

Aus dem Bereich Virologie  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Genotypische und phänotypische Untersuchungen zu  
Resistenzmechanismen des Hepatitis C Virus  
gegenüber NS3 Protease Inhibitoren

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2009

vorgelegt von: Simone Susser  
geboren am: 07. Mai 1977 in Ludwigshafen am Rhein



1. Gutachter: Prof. Dr. N. Müller-Lantsch

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Sarrazin

Wenn eine Idee am Anfang nicht absurd klingt, gibt es für sie keine  
Hoffnung!

Albert Einstein

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung und Ausblick.....	1
1.2 Summary and Outlook.....	3
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1 Das Hepatitis C Virus.....	5
2.2 Taxonomie .....	7
2.3 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus.....	8
2.3.1 HCV Quasispezies .....	8
2.3.2 Genomorganisation .....	11
2.3.3 Strukturelle Proteine .....	12
2.3.4 Nichtstrukturelle Proteine .....	14
2.4 Lebenszyklus des Hepatitis C Virus .....	18
2.5 Immunbiologie .....	21
2.6 Medizinische Bedeutung des Hepatitis C Virus .....	23
2.6.1 Infektion und natürlicher Verlauf.....	23
2.6.2 Diagnostik .....	24
2.6.3 Therapie.....	25
2.6.4 Neue Therapieansätze .....	28
2.7 Modellsysteme zur <i>in vitro</i> Analyse von HCV .....	32
2.7.1 Tiermodelle .....	32
2.7.2 Zellkulturmodelle .....	33
<b>3 Fragestellung .....</b>	<b>36</b>
<b>4 Material und Patienten .....</b>	<b>38</b>
4.1 Reagenzien.....	40
4.2 Proteaseinhibitoren .....	43
4.3 Enzyme .....	43
4.3.1 Restriktionsendonukleasen .....	43
4.3.2 Andere Enzyme .....	43

4.4	Fertige Reagenziensets .....	44
4.5	Zellen.....	45
4.6	Vektoren .....	45
4.7	Oligonukleotide .....	45
4.7.1	Primer für die Mutagenese .....	46
4.7.2	Primer für PCR und Sequenzierung.....	47
4.7.3	TaqMan Primer und Sonde.....	47
4.8	Geräte.....	48
4.9	Software.....	49
4.10	Patienten.....	49
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
5.1	HCV RNA Extraktion aus Patientenserum .....	50
5.2	Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR) ..	50
5.3	Elektrophorese .....	53
5.3.1	DNA Agarose-Gelelektrophorese .....	53
5.3.2	RNA Formaldehyd-Gelelektrophorese .....	54
5.3.3	On-Chip-Elektrophorese.....	54
5.4	Aufreinigung von DNA.....	55
5.4.1	Gelaufreinigung .....	55
5.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	55
5.5	Klonierung und Transformation von PCR-Produkten .....	56
5.6	Retransformation von Plasmiden .....	56
5.7	Animpfen der Über-Nacht-Kulturen.....	56
5.8	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	56
5.9	Photometrische Nukleinsäurekonzentration Bestimmung .....	56
5.10	Sequenz-PCR und Sequenzierung.....	57
5.11	Auswertung der Sequenzen .....	58
5.12	Mutagenese.....	58
5.13	Restriktion von DNA.....	59
5.14	<i>In vitro</i> Transkription.....	59
5.15	Transfektion von Huh-7-Lunet Zellen .....	60
5.16	HCV Replikon Assay.....	61
5.17	Zellkultur .....	61

5.18	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen .....	62
5.19	Real-time quantitative PCR (TaqMan) .....	62
5.20	Curve-Fitting.....	64
5.21	Statistik .....	65
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
6.1	Virologisches Ansprechen auf die Therapie .....	66
6.2	Genotypische Resistenzanalyse .....	68
6.2.1	Verteilungsmuster der Mutationen unter Berücksichtigung des virologischen Ansprechens und des Subtyps .....	73
6.2.1.1	Verteilung der Mutationen bei den zwei Patientengruppen.....	73
6.2.1.2	Verteilung der Mutationen bei Patienten mit Subtyp 1a bzw. 1b.....	76
6.3	Phänotypische Resistenzanalyse.....	77
6.3.1	Einbau der Mutationen ins Replikon .....	78
6.3.2	Replikon IC <sub>50</sub> -Bestimmung.....	80
6.3.3	Neue Resistenzmutation.....	84
6.3.4	Kreuzresistenzen.....	86
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
7.1	Genotypische Resistenzanalyse .....	89
7.1.1	Korrelation von Viruslast und Mutationen mit dem Plasmaspiegel .....	96
7.1.2	Korrelation von Mutationen und virologischem Ansprechen.....	98
7.2	Phänotypische Resistenzanalyse.....	101
7.3	V55A – Eine neu entdeckte Resistenzmutation .....	102
7.4	Kreuzresistenzen.....	104
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>V</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>VI</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3'NTR	3'nicht-translatierte Region
5'NTR	5'nicht-translatierte Region
A. dest	Aqua destillata
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	core (Kapsid)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
c-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFU	end-of-follow-up
EOT	end-of-treatment
EtOH	Ethanol
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GT	Genotyp
h	Stunden
HCV	Hepatitis C Virus
HCVcc	cell culture grown HCV (HCV Zellkulturmodell)
HCVpp	HCV Pseudopartikel
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HVR	hypervariable Region
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$

