auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten selektieren kann.

Die Transformation erfolgte in kompetenten *E. coli*, die vom Hersteller mitgeliefert wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei +42°C 30 Sekunden in einem Wasserbad erhitzt und unmittelbar danach wieder auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium und eine Inkubation für eine Stunde bei +37°C. Nachfolgend wurden jeweils 150 µl der Lösung auf einer Agarplatte und der Rest auf einer weiteren Agarplatte ausgestrichen. Die Nährböden wurden für zwölf Stunden in einen +37°C Brutschrank inkubiert und anschließend bei +4°C gelagert.

Die Amplifikation, Aufreinigung und Sequenzierung der Klone erfolgte dezentral (SeqWright®, Houston, TX, USA). Dort wurden 96 Klone pro Patient und Zeitpunkt ausgewertet. Da jedoch die rein maschinell durchgeführte Auswahl und Sequenzierung der Klone oft Ergebnisse lieferte, die aufgrund von unsauberer bzw. überlagerten Sequenzen zur Analyse nicht geeignet waren, wurde in vielen Fällen die erneute Amplifikation und Sequenzierung der Proben in unserem Labor durchgeführt.

Weiterhin gestaltete es sich in einigen Fällen als äußerst schwierig, eine ausreichend große Anzahl von Klonen anzuzüchten. Besonders problematisch war dies bei Proben mit niedriger Viruslast unter Therapie. Weiterhin schien auch die Qualität der Bakterienkulturen stark zu differieren. Es waren deswegen bei zahlreichen Proben mehrere Versuche notwendig, um eine ausreichende Anzahl von Klonen bzw. auswertbaren Sequenzen zu erhalten.

### 5.2.7 Isolierung der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte über eine Retransformation in Top10 *E.coli* Bakterien. Die Aufreinigung von geringeren Mengen an Plasmid-DNA (bis 20 µg) wurde mit dem Qiagen Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die *E. coli* Bakterien wurden für zwölf Stunden in 5 ml LB-Medium bei +37°C kultiviert. Nach Abzentrifugieren des Bakterienpellets bei 4000 UpM für zehn Minuten und nach Entfernung des Mediums wurde das Bakterienpellet in 250 µl Resuspensionspuffer P1 vollständig aufgelöst. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer P2 erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer N3 zugesetzt, und die Proben zehn Minuten bei 13000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Säule pipettiert und ebenfalls abzentrifugiert. Es erfolgten zwei Waschschriffe mit 0,5 ml PB Puffer und 0,75 ml Puffer PE Puffer. Die DNA wurde mit 50 µl +60°C warmen Elutionspuffer EB aus der Säulenmembran eluiert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

### 5.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der unterschiedlichen Klone erfolgte mit der Methode nach Sanger. Nach enzymatischer Synthese von DNA-Strängen, die an einem desoxygenierten, mit einem Farbstoff markierten Nukleotid abbrechen, können über Anregung durch einen Laser die synthetisierten, unterschiedlich großen Fragmente detektiert werden. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABIPrism BigDye-System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Bei den modifizierten Nukleotiden handelte es sich um sogenannte 2',3'-Dideoxynucleotid-Triphosphate (ddNTPs). Die ddNTPs sind wie die Desoxyribonucleosid-Triphosphate aufgebaut, allerdings ist die Ribose an Position 2' und 3' desoxidiert. Dadurch fehlt am 3'-Kohlenstoff-Atom die Hydroxylgruppe, an der bei der Polymerisation das nächste Nukleotid angehängt wird. Dadurch wurde im Verlauf der DNA-Strangsynthese, nach Einbau eines modifizierten Nukleotids die Verlängerung des DNA-Stranges abgebrochen, da die Bildung einer Phosphodiesterbindung am 3'-C-Atom verhindert wurde. Zusätzlich ist jedes der vier modifizierten Nukleotide mit einem spezifischen Farbstoff markiert, der nach Anregung durch einen Laser Licht einer definierten, spezifischen Wellenlänge aussendet. Der Reaktionsansatz 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 zum Gesamtanteil an Nukleotiden beträgt etwa 1%.

Die der Sequenzierung vorgeschaltete PCR mit dem durch Klonierung gewonnen Plasmid erfolgte mit Hilfe des BigDye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}$
BigDye Mix	2,0
dH <sub>2</sub> O	7,5
Primer NS3-1b-1s (0,5 $\mu\text{mol/l}$ )	0,5
Reaktionslösung inner PCR	1,0
Gesamtvolumen	11

Tab. 9: Pipettierschema für Sequenz-PCR .

Zu diesem Premix wurde 1  $\mu\text{l}$  des Plasmids pipettiert.

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen	Reaktion
+96°C	2 min	1	Denaturierung
+96°C	10 sec	35	Denaturierung
+45°C	30 sec	35	Primer Bindung
+60°C	4 min	35	Amplifikation
+72°C	10 min	1	Elongation
+4°C			Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Tab. 10: PCR Bedingungen für Sequenz-PCR

Überschüssige ddNTP's wurden mittels Gelfiltration (DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland) entfernt, da die nachfolgende Analyse sonst gestört worden wäre. Die Proben wurden nach Vorbereitung der Gelsäulen auf diese aufgetragen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2700 UpM für drei Minuten), währenddessen längere DNA-Fragmente im Eluat aufgefangen wurden und die ddNTP's weiterhin in der Säule gebunden waren. Das Eluat konnte dann direkt für die Analyse der Nukleotidsequenz verwendet werden.

### **5.2.9 Sequenzanordnung**

Die finalen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Mutational Surveyor (SoftGenetics, State College, PA) angeordnet und analysiert. Zur genetischen Bestimmung wurde die aminoterminalen Nukleotide 1-543, entsprechend 181 Aminosäuren der NS3 Protease, verwandt. Um das Genom analysieren zu können, musste initial eine Konsensussequenz gebildet werden. Hierzu wurden durchschnittlich 83 Sequenzen für den Zeitpunkt Baseline und cirka 80 Sequenzen für die Zeitpunkte Tag 14 und Follow-up verwendet. Für die Analyse von Resistenzmutationen ist eine exakte Angabe der Nukleotid- und der daraus resultierenden Aminosäuresequenzen von höchster Bedeutung. Die verwendete Software war nicht in der Lage, die Sequenzen mit ausreichender Genauigkeit zu lesen, so dass eine Überprüfung jeder einzelnen Sequenz durch Gegenlesen notwendig war. Basierend auf einer Beta-Distributions Analyse ermöglicht die Sequenzierung von 80 Klonen die Identifizierung von Varianten bis zu einer unteren Grenze von 4% bzw. 2,5% bei einem jeweiligen Konfidenzintervall von 95% und 75%.

### **5.2.10 Statistische Analysen**

Alle statistischen Analysen der HCV-Plasmakonzentrationen in den drei Gruppen (Durchbruch, Plateau, kontinuierlicher Abfall) wurden aufgrund der nichtparametrischen Natur der Daten mit Hilfe des parameterfreien Rangsummentests nach Wilcoxon durchgeführt.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Serologische und klinische Ergebnisse

Bezug nehmend auf alle 34 Patienten konnte in den drei Gruppen bei Patienten, denen VX-950 verabreicht wurde, eine signifikante Reduktion der HCV-RNA beobachtet werden. Innerhalb von drei Behandlungstagen betrug in allen drei Dosierungsgruppen mit VX-950 die mittlere Reduktion der HCV-RNA im Serum mehr als 3  $\log_{10}$ -Stufen. Des Weiteren wurde in der 750 mg-Dosisgruppe eine weitere Reduktion der viralen Konzentration zwischen dem 3. und 14. Behandlungstag festgestellt. Die mittlere Reduktion der HCV-RNA betrug hier 4,4  $\log_{10}$ -Stufen am 14. Tag. Die niedrigsten HCV RNA Konzentrationen wurde in der 750 mg-Dosisgruppe erzielt. Bei Behandlungsende wurden in dieser Gruppe vier der acht Patienten negativ für HCV-RNA mittels dem quantitativen Roche COBAS TaqMan Prüfsystem (untere Nachweisgrenze < 30 IU/ml) getestet. Bei zwei von diesen vier Patienten konnten zudem mittels qualitativem Roche COBAS TaqMan Prüfsystem (Nachweisgrenze ca. 10 IU/ml) keine HCV-RNA mehr nachgewiesen werden.

Generell war mittels des quantitativen Roche COBAS TaqMan(R) Prüfsystems (untere Nachweisgrenze < 30 IU/ml) bei fünf Patienten aus allen Dosierungsgruppen bis Studienende keine HCV-RNA mehr nachweisbar. Dieser Wert wurde jeweils zwischen dem 11. und 14. Tag erreicht. Nach Beendigung der 14-tägigen Dosierungsperiode konnte in der 28-tägigen Follow-up Phase eine langsame Zunahme der HCV-RNA-Serumkonzentration festgestellt werden. Achtundzwanzig Tage nach Erhalt der letzten Dosis VX-950 zeigten zwei Patienten HCV-RNA-Serumkonzentrationen von mehr als einer  $\log_{10}$ -Stufe unterhalb des Wertes bei Baseline.

Bei Patienten der Placebogruppe waren keine signifikanten Veränderungen der Plasma HCV-RNA Konzentrationen festzustellen.

Des Weiteren erfolgten keine Behandlungsabbrüche wegen unerwünschter Nebenwirkungen. Zudem wurde kein signifikanter Anstieg der Leberwerte ALT und AST detektiert.

## 6.2 Sequenzbestimmung

Es wurden die Nukleotidsequenzen von im Durchschnitt 80 Klonen pro Patient und Zeitpunkt (vor Therapie, zu Therapieende, nach Therapie) bestimmt. Zu Baseline wurde aus den Nukleotidsequenzen aller Klone eine Konsensussequenz gebildet. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu allen Zeitpunkten wurden jeweils mit der aus der Konsensusnukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz verglichen. Auf dieser Basis erfolgten alle Quasispezies- und Mutationsanalysen. Für Quasispeziesuntersuchungen wurden jeweils vollständige Sequenzen verwendet, während für Mutationsanalysen die einzelnen Positionen verglichen wurden. Eine optimale Standardisierung bei möglichst geringer Fehlerrate wurde durch Anwendung einer Sequenzanalysesoftware (Mutational Surveyor®, SoftGenetics, PA, USA) gewährleistet.

### 6.2.1 Bestimmung von Nukleotidsequenzen

Beispielhaft ist eine Konsensusnukleotidsequenz von Patient #3 zu Baseline angegeben:

5'-

```
GCGCCCATCACGGCGTATGCCAGCAGACGAGGGGCCTCTTGGGGTGCATAAT
TACCAGCTTGACCGGCCGGGATAAAAACCAGGTGGAGGGTGAGGTTTCAGATCG
TATCAACCGCTGCCAGACCTTCTTGGCAACCTGCATTAGCGGGGTGTGCTGG
ACTGTCTACCACGGGGCCGGAACAAGGACCATCGCGTCATCTAAGGGTCCTGT
TATCCAGATGTATACCAATGTAGACCAAGACCTCGTAGGCTGGCCCGCTCCCCA
AGGTGCCCGCTCACTGACACCCTGCACTTGCGGCTCCTCGGACCTTTATCTGGT
CACGAGGCACGCCGATGTCATTCCCGTGCGCCGGCGGGGTGATAGCAGGGGC
AGCCTGCTTTCGCCCCGGCCTATCTCTTACTTAAAGGCTCCTCGGGGGGCC
ACTGCTGTGCCCCGCGGGACACGCCGTAGGCATATTTAGAGCCGCGGTATGCA
CCCGTGGAGTGGCTAAAGCGGTGGACTTTATCCCCGTAGAGGGCCTAGAGACA
ACCATGAGGTCC-3'
```

Alle Nukleotidbasen sind, wenn nicht ausgeschrieben, gemäß des Ambiguity Code der International Union of Biochemistry and Molecular Biology abgekürzt (IUPAC-IUB, 1985).

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Tab. 11: Abiguity Code der IUPAC-IUB für Nucleobasen.

### 6.2.2 Bestimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen

Alle Aminosäuren sind, wenn nicht ausgeschrieben, gemäß des international anerkannten 1-Buchstaben-Code abgekürzt (IUPAC-IUB, 1985).

Abkürzung	Bedeutung
A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
E	Glutaminsäure
Q	Glutamin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

Tab. 12: Einbuchstaben-Code für Aminosäuren.

Dargestellt sind im Folgenden die zu oben aufgeführten Konsensusnukleotidsequenz gehörige Aminosäuresequenz und zusätzlich alle abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu Baseline. Bei der Gesamtübersicht wurden alle Sequenzen mit der des HCV-Prototyps HCV-J Sequenz (Kato et al., 1990a) verglichen. Berücksichtigt sind hierbei ebenfalls die Unterschiede der Genotypen 1a und 1b.