---

IRES	internal ribosome entry site (interne Ribosomenbindungsstelle)
IU	international units
max.	maximal
min	Minuten
ml	Milliliter
kb	Kilobasen
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
LB	Luria-Broth
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykolmolekül
PEG-IFN $\alpha$	pegyliertes Interferon- $\alpha$
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
NS	Nichtstrukturprotein
n-terminal	aminoterminal
RdRp	RNA-dependent RNA-polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RNase	Ribonuklease
RBV	Ribavirin
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunden
STAT-C	specifically targeted antiviral therapies against hepatitis C (spezifisch gerichtete antivirale Therapien gegen Hepatitis C)
SVR	sustained virologic response (dauerhaftes virologisches Ansprechen)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Verteilung der HCV Genotypen .....	11
Abbildung 2: HCV Genomorganisation und Prozessierung des Polyproteins .....	12
Abbildung 3: Sekundärstruktur-Darstellung (Ribbon-Modell) der NS3 Protease zusammen mit dem NS4A Kofaktor .....	15
Abbildung 4: Membrantopologie der HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine.....	17
Abbildung 5: Zelleintritt des Hepatitis C Virus .....	18
Abbildung 6: HCV Lebenszyklus .....	21
Abbildung 7: Mikroskopisches Bild von normalem Lebergewebe.....	24
Abbildung 8: Durch Hepatitis C stark verändertes Lebergewebe im mikroskopischen Bild.....	24
Abbildung 9: Strukturformeln von VX-950 (Telaprevir) und SCH503034 (Boceprevir).....	32
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Replikon-Konstrukts.....	33
Abbildung 11: Mittlerer Viruslastverlauf der zwei Patientengruppen.....	67
Abbildung 12: Ergebnisse der Amplifikation des NS3 Protease Gens der Genotyp 1b Patienten .....	69
Abbildung 13: Ergebnisse der Amplifikation des NS3 Protease Gens der Genotyp 1a Patienten .....	69
Abbildung 14: Alle Mutationen über 5 % (EOT) in beiden Patientengruppen.....	71
Abbildung 15: Anzahl der Mutationen über 5 % in den verschiedenen Patientengruppen und zugehörige Plasmaspiegel von Boceprevir .....	72
Abbildung 16: Verteilung der Mutationen bei Patienten mit maximalem HCV RNA Abfall $\geq 2\log_{10}$ IU/ml .....	74
Abbildung 17: Verteilung der Mutationen bei Patienten mit maximalem HCV RNA Abfall $< 2\log_{10}$ IU/ml.....	75
Abbildung 18: Wildtyp - T54A Mutation .....	78
Abbildung 19: Kontrollgel des aufgereinigten AseI/ScaI-Verdaus.....	79
Abbildung 20: Qualitätskontrolle der transkribierten RNA .....	79

---

Abbildung 21: Boceprevir Replikon IC <sub>50</sub> Phänotyp.....	82
Abbildung 22: Relative Fitness der Boceprevir resistenten Varianten.....	84
Abbildung 23: SCH503034 am aktiven Zentrum der NS3 Protease.....	85
Abbildung 24: Telaprevir Replikon IC <sub>50</sub> Phänotyp.....	86
Abbildung 25: Vergleich der n-fachen IC <sub>50</sub> Änderung bei Boceprevir und Telaprevir.....	87

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomie der Hepatitis Viren .....	5
Tabelle 2: Taxonomische Klassifikation der Flaviviridae .....	8
Tabelle 3: HCV Geno-/Subtypen (modifiziert nach Simmonds et al. 2005) .....	10
Tabelle 4: Viruslasten und Medikamentendosierung der untersuchten Patienten.....	66
Tabelle 5: Mutationen (> 5 % zu EOT) mit Abfall im Verlauf bei mehr als einem Patienten .....	73
Tabelle 6: Verteilung der Resistenzmutationen bei Patienten verschiedener Subtypen .....	77
Tabelle 7: Konzentrationen der Proteaseinhibitoren für den Replikonassay .....	81
Tabelle 8: Geschätzte relative Fitness Werte der resistenten Varianten...	83
Tabelle 9: Enzym IC <sub>50</sub> von V55A im Vergleich zum Wildtyp .....	85

# 1 Zusammenfassung/Summary

## 1.1 Zusammenfassung und Ausblick

Geschätzte 3 % der Weltbevölkerung sind aktuell mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Verläuft die Infektion chronisch, führt dies in vielen Fällen innerhalb von 10 – 30 Jahren zu einer Leberzirrhose, welche ihrerseits im Verlauf mit einem Leberversagen einhergehen kann und die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms begünstigt. Die dauerhafte virologische Ansprechrate auf die Standardtherapie, mit pegyliertem Interferon- $\alpha$  und Ribavirin, von Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert sind, beträgt lediglich 40 – 50 %. Aus diesem Grund werden dringend neue Therapien benötigt. Ein vielversprechender Ansatz ist die aktuelle Entwicklung direkt antiviraler Medikamente. Durch die Behandlung von Infektionen von Patienten mit z. B. einer HIV oder HBV Infektion, ist bekannt, dass die Ausbildung resistenter Varianten eine wesentliche Limitierung einer solchen direkt antiviralen Therapie darstellt. Wie sich in ersten Studien zeigte, kann es auch bei der direkt antiviralen Behandlung des HCV zur Selektion von resistenten Varianten kommen. Eine genaue Charakterisierung des Resistenzprofils der einzelnen direkt antiviralen Substanzen ist somit wesentlich. Aktuell befinden sich zwei Substanzen in der Phase 3 der klinischen Entwicklung (Telaprevir und Boceprevir), welche voraussichtlich 2011/12 zugelassen werden.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die Erstcharakterisierung des Resistenzprofils des HCV NS3 Proteaseinhibitors Boceprevir. Dazu wurden Seren von 22 Non-Responder Patienten untersucht, welche an einer 14-tägigen Phase 1 Studie teilgenommen haben und während dieser Zeit eine Boceprevir Monotherapie erhielten. Aus dem Patientenserum von Tag -1 (vor Therapie), Tag 14 (Ende der Therapie) und Tag 28 (Verlauf) wurde die virale RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, mittels „nested“ bzw. „semi-nested“ PCR das NS3 Proteasegen amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert. Pro Patient konnten so durchschnittlich die

NS3 Proteasesequenzen von 47 Isolaten vom Ende der Therapie und vom Verlaufszeitpunkt ausgewertet und mit der Direktsequenz vor Therapie verglichen werden. Aus dieser genotypischen Analyse ließen sich Mutationen detektieren, welche bereits *in vitro* mit einer Resistenz gegenüber Boceprevir assoziiert waren. Zusätzlich wurden neue Mutationen entdeckt, deren potentielle Assoziation mit einer Resistenz gegenüber Boceprevir weiter untersucht werden musste.

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden die detektierten Mutationen in das Con-1b Replikon eingebaut und in einem Assay gegen Boceprevir und Telaprevir getestet. Auf diese Weise konnten die IC<sub>50</sub>-Werte für alle Mutationen und die Wildtypsequenz bestimmt werden.

Für folgende Mutationen konnte eindeutig die Erhöhung des Resistenzniveaus gegen Boceprevir gezeigt werden: V36G, T54A, T54S, V55A, R155K, R155L, A156S, A156T und V170A. Alle genannten Mutationen zeigten zudem eine Kreuzresistenz gegenüber Telaprevir. Für V55A konnte erstmals gezeigt werden, dass sie eine Resistenz gegenüber Boceprevir und auch Telaprevir verursacht. Der Wirkmechanismus dieser neuen Mutationen wurde durch eine *in silico* Analyse erklärt und das Resistenzpotential bestätigt. Damit wurde in der vorliegenden Studie zum ersten Mal das klinische Resistenzprofil des Proteaseinhibitors Boceprevir charakterisiert.

Allerdings wurde unter der Therapie mit Boceprevir die Selektion einer Reihe weiterer Mutationen nachgewiesen, die jedoch lediglich bei einzelnen Patienten und/oder in niedriger Frequenz in der HCV Quasispezies auftraten und in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Hier sind weitere Untersuchungen zur Fein-Charakterisierung des Resistenzprofils notwendig. Weiterhin ist eine Resistenzentwicklung auch außerhalb von Mutationen im Bereich der NS3 Protease möglich. Für zukünftige Untersuchungen wäre hier eine genotypische Analyse der NS3 Helikase, des NS4A Kofaktors und der NS3-Protease-Schnittstellen anzustreben.