Patient #3, Baseline Aminosäurenkonsensussequenz:

n-terminal-

APITAYAQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQIVSTAAQTFLATCISGVCWTVYHG  
AGTRTIASSKGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPQGARS LTPCTCGSSDLYLVTRHADVI  
PVRRRGDSRGSLLSPRPISY LKGSSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIP  
VEGLETTMRS-c-terminal



### 6.3 Quasispeziesanalytik

Die genetische Komplexität ist definiert als die Anzahl viraler Varianten innerhalb einer HCV Quasispeziespopulation. Um die genetische Komplexität der sequenzierten NS3-Abschnitte zu bestimmen, wurde die Shannon-Entropie berechnet (Sarrazin et al., 2001). Die normalisierte Shannon-Entropie variiert von null (alle Sequenzen sind identisch) bis eins (alle Sequenzen sind unterschiedlich).

Normalisierte Shannon-Entropie:

$$S_n = - \sum (p_i \ln p_i) / \ln n$$

( $p_i$  = Häufigkeit von jeder Sequenz in der Quasispezies;  $n$  = Anzahl aller analysierten Sequenzen)

Die genetische Diversität ist definiert als die Häufigkeit von Mutationen innerhalb der unterschiedlichen Sequenzen der HCV-Quasispezies. Um diese genetische Diversität zu bestimmen, wurde der Hamming-Abstand berechnet. Er variiert von null (keine genetische Diversität) bis 100 (maximale genetische Diversität).

Hamming Abstand:

$$H = (1 - (\text{homologe Positionen} / \text{Gesamtanzahl aller Position})) \times 100$$

#### 6.3.1 Quasispezieskomplexität und –diversität zu Baseline

Die Sequenzanalyse des untersuchten Abschnitts der HCV-NS3-Protease aller Proben ( $n = 34$ ) zum Zeitpunkt Baseline zeigte eine geringe Aminosäure-Quasispezies-Komplexität und Diversität bei den Patienten. Die Shannon-Entropie lag bei  $0,332 \pm 0,109$  und der Hamming-Abstand bei  $0,421 \pm 0,195$ . Es bestand keine Korrelation zwischen der Quasispezies-Heterogenität und der HCV-RNA-Konzentration im Serum.

Zudem wurde die individuelle Konsensussequenz mit der jeweils korrespondierenden Genotyp 1a- oder Genotyp 1b-Konsensussequenz verglichen. Hier konnte eine Aminosäurendiversität von 1,3% für Genotyp 1a und von 2% für Genotyp 1b berechnet werden.

## 6.4 Mutationsanalysen

Aminosäuremutationen unter oder am Ende der Therapie im Vergleich zur Ausgangssequenz vor Beginn der Behandlung an einer bestimmten Position, die bei mindestens 5% aller Klone detektiert wurden und bei mehr als einem Patienten auftraten, wurden als signifikant definiert und weitergehend untersucht.

### 6.4.1 Baseline Analyse

Im Folgenden ist für jeden Patienten die Variantenanalyse zum Zeitpunkt Baseline angegeben. Es sind nur solche Varianten aufgeführt, die bei mindestens fünf Prozent aller Klone detektiert wurden. Bei der Auflistung ist nicht berücksichtigt, ob die Varianten lediglich bei einem einzelnen Patienten mit einer Häufigkeit von fünf oder mehr Prozent aufgetreten ist.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %
1	70	67	12	17	S -> A	12	17
		68	24	34	K -> N	24	34
2	89	67	6	7	S -> P	6	7
4	79	89	21	27	Q -> H	21	27
10	70	18	26	37	V -> I	26	37
13	49	54	8	16	T -> S	8	16
		147	3	6	A -> T	3	6
14	90	95	16	18	T -> A	16	18
		174	25	28	G -> S	25	28

Tab. 13: Analyse zum Zeitpunkt Baseline für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %
5	62	71	3	5	I -> V	3	5
6	85	86	5	6	Q -> H	4	5
					Q -> L	1	1
8	71	14	19	27	L -> F	18	25
					L -> R	1	1
					26	4	6
15	88	89	4	5	V -> I	21	31
					P -> S	4	5

Tab. 14: Analyse zum Zeitpunkt Baseline für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten.

Für die Patienten #3, #7, #9, #11 und #12 konnten keine signifikanten Varianten detektiert werden.

### **6.4.2 Analyse Tag 14 (Therapieende)**

Alle Varianten sind aufgeführt, die entweder einzeln oder in der Summe mit einer Häufigkeit von mindestens fünf Prozent im Vergleich zur Konsensusaminosäure an gleicher Stelle in der Sequenz abweichen.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %		
1	94	36	81	86	V -> M V -> A	80 1	85 1		
		49	6	6	I -> V	6	6		
		67	9	10	S -> A	9	10		
		68	37	39	K -> N	37	39		
		155	85	90	R -> K R -> T R -> I	81 3 1	86 3 1		
2	92	36	46	50	V -> M V -> A V -> L	24 15 7	26 16 8		
		155	41	45	R -> T R -> I R -> K R -> M	16 12 11 2	17 13 12 2		
		156	10	11	A -> T	10	11		
		3	61	127	4	7	L -> P	4	7
		4	89	36	42	47	V -> M V -> A	29 13	33 15
4	89	89	51	58	Q -> H	51	58		
		155	32	36	R -> T R -> K	19 13	21 15		
		156	7	8	A -> T	7	8		
		9	79	78	6	8	V -> A	6	8
		10	72	18	6	8	V -> I	6	8
10	72	36	30	42	V -> M V -> A	18 12	25 17		
		89	5	7	S -> N	5	7		
		155	40	56	R -> K R -> I R -> T	19 12 9	26 17 13		
		12	81	36	45	56	V -> A v -> M	31 14	38 17
		138	5	6	S -> P	5	6		
12	81	155	38	47	R -> G R -> K R -> T R -> S R -> M	17 10 5 3 3	21 12 6 4 4		
		170	5	6	P -> V	5	6		
		13	72	28	5	7	R -> Q	5	7
		36	58	81	V -> M V -> A	53 5	74 7		
		54	66	92	T -> S	66	92		
13	72	95	5	7	T -> A	5	7		
		155	15	21	R -> K R -> S	14 1	19 1		
		14	87	36	79	91	V -> M V -> A	78 1	90 1
		40	30	34	A -> T	30	34		
		49	4	5	N -> D	4	5		
14	87	54	12	14	T -> S	12	14		
		87	31	36	A -> T	31	36		
		155	53	61	R -> K R -> T	48 5	55 6		
		174	60	69	G -> S	60	69		

Tab. 15: Analyse zum Zeitpunkt Therapieende für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %
5	56	36	48	86	V -> G V -> A	45 3	80 5
		71	14	25	I -> V	14	25
		156	3	5	A -> V A -> T	2 1	4 2
6	91	18	7	8	V -> I	7	8
		36	11	12	V -> L	7	8
					V -> G	2	2
					V -> R	1	1
					V -> A	1	1
		47	10	11	V -> I	10	11
		54	21	23	T -> A	21	23
		56	48	53	F -> Y	48	53
		72	34	37	T -> I	34	37
		86	41	45	Q -> H	41	45
122	8	9	T -> S	8	9		
		156	41	45	A -> V	34	37
					A -> T	6	7
					A -> F	1	1
					170	18	20
7	92	36	47	51	V -> A	47	51
		54	25	27	T -> A	25	27
		156	20	22	A -> S	20	22
		170	5	5	V -> A	5	5
11	33	36	10	30	V -> A V -> G	9 1	27 3
		54	9	27	T -> A	9	27
		95	2	6	T -> I	2	6
		122	3	10	S -> G	3	10
		155	8	24	R -> L	5	15
					R -> G	3	10
		156	11	33	A -> T	5	15
					A -> S	4	12
					A -> V	2	6
15	37	54	25	68	T -> A	25	68
		156	11	30	A -> V	11	30

Tab. 16: Analyse zum Zeitpunkt Therapieende für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten.

Aus den Proben eines Patienten (#8) konnten keine Klone angezüchtet werden.

### 6.4.2.1 Dosisgruppen

Gemäß folgendem Schema waren die Patienten in unterschiedlichen Dosierungsgruppen und der Verum (VX-950)-Gabe eingeteilt:

Patient	Dosis VX-950
1	3 x 450 mg
2	3 x 450 mg
3	Placebo
4	3 x 450 mg
5	3 x 450 mg
6	3 x 450 mg
7	3 x 450 mg
8	3 x 750 mg
9	Placebo
10	3 x 750 mg
11	2 x 1250 mg
12	2 x 1250 mg
13	2 x 1250 mg
14	2 x 1250 mg
15	2 x 1250 mg

Tab. 17: Einteilung der Dosierungsgruppen

### 6.4.3 Analyse nach Therapieende

Bei der Analyse zum Zeitpunkt nach Therapie wurde Proben, die 7-10 Tage nach der letzten Gabe von Telaprevir entnommen wurden, untersucht.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %		
1	68	29	20	29	Q -> E Q -> V	19 1	28 1		
		36	57	84	V -> M V -> L V -> A	50 5 2	74 7 3		
		57	4	6	H -> Q	4	6		
		61	20	29	T -> S	20	29		
		68	30	44	K -> N K -> D	28 2	41 3		
		155	49	72	R -> K R -> T R -> I	44 4 1	65 6 1		
		174	21	31	G -> N G -> S	20 1	30 1		
		2	61	28	5	8	E -> Q	5	8
36	35			57	V -> M V -> L V -> A	33 1 1	54 2 2		
155	32			52	R -> K R -> T R -> I	23 6 3	38 10 5		
4	51			36	46	90	V -> M V -> A	44 2	86 4
		89	18	35	Q -> H	18	35		
		100	3	6	G -> S	3	6		
		155	4	8	R -> K	4	8		
10	77	36	37	48	V -> M V -> A	27 10	35 13		
		155	34	44	R -> K R -> I R -> T	28 3 3	36 4 4		
		12	84	36	46	55	V -> M V -> A	24 22	29 26
				155	30	36	R -> K	30	36
13	75	29	4	5	T -> A	4	5		
		36	27	36	V -> M V -> A	25 2	33 3		
		54	68	71	T -> S	68	71		
		95	4	5	T -> A	4	5		
		155	28	37	R -> K R -> E	27 1	36 1		
		14	82	36	72	88	V -> M V -> A	70 2	85 2
				40	18	22	A -> T	18	22
				54	7	9	T -> S	7	9
87	14			17	A -> T	14	17		
155	51			62	R -> K	51	62		
174	52	63	G -> S	52	63				

Tab. 18: Analyse zum Zeitpunkt nach Therapie für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten.

Patient	Anzahl Klone	Position	$\Sigma$ Varianten	$\Sigma$ Varianten in %	Varianten	Absolute Häufigkeit	Absolute Häufigkeit in %
5	85	36	38	45	V -> G V -> A	31 7	36 8
		54	27	32	T -> A T -> G	26 1	31 1
		156	5	5	A -> F A -> T A -> S	2 2 1	2 2 1
6	92	36	5	5	V -> A	5	5
		54	7	8	T -> A	7	8
		56	16	17	P -> Y	16	17
		72	27	29	T -> I	27	29
		86	12	13	Q -> H	12	13
		107	20	22	V -> I	20	22
		168	5	5	D -> G	5	5
7	77	14	4	5	L -> P L -> F	2 2	3 3
		24	4	5	R -> Q	4	5
		36	29	38	V -> A V -> M V -> C	26 2 1	34 3 1
		48	9	12	V -> I	9	12
		54	27	35	T -> A	27	35
		156	26	34	A -> S	26	34
		8	94	14	77	82	L -> F L -> S L -> V
48	75			80	V -> I	75	80
54	25			27	T -> A T -> I	24 1	26 1
156	6			6	A -> T A -> V	5 1	5 1
11	80	36	15	19	V -> A	15	19
		54	8	10	T -> A	8	10
15	86	36	6	7	V -> A	6	7
		54	55	64	T -> A	55	64
		55	8	9	V -> A V -> I	7 1	8 1
		77	7	8	N -> S	7	8
		107	4	5	V -> I	4	5
		117	42	49	R -> H	42	49
		132	42	49	I -> V	42	49
	170	7	8	V -> A	7	8	

Tab. 19: Analyse zum Zeitpunkt nach Therapie für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten.

Bei Proben der Patienten #3 und # 9 konnten keine signifikanten Mutationen nachgewiesen werden.

#### 6.4.4 Mutationen unter Therapie mit Telepravir

Mutationen, welche die oben genannte Definition erfüllten, betrafen folgende Positionen innerhalb der NS3-Protease: 13, 18, 31, 36, 40, 48, 54, 56, 71, 72, 78, 80, 86, 87, 89, 107, 117, 122, 127, 132, 147, 155, 156, 170, 174.