## 1.2 Summary and Outlook

### Genotypic and phenotypic characterization of resistance against hepatitis C virus NS3 protease inhibitors

An estimated 3 % of the worlds' population suffers from a hepatitis C virus infection at present. In many cases, a chronic course of the infection leads to liver cirrhosis within 10 – 30 years, which could go along with liver failure. The development of a hepatocellular carcinoma was promoted as well. The sustained virologic response (SVR) rate of HCV genotype 1 infected patients to standard of care (SOC) treatment, which consists of pegylated interferon-alfa and ribavirin is only 40 – 50 %. For that reason there is an urgent need for new treatment options. One promising approach is the current development of specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-C). By treatment of patients with HIV or HBV infections, e. g., it is known, that development of resistant variants represents a significant limitation in this direct antiviral therapy. As seen in initial studies, direct antiviral treatment of an HCV infection can lead to selection of resistant variants, too. An exact characterization of the resistance profile for each direct antiviral compound is hence essential. Up to date, there are two substances investigated in clinical phase 3 studies (telaprevir and boceprevir). Their approval will presumably be in 2010/11.

In this study, the resistance profile of the NS3 protease inhibitor boceprevir was characterized for the first time. For that purpose the sera from 22 non-responder patients was investigated. The patients took part in a 14-day phase 1b study and obtained boceprevir monotherapy for that time. Viral RNA was isolated from the patients' sera at day -1 (baseline), at day 14 (end-of-treatment (EOT)) and at day 28 (end-of-follow-up (EFU)); cDNA was subsequently generated and the HCV NS3 protease gene was amplified by nested- and semi-nested PCR, respectively. After cloning and sequencing a mean of 47 sequences of the NS3 protease gene could be analyzed from EOT and EFU. These sequences were compared to the directly sequenced baseline before treatment. With this genotypic analysis

mutations were detected which were already associated with resistance against boceprevir *in vitro*. Additionally other mutations were observed, which potential association with resistance against boceprevir had to be further investigated.

All of these mutations were inserted in the Con-1b replicon for phenotypic analysis. In an assay they were tested against boceprevir and telaprevir. Thus, IC<sub>50</sub> values for all mutations and the wildtype sequence could be determined.

For the following mutations an increase of the resistance level against boceprevir could be shown clearly: V36G, T54A, T54S, V55A, R155K, R155L, A156S, A156T, and V170A. Furthermore, all these mutations showed cross-resistance to telaprevir. For the first time, V55A was shown to be associated with resistance against boceprevir and telaprevir. The mechanism of action for V55A was explained by an *in silico* analysis and the resistance potential was confirmed. So, in the present study, for the first time the clinical resistance profile of boceprevir was characterized.

During antiviral treatment with boceprevir selection of a high number of variants could be shown, which occurred in single patients only and/or to a low extend in the HCV quasispecies. These variants could not all be analyzed in the context of this study. Further investigations are necessary for a more precise characterization of the resistance profile. Development of resistance beyond mutations within the NS3 protease is also possible. For future studies a genotypic analysis of the NS3 helicase, the NS4A cofactor and the NS3/4A protease cleavage sites is aspired.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Hepatitis C Virus

Schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde vermutet, dass neben den zu dieser Zeit bekannten Hepatitis A und Hepatitis B Viren, noch ein weiteres Hepatitis Virus existiert, welches für das häufige Vorkommen einer akuten Hepatitis nach Bluttransfusionen verantwortlich gemacht wurde (Purcell, 1993). Experimentelle Daten zeigten die Existenz eines RNA Virus, das zu einer oft chronisch verlaufenden Posttransfusionshepatitis führte. Viele Versuche dieses Non-A Non-B Hepatitis Virus zu isolieren, schlugen fehl. Erst 1989 gelang es, mit Hilfe einer riesigen Genexpressionsbibliothek auf der Grundlage infizierter Schimpansen aus einem positiven Klon das Genom, des jetzt Hepatitis C Virus (HCV) genannten Erregers, zu sequenzieren (Choo et al., 1989; Bradley, 2000). Heute unterscheidet man fünf verschiedene Hepatitis Viren, deren Familienzugehörigkeit und Genus in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Taxonomie der Hepatitis Viren

Virus	Familie	Genus
<b>Hepatitis A Virus</b>	Picornaviridae	Hepatovirus
<b>Hepatitis B Virus</b>	Hepadnaviridae	Orthohepadnavirus
<b>Hepatitis C Virus</b>	Flaviviridae	Hepacivirus
<b>Hepatitis D Virus</b>		Deltavirus
<b>Hepatitis E Virus<sup>(1)</sup></b>		Hepevirus

(1) Der Buchstabe "F" im Alphabet der Hepatitisviren wurde bereits im Jahre 1994 (Deka et al.) vorläufig an ein anderweitiges hepatotropes, enteritisch übertragbares Virus vergeben (Hepatitis-F-Virus; HFV). Anschließende Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen und legten eine Kontamination mit dem Hepatitis A Virus nahe. Der Buchstabe "G" wurde ebenfalls für ein vermeintliches Hepatitisvirus vergeben (HGV/GBV-C Virus). Hier wurde in der Folge jedoch nachgewiesen, dass es sich bei dem HGV/GBV-C Virus nicht um ein hepatotropes Virus handelt.

Schätzungen der WHO zufolge, sind heute rund 180 Millionen Menschen weltweit mit dem Hepatitis C Virus infiziert. Dies entspricht einem Anteil von 3 % der gesamten Weltbevölkerung. Rund 130 Millionen sind dabei chronische HCV Träger. Die chronische Hepatitis C wiederum geht mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) einher. Die HCV Infektion gilt als eine Hauptursache für chronische Lebererkrankungen und einer der häufigsten Gründe für eine Lebertransplantation in den westlichen Industrienationen (Seeff, 2002; WHO, 2009).

Man unterscheidet beim Hepatitis C Virus sechs Genotypen und diverse Subtypen (siehe Kapitel 1.3.1), die regional unterschiedlich verteilt sind (Robertson et al., 1998). Die in Europa vorherrschenden Genotypen sind 1b, 1a, 3 und 2 (Berg et al., 1997; Esteban et al., 2008).

Bevor man den Erreger der HCV Infektion nachweisen konnte, bestand der Hauptübertragungsweg in kontaminierten Bluttransfusionen. Mit der Isolierung der RNA des Virus begann die Entwicklung von Tests, mit Hilfe derer man die Blutkonserven auf Kontamination prüfen konnte. Heute gibt es standardisierte Testverfahren für den Nachweis von HCV Antikörpern und HCV RNA, womit das Kontaminationsrisiko auf ein Minimum gesunken ist. In nur noch einem von ca. 2 Millionen Fällen erfolgt eine Transmission des Hepatitis C Virus über eine Bluttransfusion (Stramer, 2007). Heute zählt ein intravenöser oder intranasaler Drogenkonsum, bei dem die Nadeln bzw. Röhrchen von mehreren Abhängigen genutzt werden, zu den Hauptursachen für eine Ansteckung mit dem HCV. Auch eine sexuelle Übertragung ist durchaus möglich, jedoch selten, da anders als bei der HBV Infektion ein direkter Blut-Blutkontakt notwendig ist. Deshalb spielt dieser Übertragungsweg für die HCV Infektion eine eher untergeordnete Rolle (Feldman et al., 2000; Leruez-Ville et al., 2000); ebenso die perinatale Infektion, bei der das Virus von der infizierten Mutter auf das Kind übertragen wird. Das Risiko einer Infektion liegt hier bei 4 – 7 % (Zanetti et al., 1999; Ohto et al., 1994).

Da eine HCV Infektion meist asymptomatisch verläuft, erfolgt der Nachweis oft erst viele Jahre nach der Ansteckung, wenn es schon zu

Schäden der Leber, wie Fibrose, Zirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom, gekommen ist. Die Infektionsquelle ist nach dieser Zeit oftmals nicht mehr zu identifizieren und dies ist eine Erklärung, warum bei einem großen Anteil der Patienten (20 – 40 %) der Übertragungsweg unklar bleibt (Herrine, 2002).

Auch nach der Entdeckung des Hepatitis C Virus können ca. 10 – 20 % der Virushepatitiden keinem bekannten Hepatitisvirus zugeordnet werden (Non-A-E-Hepatitis). Daraus lässt sich schließen, dass es noch weitere Hepatitis auslösende Viren geben muss. Neben den bereits seit Mitte der Neunziger Jahre bekannten GB Viren A, B und C gibt es weitere, kürzlich entdeckte Kandidaten, wie der aus einem japanischen Patienten isolierte TT-Virus und der in Italien gefundene SEN-Virus. Allerdings ist die genaue Rolle dieser Viren bislang noch nicht genügend geklärt, weshalb hier nicht näher darauf eingegangen wird (Bowden, 2001).

## 2.2 Taxonomie

Das Hepatitis C Virus ist ein hepatotropes, parenteral übertragbares Humanpathogen. Es ist zusammen mit dem GB-Virus B der einzige Vertreter des Genus Hepacivirus in der Familie der Flaviviridae, zu denen auch die Flaviviren und die Pestiviren zählen. Die wichtigsten Vertreter dieser Familie sind in Tabelle 2 aufgeführt (Fauquet C.M. et al., 2005). Flaviviren sind ebenfalls humanpathogen, benötigen aber, im Gegensatz zu HCV, Arthropoden als Überträger. Pestiviren hingegen sind ausschließlich tierpathogen und können ebenso wie HCV direkt persistente Infektionen in Säugetieren hervorrufen. Phylogenetisch gleicht HCV mehr den Pestiviren als den Flaviviren.