Fluktuationen in der Anzahl spezifischer Varianten, die zum Zeitpunkt Baseline bestanden, wie z.B. solche an bekannten polymorphen Positionen, wurden beobachtet, aber nicht für Mutationsanalysen berücksichtigt.

In der Placebogruppe konnten keine potentiellen Resistenzmutationen detektiert werden.

Nach Ende der Telepravir-Gabe (Tag 14) konnten bei allen Patienten eine oder mehrere neu aufgetretene Mutationen an den Aminosäurepositionen V36, T54, R155 und A156 gefunden werden, die sich jeweils mit einer Häufigkeit von mehr als 5% von der Baseline-Sequenz unterschieden.

Die Mutationen mit der häufigsten Frequenz an den vier genannten Positionen können der Tabelle 20 entnommen werden.

Position in NS3 Protease	Aminosäure zu Baseline	Mutationen Tag 14
36	Valin	Alanin, Methionin
54	Threonin	Alanin
155	Arginin	Lysin, Threonin
156	Alanin	Valin, Threonin, Serin

Tab. 20: Häufige, signifikante Mutationen.

Diese Veränderungen traten als Einzelmutation (V36A/M, T54A, R155K/T, A156A/T/V) und als Doppelmutation auf. Die Doppelmutationen betrafen insbesondere die Position 36 in Verbindung mit Position 155 und die Position 36 in Verbindung mit Position 156.

Neben diesen häufig beobachteten Mutationen wurden auch weniger häufige Veränderungen der Aminosäuren an den genannten Positionen beobachtet:

Position in NS3 Protease	Aminosäure zu Baseline	Mutationen Tag 14
36	Valin	Glycin, Leucin
54	Threonin	Serin
155	Arginin	Glycin Isoleucin, Leucin, Methionin, Serin
156	Alanin	Isoleucin

Tab. 21: Seltene, signifikante Mutationen.

Die klinische Signifikanz dieser Nebenvarianten ist unbekannt und muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die Mutationen der Aminosäuren V36M und R155K/T konnten nur bei Proben mit HCV-Genotyp 1a-infizierten Patienten gefunden werden. Es ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von Genotyp 1a und Genotyp 1b hierfür verantwortlich sind, da bei Genotyp 1a eine Punktmutation, bei Genotyp 1b aber zwei Nukleotidmutationen notwendig sind. Alle oben angeführten, signifikanten Mutationen beruhen lediglich auf dem Austausch eines Nukleotids.

## 6.5 HCV-RNA Konzentrationsverlauf

Wie zu erwarten, zeigten sich bei allen Patienten, die ein Placebo erhielten, keine signifikanten Veränderungen bezüglich der HCV-RNA-Serumkonzentration. Bei allen Patienten die mit Telepravir therapiert wurden, konnte ein rasches Absinken der HCV-RNA Konzentration von annähernd 3  $\log_{10}$ -Stufen innerhalb der ersten zwei Tage beobachtet werden. Ausgehend hiervon konnte das virale Ansprechen aller Probanden (n = 34) in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt werden:

- Durchbruch (n = 13; Absinken der Serum HCV-RNA Konzentration von > 0,75  $\log_{10}$  IU/mL, mit einer Spannweite von 0,86 - 3,2 vom Nadir)
- Plateau (n = 8; Absinken der Plasma HCV-RNA Konzentration von  $\leq$  0,75  $\log_{10}$  IU/mL, mit einer Spannweite von 0,05-0,73 vom Nadir)
- Kontinuierlicher Abfall (n = 7)

Ein genaues Übereinstimmen zwischen der Telaprevirdosis und dem viralen Ansprechen konnte nicht gezeigt werden. Allerdings war bei der Mehrzahl der Patienten, die 450 mg alle 8 Stunden oder 1250 mg alle 12 Stunden erhielten, nach dem initialen Absinken einen Wiederanstieg der Viruslast oder eine Stagnation des Absinkens der HCV-RNA Konzentration festzustellen. In der Gruppe mit einer Telepravirdosierung von 750mg alle 8 Stunden zeigte sich bei den meisten Patienten ein kontinuierliches Absinken der HCV-RNA.

Patienten in der „Durchbruch-Gruppe“ erhielten 450 mg alle 8 Stunden (n = 6), 750 mg alle 8 Stunden (n = 1) oder 1250 mg alle 12 Stunden (n = 6). Patienten in der „Plateau-Gruppe“ erhielten 450 mg (n = 2) alle 8 Stunden, 750 mg alle 8 Stunden (n = 2) oder 1250 mg alle 12 Stunden (n = 4). Patienten in der Gruppe „Kontinuierlicher Abfall“ erhielten 450 mg alle 8 Stunden (n = 2) oder 750 mg alle 8 Stunden (n = 5).

Die durchschnittliche Plasmakonzentration von Telepravir wurde aus dem Mittelwert der Plasmakonzentrationen, gemessen an den Tagen 3 - 14 vor Gabe des Proteaseinhibitors, errechnet. In der „Durchbruch-Gruppe“ konnte eine Plasmakonzentration von  $719 \pm 120$  ng/ml, in der „Plateau-Gruppe“ von  $827 \pm 417$  ng/ml und in der Gruppe „Kontinuierlicher Abfall“ von  $1064 \pm 353$  ng/ml ermittelt werden. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen ohne kontinuierlichen Abfall der HCV-RNA Konzentration („Durchbruch“ und „Plateau“) und der Gruppe „Kontinuierlicher Abfall“ waren statistisch signifikant ( $p = .032$ ).

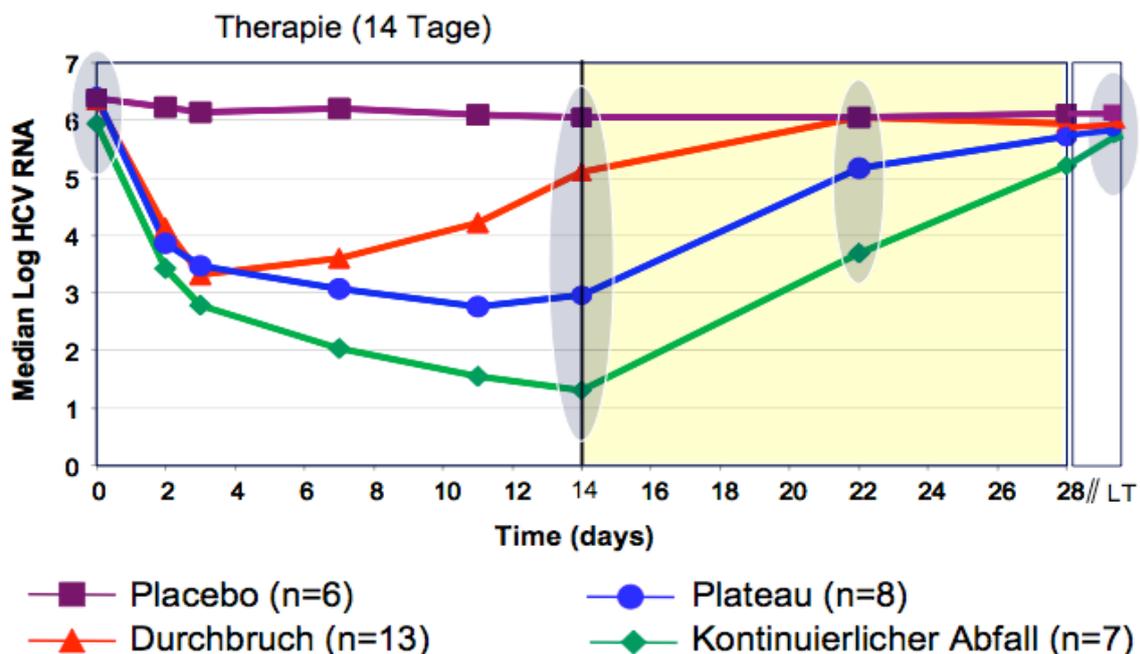


Abb. 6: Darstellung der HCV- Plasmakonzentration aller Probanden (n = 34) im Verlauf.

## 6.6 Virologische Ansprechverhalten im Verlauf

Dargestellt sind die Häufigkeiten der NS3-Varianten in den unterschiedlichen viralen Ansprechgruppen. Ebenfalls ist die mittleren HCV-RNA Konzentrationen im Verlauf mit abgebildet (siehe 6.5). Die Abbildungen beziehen sich auf das gesamte Probandenkollektiv (n = 34).

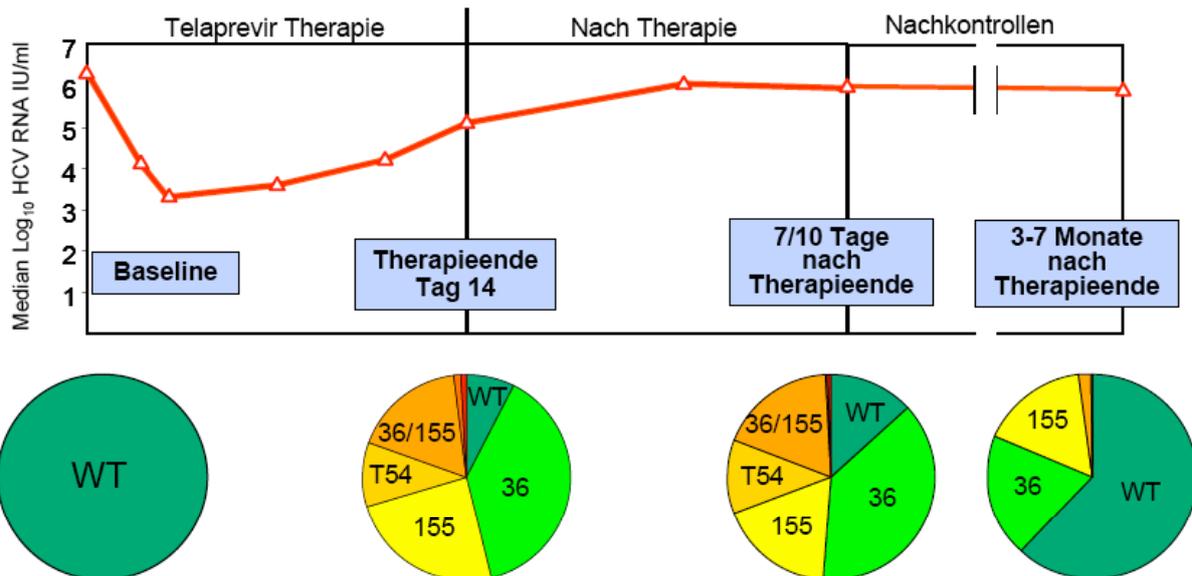


Abb. 7: Darstellung der Varianten der „Durchbruch-Gruppe“ (n = 13). Die Kreisdiagramme zeigen die durchschnittliche Verteilung der Varianten innerhalb dieser Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.

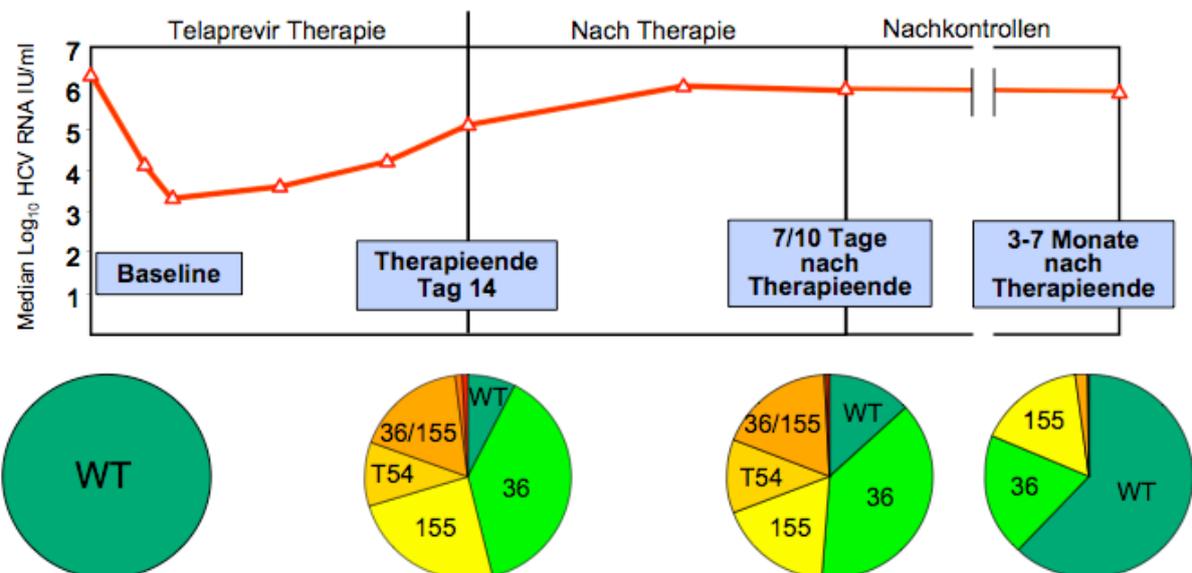


Abb. 8: Darstellung der Varianten der „Plateau-Gruppe“ (n = 8). Die Kreisdiagramme zeigen die durchschnittliche Verteilung der Varianten innerhalb dieser Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.

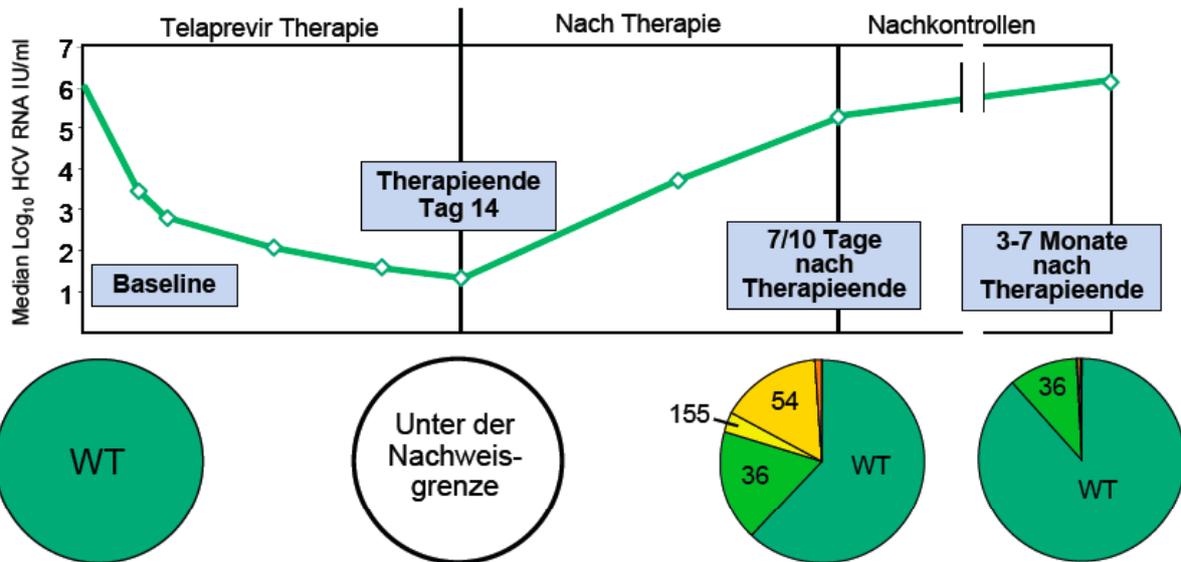


Abb. 9: Darstellung der Varianten der Gruppe „Kontinuierlicher Abfall“ (n = 7). Die Kreisdiagramme zeigen die Verteilung der Varianten innerhalb dieser Gruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.

## **7 Diskussion**

Im Rahmen dieser Studie sind neue, scheinbar resistente Virusvarianten bei den mit dem HCV-Proteaseinhibitor VX-950 behandelten Patienten entdeckt worden. Zur Identifikation der Mutationen wurde eine hochsensitive Genotypanalyse etabliert, die die Detektion von Varianten ab einer Häufigkeit von 5% innerhalb einer Quasispezies ermöglichte.

### **7.1 Methodenkritik**

In Voruntersuchungen mussten zuerst die einzelnen Methoden für die gewählte Fragestellung optimiert werden. Zudem war es nötig Verfahren zu entwickeln, um eine Analyse von Daten, die auf Basis falsch positiver Ergebnisse durch Kontaminationen oder ungenauer Amplifikationen entstanden sind, möglichst zu vermeiden.

#### **7.1.1 Auswahl des RNA-Extraktionsverfahrens**

Durch Bearbeitung der Proben mittels definierter Reagenzien wurde eine Standardisierung bei der Gewinnung der DNA aus den Patientenseren erreicht. Um einer Hämolyse und Denaturierungsprozessen vorzubeugen, war das Patientenblut gemäß Studienprotokoll direkt nach Abnahme abzentrifugiert und der Überstand umgehend eingefroren worden. Das Serum wurde lediglich einmal, nämlich für die Extraktion aufgetaut (Kessler et al., 2007). Wichtig war hier wegen der zeitabhängigen Degradation von RNA eine rasche Durchführung der Extraktionsschritte. Deswegen wurde die Anzahl der gleichzeitig extrahierten Proben auf acht begrenzt; hierdurch sank auch die Kontaminationsgefahr.

#### **7.1.2 Optimierung der RT-PCR und der Nested-PCR-Protokolle**

Zunächst wurde anhand von Positivkontrollen getrennt für HCV-Genotyp 1a und 1b die Zielsequenz amplifiziert und die Spezifität der Bande durch Sequenzierung bestätigt. Die Primerbindungstemperaturen wurden optimiert, um bei möglichst

geringer Amplifikation unspezifischer Sequenzen trotzdem eine optimale Sensitivität zu erreichen.

Bei der Interpretation der Daten ist die Fehlerrate der Polymerasen zu beachten. Diese liegt gemäß Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei  $2,9 \times 10^{-6}$  für die AccuPrime Pfx Polymerase und bei  $4,4 \times 10^{-5}$  für die *Taq* Polymerase (Cline et al., 1996).

Zur Beurteilung der Sensitivität wurden im Vorfeld der Studie zahlreiche Untersuchungen mit Proben niedriger Viruslast durchgeführt. Erst nachdem sichergestellt wurde, dass auch hier eine große Sensitivität erzielt werden konnte, wurde ein Standardprotokoll festgelegt.

### **7.1.3 Kontaminationskontrollen**

Kontaminationen sind auf jeder Ebene denkbar. Sie können beim der Bearbeitung der Seren, bei der RNA-Extraktion, während der RT-PCR, der (Semi-)Nested-PCR und bei jeder Sequenzierungs-PCR auftreten. Möglich sind Kontaminationen durch das Virus selbst, sowie durch Fremd-RNA oder -DNA. Prinzipiell kann jede verwendete Lösung kontaminiert sein.

Um die Gefahr von Kontamination zu verringern, wurden die einzelnen Arbeitsschritte in strenger räumlicher Trennung durchgeführt. Ferner mussten für jeden Vorgang eigene Arbeitsmaterialien - Handschuhe, Pipetten, Einmalspitzen, Cups und Cuphalter - vorhanden sein. Das Premix für die jeweilige PCR wurde an einem Arbeitstisch, an dem nicht mit RNA oder DNA gearbeitet wurde, hergestellt. Um Kontaminationen durch mögliche Verunreinigungen an den Händen zu verhindern, wurden nach jedem Arbeitsschritt Handschuhe und Pipettenspitzen gewechselt. Es wurden zudem gestopfte Pipettenspitzen verwendet (Burkhardt, 2000). Im Übrigen fanden die Empfehlungen von Kwok and Higuchi strenge Beachtung (Kwok et al., 1989).

#### **7.1.3.1 Negativkontrollen**

Negativkontrollen wurden bei jedem Versuch eingesetzt. In den Versuchen mit nur einer Negativkontrolle stand diese am Ende der Proben. Bei Experimenten, bei denen viele Proben gleichzeitig verarbeitet wurden, standen Negativkontrollen

sowohl am Anfang als auch am Ende der Versuchsreihe. Als Negativkontrolle wurde deionisiertes Wasser verwendet. Durch die strengen Kontaminationsschutzmaßnahmen blieben diese meist negativ und nur Proben aus diesen Versuchsreihen wurden weiter verwendet.

Zwischenzeitlich kam es zu dauerhaft positiven Negativkontrollen. Nach zahlreichen Experimenten zur Detektion der Quelle konnte die Kontamination auf ein verunreinigtes PCR-Kit zurückgeführt werden. Auf Rückfrage beim Hersteller bestätigte dieser, dass eine komplette Charge des Kits verunreinigt ausgeliefert worden sei. Proben aus Versuchen mit diesen Reagenzien wurden nicht zur Analyse verwendet. In weiteren Analysen der verunreinigten Sequenz konnte ein Fremdgenom detektiert werden. Auf eine genauere Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit wurde verzichtet.

#### **7.1.4 Validierung der Daten**

Um eine valide Analyse der Sequenzen zu ermöglichen, erfolgten grundsätzlich Doppelbestimmungen. Die als Maximum gewählten 96 Klone setzten sich so im Idealfall aus 48 Klonen der einen Versuchsreihe und 48 Klonen der anderen Versuchsreihe zusammen. Bei der Analyse konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Probenreihen desselben Patienten festgestellt werden.

#### **7.1.5 Auswertung der Daten**

Für die Auswertung der Sequenzen wurde die Software „Mutational Surveyor“ (SoftGenetics, State College, PA) verwendet. Mit Hilfe des dieser Software zugrunde liegenden Algorithmus erfolgte die Analyse der Sequenzen und ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäureeinzelsequenzen mit der Konsensusamino-säuresequenz zum Zeitpunkt Baseline. Zudem wurden alle Sequenzen an kritischen Stellen manuell kontrolliert um Analysefehler der Software auszuschließen bzw. gegebenenfalls zu korrigieren. Trotz mehrfacher Überprüfung ist bei der Betrachtung der Ergebnisse ein kombinierter Lesefehler durch die Software, bzw. Übertragung der Daten nicht vollkommen auszuschließen. Experimente zur Bestimmung der Fehlerquote wurden nicht durchgeführt. Da es sich um stochastische Prozesse handelt, ist davon auszugehen, dass hieraus entstehende eventuelle Fehler durch

die statistischen Tests von den biologisch relevanten, wahren Ergebnissen getrennt wurden. Zudem erfolgte die Mutationsanalyse auf Grundlage der abgeleiteten Aminosäuresequenzen, während ein Großteil stochastischer Mutationen auf Nukleotidebene aufgrund der Degeneration des genetischen Codes zu keiner Änderung der Aminosäure an der betroffenen Position führt.

Da trotz aller Vorsichtsmaßnahmen nicht auszuschließen ist, dass einzelne Mutationen Fehlern unterliegen, ist von uns empirisch eine 5%-Hürde festgesetzt worden. Lediglich Mutationen, die in mindestens 5% aller Klone detektiert wurden und bei mehr als einem Patienten auftraten, wurden als signifikant definiert und weiter untersucht (siehe 6.4). Es ist somit davon auszugehen, dass etwaige Übertragungsfehler keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis der Studie hatten.

## 7.2 Ergebnisinterpretation

Wie bereits unter dargelegt (siehe 5.1.1) erfolgte die klinische Prüfung an zwei Standorten. Um einen Bias zu vermeiden, sah das Protokoll vor, dass in unserem Labor lediglich Proben der anderen Studienzentren analysiert werden durften. Die Interpretation der im Abschnitt Ergebnis vorgestellten Daten dieser Patienten kann aber sinnvoll nur im Gesamtkontext aller Daten erfolgen, weswegen sich die weiteren Darlegungen auf das Gesamtkollektiv beziehen.

Für die Komplettierung dieser Studie sind zusätzliche Untersuchungen durchgeführt worden. Da diese Untersuchungen aber nicht direkt im Rahmen dieser Arbeit erfolgten, sind die Ergebnisse hier zusammengefasst, um den Kontext für die Interpretation obiger Ergebnisse darzulegen.

### 7.2.1 Phänotypische Analyse der Telepravir resistenten Virusvarianten

Der  $IC_{50}$  gibt die Konzentration eines Proteaseinhibitors an, die für eine 50%ige *in vitro* Inhibition der NS3 Protease in einem Enzymatischen Assay bzw. einer 50% Reduktion der HCV RNA Konzentration in einem Replikonassay notwendig ist. Die  $IC_{50}$ -Werte für Klone mit den am häufigsten aufgetretenen Einzel- und Doppelmutationen wurden ebenfalls sowohl enzymatisch als auch im Replikonmodell

untersucht. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Resistenzniveaus, die in hohe und geringe Resistenzniveaus, sogenannte High- und Low-level-Resistenzen unterteilt werden konnten. Low-level-Resistenzen (Anstieg des  $IC_{50}$  um  $< 25$ -fache) konnten bei den Mutationen T54A, V36A/M, R155K/T und A156S gefunden werden. High-level-Resistenzen (Anstieg des  $IC_{50}$   $> 60$ -fache) wurden für die Mutationen A156T/V, sowie die kombinierten Mutationen an den Positionen 36+155 und 36+156 ermittelt.

Bei dem HCV-Replikonsystem handelt es sich um ein 1999 von Lohmann etabliertes Zellkulturmodell, das die Replikation von spezifischen HCV-Sequenzen, sogenannten Replikons, in humanen Huh-7 Hepatozellen ermöglicht (Lohmann et al., 1999b). Hierdurch ist es möglich, die virale Expression und die hierzu nötigen Regulationsfaktoren zu untersuchen (Bartenschlager, 2002; Bartenschlager et al., 2005). Zudem bietet das Replikon ein hervorragendes System zur Erforschung antiviraler Wirkstoffe (Escuret et al., 2006; Lin et al., 2004).