Tabelle 2: Taxonomische Klassifikation der Flaviviridae

<i>Familie</i>		<b>Flaviviridae</b>			
<i>Genus</i>	<b>Flavivirus</b>	<b>Hepacivirus</b>	<b>Pestivirus</b>	<b>Neuer Genus?</b>	
<i>Spezies</i>	FSME	HCV	BDV	GBV-A	
	YFV	GBV-B	BVDV	HGV/GBV-C	
	DENV		HCHV		
	JEV		CSFV		
	WNV				

Die Tabelle ist nicht vollständig und gibt nur die wichtigsten Vertreter aus der Familie der Flaviviridae wieder. Abkürzungen: FSME: Frühsommer-Meningo-Enzephalitis, YFV: Gelbfieberevirus, DENV: Dengue-Fieber Virus, JEV: Japanische-Enzephalitis Virus, WNV: West-Nil-Fieber Virus, HCV: Hepatitis C Virus, GBV-B: GB-Virus B, BDV: Border disease virus, BVDV: Bovine viral diarrhea virus, HCHV: Hog Cholera Virus, CSFV: Classical swine fever virus, GBV-A: GB-Virus A, GBV-C: GB-Virus C, HGV: Hepatitis G Virus

## 2.3 Molekularbiologie des Hepatitis C Virus

### 2.3.1 HCV Quasispezies

Phylogenetische Untersuchungen zeigten eine große Heterogenität der HCV Isolate von verschiedenen Patienten mit chronischer HCV Infektion. Aber auch innerhalb desselben Individuums findet man eine heterogene Population nahe verwandter Isolate. Diese sogenannte Quasispezies entsteht durch eine hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, die keine Korrekturlese-Funktion besitzt, in Kombination mit der hohen Replikationsrate des Virus ( $10^{12}$  Virionen/Tag). Zudem wurden Rekombinationsereignisse bei der HCV Infektion berichtet, die ebenfalls zur genetischen Variabilität beitragen (Sentandreu et al., 2008). Somit entstehen ca.  $2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotid pro Jahr. In bestimmten, sogenannten hypervariablen Regionen, findet man sogar eine Mutationsfrequenz von  $0,13 \times 10^{-1}$  Mutationen pro Nukleotid pro Jahr. Die Unterschiede beschränken sich größtenteils auf die Nukleotidsequenz, doch oftmals haben sie auch Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Innerhalb eines Individuums können die Aminosäuresequenzunterschiede

bis zu ca. 10 % betragen. Das Spektrum kann sich sowohl während des normalen Krankheitsverlaufs, als auch unter Therapie verändern, da die Selektion *in vivo* das Ergebnis eines Ausgleichs zwischen genomischen und replikativen Eigenschaften des Virus und der Immunselektion des Wirtes ist. Die hohe Heterogenität und Variabilität des Virusgenoms spielt vermutlich bei der häufigen Entwicklung eines chronischen Verlaufs eine Rolle (Weiner et al., 1992). So findet man bei Patienten, deren akute Hepatitis C Infektion spontan ausheilt, eine niedrige Quasispezies-Komplexität, wohingegen ein chronischer Verlauf mit einer frühen genetischen Evolution hoher Quasispezies Heterogenität korreliert. Zudem weisen Patienten mit geringerer Quasispezies Heterogenität in der hypervariablen Region 1 (HVR1) auch höhere Ansprechraten auf eine Therapie mit Interferon- $\alpha$  auf. Durch klonale Sequenzanalysen der HCV Quasispezies können bei Patienten, die sich einer direkt antiviralen Therapie mit Protease- und Polymerase-Inhibitoren unterziehen, potentielle Resistenzmutationen charakterisiert werden, so wie es in dieser Arbeit vorgenommen wurde. Das Erkennen solcher Resistenzmutationen vor als auch unter und nach einer antiviralen Therapie könnte Teil einer Routinediagnostik zum optimierten Einsatz der direkt antiviralen Therapie bei der HCV Infektion werden.

Ontogenetisch führte die Variabilität des HCV Genoms zur Entwicklung von mindestens sechs verschiedenen HCV Genotypen (GT 1 bis GT 6). Diese weisen im Bereich der strukturellen Proteine über 30 % Sequenzunterschiede auf. Die einzelnen Genotypen lassen sich noch weiter in Subtypen (a, b, c) unterteilen (siehe Tabelle 3), deren Homologie untereinander 75 – 80 % auf Nukleotidebene beträgt (Simmonds, 2004).