#### **7.2.1.1 Patienten mit Wiederanstieg der Viruslast unter Therapie („Durchbruch“)**

Am Ende der Therapie (Tag 14) waren der Wildtyp und low-level-Mutationen (V36A/M, T54A, R155K/T) vorherrschend bei allen Patienten. Eine kleine Anzahl von Doppelmutationen mit hohem Resistenzniveau (AS-Position 36 und 155) wurde ebenfalls bei einigen Patienten entdeckt. In der Nachsorgeuntersuchung konnten nach 7-10 Tagen immer noch low-level-Resistenzmutationen detektiert werden. In einer weiteren Untersuchung (3-7 Monate nach Therapie) zeigte sich, dass deren Vorkommen weiter gesunken und der Wildtyp wieder vorherrschend war. Bei 4 von 12 Patienten entsprachen 95% der NS3-Sequenz wieder dem Wildtyp.

#### **7.2.1.2 Patienten mit Plateau der Viruslast unter Therapie („Plateau“)**

In dieser Gruppe war am Tag 14 die high-level Resistenzvariante A156V/T vorherrschend bei allen Patienten. Dennoch konnten auch eine geringe Anzahl des Wildtyps und von Low-level-Resistenzen detektiert werden. Die Mutation A156T/V wurde mit einer Häufigkeit von 100% bei vier Patienten gefunden. Im Verlauf, 7-10 Tage nach Therapie, nahmen die High-level-Resistenzen in Verbindung mit einem Wiederanstieg des Wildtyps deutlich ab. Zudem konnte nur eine geringe Anzahl von Low-level-Resistenzvarianten nachgewiesen werden. Später, 3-7 Monate nach

Therapie, waren High-level-Resistenzen vollständig verschwunden, low-level Resistenzen nur noch marginal vorhanden und die Mehrzahl der Patienten zum Wildtyp zurückgekehrt. Bei 5 von 7 Patienten entsprachen mehr als 99% der Proteasesequenzen dem Wildtyp.

#### **7.2.1.3 Kontinuierlicher Abfall-Gruppe**

Nach Ende der Therapie war es nicht möglich mit Hilfe des Sequenz-Assays Daten zu erfassen, da die HCV-RNA Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag (Grenze bei > 100 IU/mL). Nach 7-10 Tagen war bei einem Patienten lediglich der Wildtyp zu finden, wohingegen bei den anderen Patienten eine Kombination aus Low-level-Resistenzvarianten und dem Wildtyp gefunden wurde. In der Nachuntersuchung (3-7 Monate nach Therapie) entsprachen 96% der Proteasesequenzen dem Wildtyp.

## 7.2.2 Modell der NS3 Protease

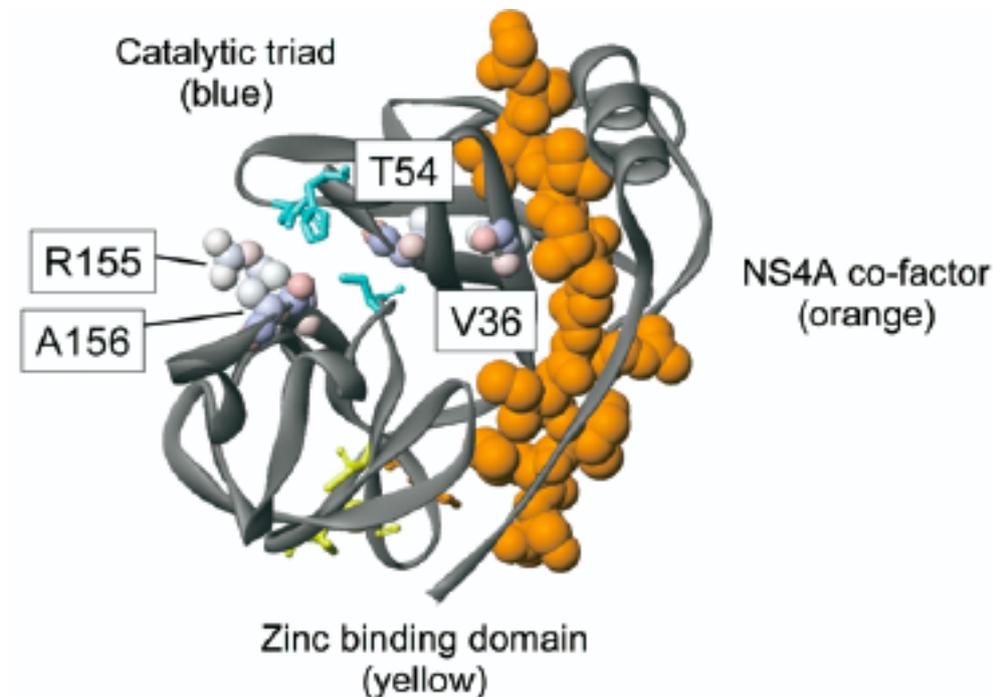


Abb. 10: Strukturmodell der NS3-Protease mit Darstellung der Lokalisation der in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Resistenzmutationen (mit freundlicher Genehmigung aus Sarrazin et al. (2007). Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132:1767-1777). „Zinc binding domain“ beschreibt die Zinkbindungsdomäne; „Catalytic triad“ die katalytische Triade der Serinprotease.

Im obigen Modell basierend auf der bekannten kristallinen Struktur des Wildtyp-Enzyms sind die Positionen der gefundenen Resistenzmutationen dargestellt. Veränderungen an den Positionen 155 und 156 finden sich in der Nähe der funktionellen Abschnitte („active side“) der NS3-Protease. Diese beinhaltet die katalytische Stelle und die Bindungsstelle der Zielproteine. Es ist daher anzunehmen, dass diese Mutationen die Affinität der Protease zu Telaprevir herabsetzen.

Der Resistenzmechanismus, der den Mutationen an den Positionen 36 und 54 zu Grunde liegt, ist bisher nicht abschließend erklärt, da diese keinen direkten Kontakt zur Bindungsstelle des Telaprevir haben. Eine Möglichkeit wäre, dass Mutationen an diesen Positionen die Sekundärstruktur der Proteasen-Domäne in der P1'-Substratbindungstasche beeinflussen.

### **7.2.3 Relative Fitness der Resistenzvarianten *in vivo***

Die replikative Fitness der HCV-Varianten wurde basierend auf der Häufigkeit der Varianten und den HCV-RNA-Konzentrationen der Patienten abgeschätzt. Die Verknüpfung dieser beiden Daten ermöglichte es, die Replikationshäufigkeit einer Variante in Abwesenheit des Proteaseinhibitors zu bestimmen (von Therapieende bis 7–10 Tage nach Therapie). Diese Analyse wurde ausschließlich mit Daten von Patienten der „Plateau-Gruppe“ durchgeführt, da sie die niedrigsten, noch nachweisbaren HCV-RNA Konzentrationen am Ende der Therapie aufwiesen und so eine deutliche Dynamik bezogen auf den Wiederanstieg im Serum möglich war.

Allgemein konnte eine inverse Korrelation zwischen der replikativen Fitness und Resistenzen, die von einer einzelnen Mutation vermittelt wurde, beobachtet werden. Eine Verbindung der Mutation V36A/M mit R155K/T oder A156V/T bewirkte einen Anstieg der Fitness, also eine Erhöhung der Replikationseffizienz, gemessen an der HCV-RNA-Konzentration. Hier scheint ein deutlicher Unterschied zu Einzelmutationen zu bestehen. Allerdings lässt sich dies nur vermuten, da die Doppelmutation „36+156“ am oberen Ende der Nachweisgrenze der phänotypischen Untersuchung lag. Dies macht es schwierig festzustellen, welchen Effekt dies auf die Resistenz gegenüber Telaprevir im Vergleich zu einer Einzelmutation hat. Dennoch muss man davon ausgehen, dass die Doppelmutation V36A/M+R155K/T ein erhöhtes Maß an Fitness und Resistenz vermittelt.

### **7.2.4 Interpretation der Resistenzmechanismen**

Die Entstehung von Resistenzen stellt eine große Herausforderung bei der Entwicklung neuer antiviraler Therapiestrategien dar (Richman, 2006). Die hohe Replikationsrate in Verbindung mit dem fehleranfälligen Replikationsmechanismus der viralen RNA-Polymerasen führen zur Entwicklung einer viralen Quasispezies mit resistenten Varianten. Kleine Populationen bereits existierender resistenter Varianten haben unter Behandlung mit einer antiviralen Substanz einen Selektionsvorteil gegenüber dem Wildtyp und können in der Folge dominant werden.

Bei der Behandlung von HIV wurden die Entstehung, kinetische Entwicklung und die klinischen Folgen von Resistenzmechanismen bereits intensiv untersucht (Clavel et al., 2004; Shafer, 2002). Dem Problem des Auftretens von Resistenzen gegen HIV-

Medikamente wird durch die Verwendung von mehreren, gleichzeitig eingenommenen, antiretroviralen Medikamenten mit unterschiedlichen Resistenzprofilen begegnet.

Die hier vorgelegte Studie analysierte HCV-resistente Varianten aus einer Studie mit einem HCV-Proteaseinhibitor. Neue Resistenzmutationen konnten durch das Verwenden einer hochsensitiven Genotypanalyse detektiert werden. Der Phänotyp dieser Mutationen wurde durch enzymatische Untersuchungen und mit Hilfe eines Replikonmodells weiter charakterisiert, z.T. wie oben dargelegt außerhalb dieser Promotion. Zudem konnte ein Wiederanstieg des Wildtyps und ein Rückgang der häufigsten Resistenzvarianten nach Therapieende, also nach Wegnahme des medikamentösen Selektionsdrucks, beobachtet werden.

In der klonalen Sequenzanalyse wurden 4 Hauptmutationen (V36A/M, T54A, R155K/T und A156V/T/S) im Bereich der katalytischen Domäne des NS3-Protease identifiziert. Zudem wurden Doppelmutationen (36+155, 36+156) detektiert. Eine phänotypische Analyse der Varianten zeigte, dass solche mit Mutationen an den Positionen V36A/M, T54A und R155K/T eine low-level Resistenz gegen Telaprevir und die Mutationen A156V/T, 36+155 und 36+156 eine high-level Resistenz zu vermitteln scheinen.

In vorangegangenen Studien, deren Ziel eine Analyse der Resistenzprofile von Proteaseinhibitoren war, konnten *in vitro* im Replikonmodell verschiedene Mutationen gefunden werden:

	<b>Telaprevir</b>	<b>BILN 2061</b>	<b>SCH6</b>	<b>SCH 503034</b>	<b>ITMN-191</b>
<b><i>In vitro</i></b>	A156 S/V/T	R155Q A156V/T D168V/A/Y	A156V/T R109K	A156S/T T54A V170A	D168A
<b><i>In vivo</i></b>	V36M/A T54A R155K/T A156S/V/T	keine Daten	keine Daten	V36M/A T54A/S R155K A156S V170A/L	keine Daten

Tab. 22: Darstellung der bisher detektierten Mutation der NS3-Protease; Telaprevirdaten *in vitro* nach Lin (Lin et al., 2004; Lin et al., 2005); BILN 2061 Daten nach Lu (Lu et al., 2004) und Trozzi (Trozzi et al., 2003); SCH6 Daten nach (Yi et al., 2006); SCH 503034 *in vitro* nach Tong (Tong et al., 2006), *in vivo* nach Sarrazin (Sarrazin et al., 2007) und Susser (Susser et al. 2008); ITMN-191 Daten nach Tong (Tong et al., 2006).

Wie dargestellt war die Mutation A156S/V/T im Replikonmodell unter Telaprevir (Lin et al., 2004) und SCH 503034 (Tong et al., 2006) nachweisbar. Allerdings konnten bisher *in vitro* keine Virusvarianten mit Mutationen an den Positionen V36A/M, T54A oder R155K/T gefunden werden. Ursächlich hierfür könnte die hohe Telaprevirkonzentration sein, die für die Replikonuntersuchungen verwendet wurde (Lin et al., 2004). Unter einer niedrigen Konzentration des Proteaseinhibitors Boceprevir (SCH 503034) konnte eine T54A Mutation im Replikon detektiert werden (Tong et al., 2006). Neue Ergebnisse zeigen *in vivo* Mutationen an den Positionen V36M/A, T54A/S, R155K, A156S, V170A/L (Susser et al., 2008).

Auffällig ist, dass es bei Probanden unter Therapie mit Boceprevir nach neuester Studienlage zur Ausbildung gleicher Mutation wie unter Therapie mit Telaprevir kommt (Susser et al., 2008). Dies legt den Verdacht einer möglichen Kreuzresistenz nahe. Ähnliches ist bei Proteaseinhibitoren in der HIV-Therapie zu beobachten (Shafer et al., 2008). Durch ähnlichen Aufbau und gleichen Wirkmechanismus tritt meist eine Kreuzresistenz auf, das heißt, bei Resistenz gegen einen Protease-Inhibitor ist das Virus auch gegen andere Vertreter dieser Wirkgruppe resistent und wird nicht mehr gehemmt. Dies könnte bei Betrachtung der genotypischen Resistenzmutationen unter Therapie mit Serinproteaseinhibitoren ebenfalls möglich sein. Deswegen sollte bei weiteren Studien der Ausbildung solcher Kreuzresistenzen besondere Beachtung geschenkt werden.

Das Entstehen neuer resistenter Varianten in der Folge der Gabe von Telaprevir korrelierte eng mit den HCV-RNA-Konzentrationen im Serum. Alle Patienten hatten innerhalb der ersten zwei Tage unter Therapie mit Telaprevir einen Abfall der HCV-RNA um 2-3  $\log_{10}$ -Stufen, gefolgt von divergierenden Ansprechschemata. Bei einem Teil der Patienten stieg die HCV-RNA-Konzentration an oder blieb auf dem initial nach Therapiebeginn erreichten Niveau. Bei einem anderen kam es zu einem weiteren Abfall der viralen Plasmakonzentration. Das Muster, das in den unterschiedlichen Ansprechverhalten zu beobachten war, scheint auf dem von Telaprevir ausgeübtem Selektionsdruck zu basieren. Patienten, bei denen ein Wiederanstieg der Viruslast zu finden war, hatten die geringsten Telaprevirplasmakonzentrationen. Bei der „Plateau-Gruppe“ konnte eine höhere Plasmakonzentration gemessen werden, die anscheinend zur Ausbildung von Low-level-Resistenzen führte. Die höchsten Plasmakonzentrationen von Telaprevir wurden in der Gruppe mit kontinuierlichem Abfall der Viruslast gemessen. Hieraus

scheinen die High-level-Resistenzvarianten in dieser Gruppe zu resultieren. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die in dieser Studie vorgefundene Korrelation des Auftretens von Mutationen viralen Antwort mit der Plasmakonzentration des Proteaseinhibitors möglicherweise nicht auf größere Kohorten übertragbar ist. Die Resistenzentwicklung bei kombinierter Gabe von Proteaseinhibitoren in Kombination mit anderen antiviralen Substanzen ist gegenwärtig Inhalt anderer Prüfungen.

### **7.2.5 Fitness der resistenten Varianten**

In der Evolutionsbiologie versteht man unter Fitness die Anpassungsfähigkeit eines Individuums oder einer Spezies an die Umwelt. Dies kann sich direkt auf die Anzahl der Nachkommen und somit die Überlebensfähigkeit des Genotyps oder der Art auswirken. Auf Viren bezogen ist die Fitness ein Maß für die Replikationsfähigkeit. Wie oben gezeigt wurde, kommt es unter hohen Telaprevirkonzentrationen zur Selektion von sehr resistenten Virusvarianten, die jedoch gegenüber dem Wildtyp eine geringere Fitness zu haben scheinen. Der Effekt dieser resistenten Varianten auf die Krankheitsaktivität und die Therapie mit antiviralen Medikamenten ist bisher unklar. Durch Abschätzen der Wachstumsraten der Varianten konnte gezeigt werden, dass ihre Replikationsfähigkeit sich umgekehrt proportional zur ihrer Telaprevirresistenz verhält. Folglich scheinen Low-level-Resistenzen einen geringen Einfluss auf die virale Fitness zu haben, wohingegen der Einfluss von High-level-Mutationen auf die Fitness größer ist.

Traditionell wird die Fitness von HCV-Sequenzen anhand von transienten Replikationen im Replikonmodell bestimmt; die enzymatische Fitness wird von dem Maß der katalytischen Effizienz determiniert. Für Varianten mit der Mutation A156V/T konnte im Replikonmodell ein Absinken der Fitness von mehr als 95% beobachtet werden (Lin et al., 2005). Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen innerhalb dieser Studie für eine Mutation, die die potentiell wirksamste Resistenz zu vermitteln scheint. Dennoch ist diese *in vivo* Analyse der Fitness neuartig und die Ergebnisse dieser Studie sollen im Kontext weiterer Untersuchungen zur Fitness bestimmter Mutationsvarianten überprüft werden.

Es scheint möglich, dass der bei einigen Patienten zu beobachtende frühe und schnelle Anstieg der HCV-RNA-Konzentration eine Folge der Selektion bzw.

Dominanz von Low-level-Resistenzvarianten, die fitter als High-level-Resistenzen sind, ist. Alternativ könnte die Dominanz von Varianten mit High-level-Resistenzen bei anderen Patienten zu einem geringeren Wachstum aufgrund der verminderten Fitness führen. Zu bedenken ist allerdings, dass eine Behandlung mit Telepravir über einen längeren Zeitraum zur Entwicklung weiterer, sogenannter kompensatorischer Mutationen führen könnte. Möglicherweise würde diese die virale Fitness von resistenten Mutationen steigern.

Innerhalb von 3-7 Monaten nach Ende der Therapie war bei allen Patienten überwiegend wieder das Wildtypvirus detektierbar (Kieffer et al., 2006). Auffallend ist, dass High-level-Resistenzvarianten innerhalb kürzester Zeit wieder vom Wildtyp ersetzt werden, wohingegen dieser Prozess bei Low-level-Resistenzvarianten länger zu dauern scheint. Besonders deutlich war diese Veränderung bei Patienten der „Plateau-Gruppe“ und der Gruppe „Kontinuierliches Absinken“. Hier bestand nach 3-7 Monaten die HCV Quasispezies überwiegend wieder aus den ursprünglichen Sequenzen. Jedoch kann man nur mutmaßen, welche Auswirkungen eine erneute Therapie mit Telaprevir oder einem anderen Proteaseinhibitor auf die Resistenzentwicklung haben würde. Im Gegensatz zum HIV, bei dem resistente Virusvarianten, die durch eine insuffiziente, antiretrovirale Therapie selektioniert wurden, als Provirus in T-Gedächtniszellen integriert werden (Charpentier et al., 2004; Siliciano, 2005), ist ein solches Reservoir für HCV nicht bekannt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit virale Varianten identifiziert, die eine geringe Sensitivität gegenüber Telaprevir aufweisen. Eine detaillierte Studie welche besonders die ersten Tagen nach Therapiebeginn untersucht, könnte möglicherweise Aufschluss über die Selektion der unterschiedlichen Varianten geben. Es sollte beachtet werden, dass die Bestimmung von resistenten Mutanten keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann, zumal nur die Sequenzanalyse auf die ersten 181 Aminosäuren der NS3-Protease beschränkt war. Es wäre durchaus möglich, dass additive, resistente oder kompensatorische Mutationen im NS4A-Protein, der C-terminalen Helikase des NS3-Proteins oder an den Proteasespaltstellen im HCV-Polyprotein existieren. Des Weiteren sind außer der A156V/T Variante die molekularen Mechanismen der Mutationen, die in dieser Studie gefunden worden sind, noch ungeklärt. Eine detaillierte enzymatische und strukturelle Analyse könnte hier weiteren Aufschluss geben.

### **7.2.6 Ausblick**

In Untersuchungen des Replikons mit A156V/T Mutationen zeigte sich, dass weiterhin eine Wildtypsensitivität für IFN besteht (Kieffer et al., 2007). Demzufolge könnte die Beigabe von Peginterferon-alfa-2a/b oder Peginterferon-alfa-2a/b ev. in Kombination mit Ribavirin zu Telaprevir die zelluläre antivirale Antwort steigern und somit zu einer Elimination des Virus führen. Zudem könnte die Wahrscheinlichkeit der Entstehung viraler Resistenzen vermindert werden. Unterstützt wird diese Hypothese von kürzlich durchgeführten klinischen Studien. Hier konnte eine rasche initiale und im weiteren Verlauf kontinuierliche virale Antwort bei allen Patienten beobachtet werden, die mit 750 mg Telaprevir alle 8 Stunden und PegIFN über 14 Tage oder PegIFN und Ribavirin über 28 Tage therapiert wurden. Zudem scheint ein stärkerer Abfall der Viruslast erzielt zu werden (Forestier et al., 2007; Lawitz E, 2006).

## 8 Abkürzungsverzeichnis

3' NTR	3' nicht-translatierte Region
5' NTR	5' nicht-translatierte Region
$\gamma$ GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
A. dest	„Aqua destillata“ (destilliertes Wasser)
AFPR	„alternate reading frame protein“
AFR	alternierender Leserahmen, „alternate reading frame“
ALAT	Alaninaminotransferase (früher GPT)
AS	Aminosäure
ASAT	Aspartat-Aminotransferase (früher GOT)
bp	Basenpaare
C	Kapsid, „core“
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
c-terminal	carboxyterminal
dH <sub>2</sub> O	„Aqua destillata“ (destilliertes Wasser)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonuklosidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1/2	Hüllproteine 1/2, „envelope glycoproteins 1/2“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA3	Enzymimmunoassays der 3. Generation
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humane-Immundefizienz-Virus
HVR	Hypervariable Region
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon- $\alpha$
IRES site“	interne Ribosomenbindungsstelle, „internal ribosome entry site“
ISDR	Interferon-Sensitivität determinierende Region, „Interferon- Sensitivity-Determining-Region“
IVDA	Intravenöser Drogenkonsum

Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
Ki*	Inhibitionskonstante
LB	Luria-Bertani
LTβR	Lymphotoxin-β-Rezeptoren
MIU	Millionen Internationale Einheit, „millions international unit“
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mRNA	„messenger“RNA
NaCl	Natriumchlorid
NANBH	NonA-NonB Hepatitis
NAOH	Natriumhydroxid
NS	Nichtstrukturprotein
n-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTPase	Nukleosid-Triphosphatase
ORF	offener Leserahmen, „open reading frame“
PEG	Polyethylenglykol-Molekül
PEG-IFN	pegyliertes Interferon
PePHD	PKR/eIF2α-Phosphorylierungs-Homologie-Domäne
PCR	„Polymerase-chain reaction“; Polymerase Kettenreaktion
PKR	Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase
RdRp	RNA spezifische RNA-Polymerase, „RNA-directed RNA-Polymerase“
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RBV	Ribavirin
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus
RT	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion
SR-BI	Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I
STA-C	spezifisch gezielte antivirale Therapien, „specifically targeted antiviral therapies“
SVR	anhaltendes virologisches Ansprechen, „sustained virologic response“
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vol	Volumen

VX-950

Telaprevir

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Phylogenetische Analyse ausgewählter HCV-Genom- Totalsequenzen der Genotypen 1-6. _____	9
Abb. 2:	Darstellung des HCV-Genoms. _____	13
Abb. 3:	Darstellung des Vektors pCR <sup>®</sup> -4Blunt TOPO <sup>®</sup> , in den die Sequenz des Protein NS3 kloniert wurde. _____	34
Abb. 4:	Aminosäuresequenzen aller Genotyp 1b Patienten. _____	50
Abb. 5:	Aminosäuresequenzen aller Genotyp 1a Patienten. _____	50
Abb. 6:	Darstellung der HCV- Plasmakonzentration im Verlauf. _____	61
Abb. 7:	Darstellung der Varianten der „Durchbruch-Gruppe“ _____	62
Abb. 8:	Darstellung der Varianten der „Plateau-Gruppe“ _____	63
Abb. 9:	Darstellung der Varianten der Gruppe „Kontinuierlicher Abfall“ _____	63
Abb. 10:	Kristalline Struktur der NS3-Protease mit Darstellung der signifikanten Mutationen. _____	70

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geographische Verteilung der Genotypen._____	10
Tab. 2:	Start- und Endpositionen der Primer nach dem Prototyp HCV-J._____	31
Tab. 3:	Spezifische Primer für ausgewählte Proben nach dem Prototyp HCV-J._____	32
Tab. 4:	Spezifizierung der verwendeten Bakterien._____	32
Tab. 5:	Pipettierschema für RT-PCR._____	38
Tab. 6:	PCR Bedingungen für RT-PCR._____	39
Tab. 7:	Pipettierschema für (Semi-)Nested-PCR._____	39
Tab. 8:	PCR Bedingungen für (Semi-)Nested-PCR._____	39
Tab. 9:	Pipettierschema für Sequenz-PCR._____	44
Tab. 10:	PCR Bedingungen für Sequenz-PCR._____	44
Tab. 11:	Abiguity Code der IUPAC-IUB für Nukleobasen._____	48
Tab. 12:	Einbuchstaben-Code für Aminosäuren_____	48
Tab. 13:	Analyse zum Zeitpunkt Baseline für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten._____	52
Tab. 14:	Analyse zum Zeitpunkt Baseline für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten._____	52
Tab. 15:	Analyse zum Zeitpunkt Therapieende für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten._____	54
Tab. 16:	Analyse zum Zeitpunkt Therapieende für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten._____	55
Tab. 17:	Einteilung der Dosierungsgruppengruppen._____	56
Tab. 18:	Analyse zum Zeitpunkt nach Therapie für mit HCV-Genotyp 1a infizierte Patienten._____	57
Tab. 19:	Analyse zum Zeitpunkt nach Therapie für mit HCV-Genotyp 1b infizierte Patienten._____	58
Tab. 20:	Häufige, signifikante Mutationen._____	59
Tab. 21:	Seltene, signifikante Mutationen._____	60
Tab. 22:	Darstellung der bisher detektierten Mutation der NS3-Protease._____	72

## 11 Literaturverzeichnis

1. Alberti, A. (1991). Diagnosis of hepatitis C. Facts and perspectives. *J Hepatol* 12:279-282.
2. Alberti, A. (2005). Towards more individualised management of hepatitis C virus patients with initially or persistently normal alanineaminotransferase levels. *J Hepatol* 42:266-274.
3. Appel, N., Pietschmann, T., Bartenschlager, R. (2005). Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 79:3187-3194.
4. Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., Brechot, C. (1997). Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1200-1205.
5. Bartenschlager, R. (2002). Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 1:911-916.
6. Bartenschlager, R., Frese, M., Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71-180.
7. Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., Koch, J. O. (1995). Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J Virol* 69:7519-7528.
8. Bartenschlager, R., Pietschmann, T. (2005). Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9739-9740.

9. Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., Cosset, F. L. (2003). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 278:41624-41630.
  
10. Bell, J., Batey, R. G., Farrell, G. C., Crewe, E. B., Cunningham, A. L., Byth, K. (1990). Hepatitis C virus in intravenous drug users. *Med J Aust* 153:274-276.
  
11. Berg, T., Hopf, U., Stark, K., Baumgarten, R., Lobeck, H., Schreier, E. (1997). Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J Hepatol* 26:484-491.
  
12. Bodenheimer, H. C. J., Lindsay, K. L., Davis, G. L., Lewis, J. H., Thung, S. N., Seeff, L. B. (1997). Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology* 26:473-477.
  
13. Bolumar, F., Hernandez-Aguado, I., Ferrer, L., Ruiz, I., Avino, M. J., Rebagliato, M. (1996). Prevalence of antibodies to hepatitis C in a population of intravenous drug users in Valencia, Spain, 1990-1992. *Int J Epidemiol* 25:204-209.
  
14. Burkardt, H. J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med* 38:87-91.
  
15. Butkiewicz, N. J., Wendel, M., Zhang, R., Jubin, R., Pichardo, J., Smith, E. B., Hart, A. M., Ingram, R., Durkin, J., Mui, P. W., Murray, M. G., Ramanathan, L., Dasmahapatra, B. (1996). Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides: identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity. *Virology* 225:328-338.

16. Chambers, T. J., Weir, R. C., Grakoui, A., McCourt, D. W., Bazan, J. F., Fletterick, R. J., Rice, C. M. (1990). Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8898-8902.
  
17. Charpentier, C., Dwyer, D. E., Mammano, F., Lecossier, D., Clavel, F., Hance, A. J. (2004). Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors. *J Virol* 78:4234-4247.
  
18. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
  
19. Clavel, F., Hance, A. J. (2004). HIV drug resistance. *N Engl J Med* 350:1023-1035.
  
20. Cline, J., Braman, J. C., Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 24:3546-3551.
  
21. Colin, C., Lanoir, D., Touzet, S., Meyaud-Kraemer, L., Bailly, F., Trepo, C. (2001). Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 8:87-95.
  
22. Di Bisceglie, A. M., Conjeevaram, H. S., Fried, M. W., Sallie, R., Park, Y., Yurdaydin, C., Swain, M., Kleiner, D. E., Mahaney, K., Hoofnagle, J. H. (1995). Ribavirin as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 123:897-903.
  
23. Dienstag, J. L. (1997). Sexual and perinatal transmission of hepatitis C. *Hepatology* 26:66S-70S.

24. Dubuisson, J. (2000). Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:135-148.
25. Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 68:6147-6160.
26. Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P. L., Sherlock, S., McIntyre, N., Simmonds, P. (1994). Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
27. Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T., Thiel, H. J. (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J Virol* 70:4131-4135.
28. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (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.
29. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (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.
30. Escuret, V., Martin, A., Durantel, D., Parent, R., Hantz, O., Trepo, C., Menguy, T., Bottius, E., Dardy, J., Maral, J., Escary, J. L., Zoulim, F. (2006). Novel alpha interferon (IFN-alpha) variant with improved inhibitory activity against hepatitis C virus genotype 1 replication compared to IFN-alpha2b therapy in a subgenomic replicon system. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3984-3991.

31. Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
32. 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.
33. Feldman, J. G., Minkoff, H., Landesman, S., Dehovitz, J. (2000). Heterosexual transmission of hepatitis C, hepatitis B, and HIV-1 in a sample of inner city women. *Sex Transm Dis* 27:338-342.
34. Ferenci, P., Ferenci, S., Datz, C., Rezman, I., Oberaigner, W., Strauss, R. (2007). Morbidity and mortality in paid Austrian plasma donors infected with hepatitis C at plasma donation in the 1970s. *J Hepatol* 47:31-36.
35. Forestier, N., Reesink, H. W., Weegink, C. J., McNair, L., Kieffer, T. L., Chu, H. M., Purdy, S., Jansen, P. L., Zeuzem, S. (2007). Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology* 46:640-648.
36. Francki R.I.B., Fauquet C. M., Knudson D.L., Brown F. (1991). Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virologie* supplement 2:223.
37. Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L. J., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347:975-982.
38. Gallinari, P., Brennan, D., Nardi, C., Brunetti, M., Tomei, L., Steinkuhler, C., De Francesco, R. (1998). Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *J Virol* 72:6758-6769.

39. Gebo, K. A., Herlong, H. F., Torbenson, M. S., Jenckes, M. W., Chander, G., Ghanem, K. G., El-Kamary, S. S., Sulkowski, M., Bass, E. B. (2002). Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology* 36:S161-72.
40. Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Zachoval, R., Gruener, N. H., Jung, M. C., Ulsenheimer, A., Schraut, W. W., Schirren, C. A., Waechtler, M., Backmund, M., Pape, G. R. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 125:80-88.
41. Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., Ray, R. B. (2000a). Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF-alpha mediated apoptotic cell death. *Virus Res* 67:173-178.
42. Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Yaciuk, P., Chrivia, J., Ray, R., Ray, R. B. (2000b). Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 275:7184-7188.
43. Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 77:5487-5492.
44. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67:1385-1395.
45. Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., Rowlands, D. J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535:34-38.

46. Hadziyannis, S. J., Sette, H. J., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H. J., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., Ackrill, A. M. (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.
47. Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S. G., Han, J. H., Balfe, P., McKeating, J. A. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82:5007-5020.
48. Herrine, S. K. (2002). Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 136:747-757.
49. Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K. (1993). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 67:4665-4675.
50. Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Wedemeyer, H., Reiser, M., Sentjens, R. E., Calleja, J. L., Forns, X., Erhardt, A., Cronlein, J., Chaves, R. L., Yong, C. L., Nehmiz, G., Steinmann, G. G. (2004). Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology* 127:1347-1355.
51. Hirota, M., Satoh, S., Asabe, S., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Kato, N., Hijikata, M., Shimotohno, K. (1999). Phosphorylation of nonstructural 5A protein of hepatitis C virus: HCV group-specific hyperphosphorylation. *Virology* 257:130-137.
52. Holland J.J., de la Torre J.J.C., Steinhauer D.A. (1992). Genetic diversity of RNA viruses. *RNA virus and populations as quasispecies* 1-20.

53. Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., Lemon, S. M. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222:31-42.
54. Hoofnagle, J. H. (1997). Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 26:15S-20S.
55. Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E., Moradpour, D. (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284:70-81.
56. IUPAC-IUB (1985). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry: Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Eur J Biochem* 150:1-5.
57. Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Santantonio, T., Mayer, J., Zankel, M., Pastore, G., Dietrich, M., Trautwein, C., Manns, M. P. (2001). Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 345:1452-1457.
58. Kamal, S. M., Fouly, A. E., Kamel, R. R., Hockenjos, B., Al Tawil, A., Khalifa, K. E., He, Q., Koziel, M. J., El Naggar, K. M., Rasenack, J., Afdhal, N. H. (2006). Peginterferon alfa-2b therapy in acute hepatitis C: impact of onset of therapy on sustained virologic response. *Gastroenterology* 130:632-638.
59. Kamal, S. M., Ismail, A., Graham, C. S., He, Q., Rasenack, J. W., Peters, T., Tawil, A. A., Fehr, J. J., Khalifa Kel, S., Madwar, M. M., Koziel, M. J. (2004). Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics. *Hepatology* 39:1721-1731.
60. Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., Shimotohno, K. (1990a). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9524-9528.

61. Kato, N., Yokosuka, O., Omata, M., Hosoda, K., Ohto, M. (1990b). Detection of hepatitis C virus ribonucleic acid in the serum by amplification with polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 86:1764-1767.
62. Kessler, H., Halbmeyer, W., Steizl, E., Haushofer, C. (2007). Guideline Molecular Diagnostics of Pathogens - Update 2007. *J Lab Med* 31:56-60.
63. Kieffer T, Sarrazin C, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, Wincheringer D, Lin C, Purdy S, Weegink CJ, Reesink HW, Kwong A, Zeuzem S (2006) Wild-type HCV NS3 protease re-emerges during follow-up after 14 days of dosing with VX-950 in patients with genotype 1 HCV. *J Hepatol*; 44: 7A.
64. Kieffer, T. L., Sarrazin, C., Miller, J. S., Welker, M. W., Forestier, N., Reesink, H. W., Kwong, A. D., Zeuzem, S. (2007). Telaprevir and pegylated interferon-alpha-2a inhibit wild-type and resistant genotype 1 hepatitis C virus replication in patients. *Hepatology* 46:631-639.
65. Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M. D., Landro, J. A., Chambers, S. P., Markland, W., Lepre, C. A., O'Malley, E. T., Harbeson, S. L., Rice, C. M., Murcko, M. A., Caron, P. R., Thomson, J. A. (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87:343-355.
66. Koch, J. O., Bartenschlager, R. (1999). Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 73:7138-7146.
67. Kolmodin, L., Williams J. F. (1997). PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic Engineering. 67:4.
68. Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70:3363-3371.

69. Korth, M. J., Katze, M. G. (2000). Evading the interferon response: hepatitis C virus and the interferon-induced protein kinase, PKR. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:197-224.
70. Kozlowski, A., Charles, S. A., Harris, J. M. (2001). Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs* 15:419-429.
71. Krekulova, L., Rehak, V., Riley, L. W. (2006). Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. *Folia Microbiol (Praha)* 51:665-680.
63. Kulkarni-Kale, U., Bhosle, S., Manjari, G. S., Kolaskar, A. S. (2004). VirGen: a comprehensive viral genome resource. *Nucleic Acids Res* 32:D289-92.
72. Kwok, S., Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238.
73. Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bos, M., Cameron, D. R., Cartier, M., Cordingley, M. G., Faucher, A. M., Goudreau, N., Kawai, S. H., Kukulj, G., Lagace, L., LaPlante, S. R., Narjes, H., Poupart, M. A., Rancourt, J., Sentjens, R. E., St George, R., Simoneau, B., Steinmann, G., Thibeault, D., Tsantrizos, Y. S., Weldon, S. M., Yong, C. L., Llinas-Brunet, M. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426:186-189.
74. Lau, J. Y., Tam, R. C., Liang, T. J., Hong, Z. (2002). Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 35:1002-1009.
75. Lawitz E, R.-T. M., Muir A, Keane J, Kieffer T, McNair L, McHutchison J (2006). 28 Days of the hepatitis C protease inhibitor VX-950, in combination with peg-interferon-alfa-2a (Pegasys) and ribavirin, is well-tolerated and demonstrates robust antiviral effects. *Gastroenterology* 131:950-951.

76. Leruez-Ville, M., Kunstmann, J. M., De Almeida, M., Rouzioux, C., Chaix, M. L. (2000). Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* 356(9223):42-43.
77. Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6:937-943.
78. Lesk, A. M., Fordham, W. D. (1996). Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* 258:501-537.
79. Lin, C., Gates, C. A., Rao, B. G., Brennan, D. L., Fulghum, J. R., Luong, Y. P., Frantz, J. D., Lin, K., Ma, S., Wei, Y. Y., Perni, R. B., Kwong, A. D. (2005). In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem* 280:36784-36791.
80. Lin, C., Lin, K., Luong, Y. P., Rao, B. G., Wei, Y. Y., Brennan, D. L., Fulghum, J. R., Hsiao, H. M., Ma, S., Maxwell, J. P., Cottrell, K. M., Perni, R. B., Gates, C. A., Kwong, A. D. (2004). In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem* 279:17508-17514.
81. Lindstrom, H., Lundin, M., Haggstrom, S., Persson, M. A. (2006). Mutations of the Hepatitis C virus protein NS4B on either side of the ER membrane affect the efficiency of subgenomic replicons. *Virus Res* 121:169-178.
82. Liu, Q., Bhat, R. A., Prince, A. M., Zhang, P. (1999). The hepatitis C virus NS2 protein generated by NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 254:572-577.
83. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999a). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.

84. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999b). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
85. Lu, L., Pilot-Matias, T. J., Stewart, K. D., Randolph, J. T., Pithawalla, R., He, W., Huang, P. P., Klein, L. L., Mo, H., Molla, A. (2004). Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2260-2266.
86. Lu, W., Lo, S. Y., Chen, M., Wu, K., Fung, Y. K., Ou, J. H. (1999). Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 264:134-141.
87. Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Zhou, X. Y., Phillips, N. J., Ray, R., Ray, R. B. (2002). Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis, but not by an anti-FAS antibody, in transgenic mice. *Virology* 294:94-105.
88. Manns, M. P., Rambusch, E. G. (2001). Extrahepatische Manifestationen und Autoimmunität bei Hepatitis C. In "Hepatitis C" (Häussinger, D., and Niederau, C., Eds.) pp. 167-188. Blackwell Wissenschafts Verlag, Berlin, Wien.
89. Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J. K. (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.
90. Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., Gomez, J. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.
91. McHutchison, J. G., Manns, M., Patel, K., Poynard, T., Lindsay, K. L., Trepo, C., Dienstag, J., Lee, W. M., Mak, C., Garaud, J. J., Albrecht, J. K. (2002). Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 123:1061-1069.

92. McLauchlan, J. (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat* 7:2-14.
93. McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (2007). Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2879-2884.
94. Meunier, J. C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J., Wychowski, C. (1999). Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* 80:887-896.
95. Miller, R. H., Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2057-2061.
96. Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E., Bienz, K. (2003). Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res* 60:103-109.
97. Morgenstern, K. A., Landro, J. A., Hsiao, K., Lin, C., Gu, Y., Su, M. S., Thomson, J. A. (1997). Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J Virol* 71:3767-3775.
98. National Institutes of Health. (2002). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* 36:S3-20.
99. Neddermann, P., Tomei, L., Steinkuhler, C., Gallinari, P., Tramontano, A., De Francesco, R. (1997). The nonstructural proteins of the hepatitis C virus: structure and functions. *Biol Chem* 378:469-476.

100. Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., Perelson, A. S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.
101. Ohto, H., Terazawa, S., Sasaki, N., Sasaki, N., Hino, K., Ishiwata, C., Kako, M., Ujiie, N., Endo, C., Matsui, A. (1994). Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 330:744-750.
102. Patti, A. M., Santi, A. L., Pompa, M. G., Giustini, C., Vescia, N., Mastroeni, I., Fara, G. M. (1993). Viral hepatitis and drugs: a continuing problem. *Int J Epidemiol* 22:135-139.
103. Pawlotsky, J. M. (2003). Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 7:45-66.
104. Perni, R. B., Almquist, S. J., Byrn, R. A., Chandorkar, G., Chaturvedi, P. R., Courtney, L. F., Decker, C. J., Dinehart, K., Gates, C. A., Harbeson, S. L., Heiser, A., Kalkeri, G., Kolaczowski, E., Lin, K., Luong, Y. P., Rao, B. G., Taylor, W. P., Thomson, J. A., Tung, R. D., Wei, Y., Kwong, A. D., Lin, C. (2006). Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob Agents Chemother* 50:899-909.
105. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.
106. Polywka, S., Schroter, M., Feucht, H. H., Zollner, B., Laufs, R. (1999). Low risk of vertical transmission of hepatitis C virus by breast milk. *Clin Infect Dis* 29:1327-1329.

107. Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C., Albrecht, J. (1998). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352:1426-1432.
108. Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W., Millian, S. J. (1974). Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* 2:241-246.
109. Reed, K. E., Rice, C. M. (1999). Identification of the major phosphorylation site of the hepatitis C virus H strain NS5A protein as serine 2321. *J Biol Chem* 274:28011-28018.
110. Reesink, H. W., Zeuzem, S., Weegink, C. J., Forestier, N., van Vliet, A., van de Wetering de Rooij, J., McNair, L., Purdy, S., Kauffman, R., Alam, J., Jansen, P. L. (2006). Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology* 131:997-1002.
111. Reichard, O., Norkrans, G., Fryden, A., Braconier, J. H., Sonnerborg, A., Weiland, O. (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.
112. Reiser, M., Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Reesink, H. W., Wedemeyer, H., Avendano, C., Riba, N., Yong, C. L., Nehmiz, G., Steinmann, G. G. (2005). Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 41:832-835.
113. Rice, C. M. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology* 931-960.
114. Richman, D. D. (2006). Antiviral drug resistance. *Antiviral Res* 71:117-121.

115. Rispeter, K., Lu, M., Behrens, S. E., Fumiko, C., Yoshida, T., Roggendorf, M. (2000). Hepatitis C virus variability: sequence analysis of an isolate after 10 years of chronic infection. *Virus Genes* 21:179-188.
116. Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shinji, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., Weiner, A. (1998). Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch Virol* 143:2493-2503.
117. Ross, R. S., 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.
118. Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P., Sander, C. (1995). Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* 4:521-533.
119. Saito, K., Meyer, K., Warner, R., Basu, A., Ray, R. B., Ray, R. (2006). Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J Virol* 80:4372-4379.
120. Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11646-11651.
121. Sarrazin, C., Bruckner, M., Herrmann, E., Ruster, B., Bruch, K., Roth, W. K., Zeuzem, S. (2001). Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 289:150-163.

122. Sarrazin, C., Rouzier, R., Wagner, F., Forestier, N., Larrey, D., Gupta, S. K., Hussain, M., Shah, A., Cutler, D., Zhang, J., Zeuzem, S. (2007). SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 132:1270-1278.
123. Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36:S35-46.
124. Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H. (2003). Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002. *Clin Liver Dis* 7:261-287.
125. Shafer, R. W. (2002). Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 15:247-277.
126. Shafer, R. W., Schapiro, J. M. (2008). HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev* 10:67-84.
127. Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., Miyamura, T. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 73:9718-9725.
128. Shin, E. C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C. M., Feinstone, S. M., Kloetzel, P. M., Rehmann, B. (2006). Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 116:3006-3014.
129. Siliciano, R. F. (2005). Scientific rationale for antiretroviral therapy in 2005: viral reservoirs and resistance evolution. *Top HIV Med* 13:96-100.
130. Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74:2391-2399.

131. Simmonds, P., Smith, D. B., McOmish, F., Yap, P. L., Kolberg, J., Urdea, M. S., Holmes, E. C. (1994). Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 75:1053-1061.
132. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42:962-973.
133. Stark, K., Schreier, E., Muller, R., Wirth, D., Driesel, G., Bienzle, U. (1995). Prevalence and determinants of anti-HCV seropositivity and of HCV genotype among intravenous drug users in Berlin. *Scand J Infect Dis* 27:331-337.
134. Steinmann, E., Whitfield, T., Kallis, S., Dwek, R. A., Zitzmann, N., Pietschmann, T., Bartenschlager, R. (2007). Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus. *Hepatology* 46:330-338.
135. Stramer, S. L. (2007). Current risks of transfusion-transmitted agents: a review. *Arch Pathol Lab Med* 131:702-707.
136. Susser S., Zettler M., Welsch C., Welker M., Wohnsland A., Hughes E., Ralston R., Tong X., Zeuzem S., Sarrazin C. (2008). Genotypic and phenotypic characterization of mutations within the HCV NS3 protease 1 infected patients treated with the protease inhibitor Boceprevir. *Präsentation EASL*
138. Takeda, Y., Okoshi, S., Suzuki, K., Yano, M., Gangemi, J. D., Jay, G., Asakura, H., Aoyagi, Y. (2004). Effect of interferon alpha and cell cycle progression on translation mediated by the hepatitis C virus 5' untranslated region: a study using a transgenic mouse model. *J Viral Hepat* 11:33-44.
139. Tan, S. L., Katze, M. G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 284:1-12.

140. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 70:3307-3312.
141. Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285:107-110.
142. Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Rice, C. M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435:374-379.
143. Thomas, D. L., Vlahov, D., Solomon, L., Cohn, S., Taylor, E., Garfein, R., Nelson, K. E. (1995a). Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users. *Medicine (Baltimore)* 74:212-220.
144. Thierfelder, W., Meisel, H., Schreier, E., Dortschy, R. (1999). [Prevalence of antibodies to hepatitis A, hepatitis B and hepatitis C viruses in the German population]. *Gesundheitswesen* 61 (Suppl 2) 110-114.
145. Thomas, D. L., Zenilman, J. M., Alter, H. J., Shih, J. W., Galai, N., Carella, A. V., Quinn, T. C. (1995b). Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 171:768-775.
146. Tokita, H., Okamoto, H., Iizuka, H., Kishimoto, J., Tsuda, F., Lesmana, L. A., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1996). Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J Gen Virol* 77:293-301.
147. Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J., Malcolm, B. A. (2006). Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res* 70:28-38.

148. Trozzi, C., Bartholomew, L., Ceccacci, A., Biasiol, G., Pacini, L., Altamura, S., Narjes, F., Muraglia, E., Paonessa, G., Koch, U., De Francesco, R., Steinkuhler, C., Migliaccio, G. (2003). In vitro selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor. *J Virol* 77:3669-3679.
149. Villano, S. A., Vlahov, D., Nelson, K. E., Cohn, S., Thomas, D. L. (1999). Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 29:908-914.
150. Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7:710-721.
151. Wang, Y. S., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., Wyss, D. F. (2002). Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 54:547-570.
152. Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C., Darke, P. L. (2001). Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13931-13935.
153. Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3468-3472.
154. Welsch, C., Albrecht, M., Maydt, J., Herrmann, E., Welker, M. W., Sarrazin, C., Scheidig, A., Lengauer, T., Zeuzem, S. (2007). Structural and functional comparison of the non-structural protein 4B in flaviviridae. *J Mol Graph Model* 26:546-557.

155. Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C. M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., Jaeckel, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P. (2006). Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEP-NET acute-HCV-II study. *Hepatology* 43:250-256.
156. Wohnsland, A., Hofmann, W. P., Sarrazin, C. (2007). Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev* 20:23-38.
157. Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2291-2295.
158. Yang, J. M., Wang, R. Q., Bu, B. G., Zhou, Z. C., Fang, D. C., Luo, Y. H. (1999). Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 5:25-27.
159. Yi, M., Tong, X., Skelton, A., Chase, R., Chen, T., Prongay, A., Bogen, S. L., Saksena, A. K., Njoroge, F. G., Veselenak, R. L., Pyles, R. B., Bourne, N., Malcolm, B. A., Lemon, S. M. (2006). Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J Biol Chem* 281:8205-8215.
160. Zanetti, A. R., Tanzi, E., Newell, M. L. (1999). Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J Hepatol* 31 Suppl 1:96-100.
161. Zeuzem, S. (2004). [Standard treatment of acute and chronic hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 42:714-719.
162. Zeuzem, S., Buti, M., Ferenci, P., Sperl, J., Horsmans, Y., Cianciara, J., Ibranyi, E., Weiland, O., Noviello, S., Brass, C., Albrecht, J. (2006). Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. *J Hepatol* 44:97-103.

163. Zeuzem, S., Heathcote, J. E., Martin, N., Nieforth, K., Modi, M. (2001). Peginterferon alfa-2a (40 kDa) monotherapy: a novel agent for chronic hepatitis C therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 10:2201-2213.
164. Zignego, A. L., Giannini, C., Ferri, C. (2007). Hepatitis C virus-related lymphoproliferative disorders: an overview. *World J Gastroenterol* 13:2467-2478.

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Dr. med. Christoph M. Sarrazin danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und die fachliche Unterstützung während jeder Phase meiner Arbeit.

Herrn Dr. med. Martin Welker, meinem Betreuer, danke ich für seine Freundschaft. Ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Dr. med. Nicole Forestier danke ich ihre Hilfe bei der Durchführung dieser Studie.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen im Labor für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung.

## 13 Lebenslauf

Name: Dennis Wincheringer

Geburtsdatum: 10.07.1977

Geburtsort: Dernbach, Deutschland

Wohnort: Sponheimer Straße 55  
56841 Traben-Trarbach

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1984-1988  
Grundschule, Traben-Trarbach

1988-1996  
Gymnasium, Traben-Trarbach  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang: 1996-1997  
Wehrersatzdienst Cusanusstift, Bernkastel-Kues

1997-2002  
Professioneller Golfer  
Mitglied EPD-Tour  
Mitglied European Challenge Tour

2000-2002  
Ausbildung zum Diplom Golflehrer im GC Trier, Trier

Studium: seit 2002  
Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Universitätsklinikum Homburg

2004  
Ärztliche Vorprüfung