Die einzelnen Geno- und Subtypen finden sich regional sehr unterschiedlich verteilt. In Europa findet man hauptsächlich die Genotypen 1b, 1a, 2b und 3a. In den USA ist 1a der vorherrschende Genotyp, gefolgt von 1b, 2a und 3a. Im Gegensatz dazu findet man in Japan den Genotyp 1a nur in 1 – 2 % der Fälle, auch Genotyp 3 ist sehr selten, hier dominieren die HCV Genotypen 1b und 2. Die Genotypen 5 und 6 finden sich vorwiegend in Südafrika bzw. Südostasien/Hongkong,

während die Infektion mit dem Genotyp 4 in Ägypten und im Nahen Osten seine größte Verbreitung hat. Es sind auch Co-Infektionen mit verschiedenen HCV Genotypen möglich. Im Hinblick auf eine optimale Therapie ist es unerlässlich den Genotyp diagnostisch zu bestimmen.

Tabelle 3: HCV Geno-/Subtypen (modifiziert nach Simmonds et al. 2005)

<b>Genotyp</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Accession Nummer(n)</b>	<b>Referenzen</b>
<b>1</b>	<b>a</b>	M62321, M67463	(Choo et al., 1991), (Inchauspe et al., 1991)
	<b>b</b>	D90208, M58335	(Kato et al., 1990), (Takamizawa et al., 1991)
	<b>c</b>	D14853, AY051292	(Okamoto et al., 1994)
<b>2</b>	<b>a</b>	D00944, AB047639	(Okamoto et al., 1991), (Kato et al., 2001)
	<b>b</b>	D10988, AB030907	(Okamoto et al., 1992), (Murakami et al., 2001)
	<b>c</b>	D50409	(Nakao et al., 1996)
	<b>k</b>	AB031663	(Samokhvalov et al., 2000)
<b>3</b>	<b>a</b>	D17763, D28917	(Sakamoto et al., 1994), (Yamada et al., 1994)
	<b>b</b>	D49374	(Chayama et al., 1994)
	<b>k</b>	D63821	(Tokita et al., 1996)
<b>4</b>	<b>a</b>	Y11604	(Chamberlain et al., 1997a)
<b>5</b>	<b>a</b>	Y13184, AF064490	(Chamberlain et al., 1997b), (Bukh et al., 1998)
<b>6</b>	<b>a</b>	Y12083, AY858526	(Adams et al., 1997)
	<b>b</b>	D84262	(Tokita et al., 1998)
	<b>d</b>	D84263	(Tokita et al., 1998)
	<b>g</b>	D63822	(Tokita et al., 1996)
	<b>h</b>	D84265	(Tokita et al., 1998)
	<b>k</b>	D84264	(Tokita et al., 1998)

Die globale Verteilung der HCV Genotypen ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

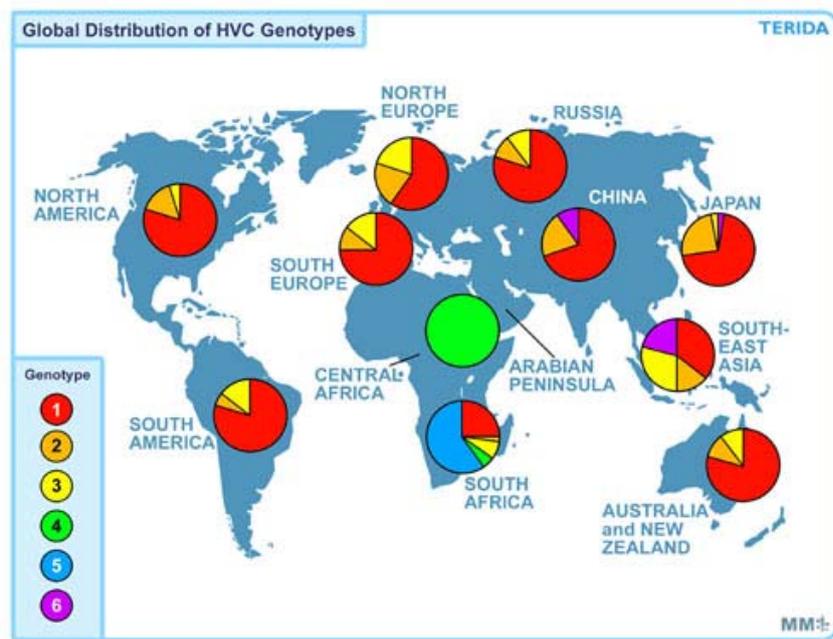


Abbildung 1: Globale Verteilung der HCV Genotypen

[Abbildung entnommen aus <http://ontariohepatitistreatment.com/node/152>]

### 2.3.2 Genomorganisation

Im Innern eines ikosaedrischen Kapsids, welches von einer mit zwei Hüllproteinen besetzten Lipidhülle umgeben ist, befindet sich, mit einer Größe von ca. 9600 Nukleotiden (nt), die einzelsträngige, positiv-orientierte RNA des Hepatitis C Virus. Ein langes offenes Leseraster (open reading frame, ORF) kodiert für ein Polyprotein. Dieses Vorläuferprotein wird von viralen und Wirtspeptidasen co- und posttranslational proteolytisch in die einzelnen Produkte gespalten (Abb. 2).

Das HCV Genom besitzt keine 5' cap Struktur, die Translation wird durch eine 341 Nukleotide lange 5'-nichttranslatierte Region (5'NTR) gesteuert, die als interne Ribosomenbindungsstelle (internal ribosomal entry site, IRES) fungiert und es erlaubt, dass die Ribosomen direkt in der Nähe des Startcodons des ORFs binden (Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). Für ein exaktes Funktionieren der IRES der 5'NTR ist eine hohe Sequenzspezifität erforderlich. Dies wird durch eine Negativselektion dysfunktioneller Isolate während der Replikation erreicht.

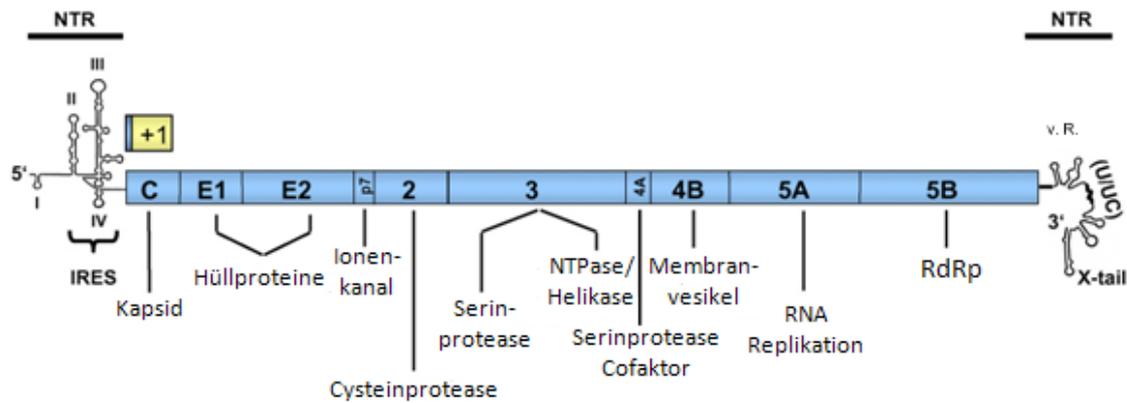


Abbildung 2: HCV Genomorganisation und Prozessierung des Polyproteins

Abgebildet ist eine schematische Darstellung des HCV Genoms mit den 5' und 3' NTRs. Die HCV kodierende Region ist blau dargestellt, die vertikalen Linien zeigen die Positionen, an welchen das resultierende Polyprotein gespalten wird. Die Funktionen der Proteine sind darunter genannt und werden im Text genauer beschrieben. Das Core +1 Protein, welches durch ribosomalen frameshift entsteht, ist oben links abgebildet. Die 5' und 3' NTRs sind mit ihrer Sekundärstruktur gezeigt, (U/UC) ist der poly(U/UC) Trakt, v. R. die variable Region, RdRp: RNA-abhängige RNA-Polymerase, IRES: interne Ribosomenbindungsstelle. [Abbildung entnommen aus Bartenschlager, 2007].

Die ersten ~40 Nukleotide des RNA Genoms werden für die Translation nicht benötigt, sind aber an der Replikation beteiligt. Am 3'-Ende befindet sich die 3'-nichttranslatierte Region (3'NTR). Sie ist zusammengesetzt aus drei Sequenzelementen: einer nicht konservierten hoch variablen Region (30 – 50 nt), einem poly(U/UC) Trakt variabler Länge (20 – 200 nt) und einer hoch konservierten 98 nt großen Region, die als 3'X Region bezeichnet wird und die für die Replikation *in vivo* und die Infektiosität essentiell ist (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000). Letztere formt eine drei stem-loop Struktur (SL1 – SL3). Vermutlich dient diese Struktur einer Interaktion der 5'- und 3'-Enden, um die RNA-Minusstrang Synthese zu initiieren und die Translation zu stimulieren.

### 2.3.3 Strukturelle Proteine

Die strukturellen Proteine befinden sich im amino-terminalen ersten Drittel des HCV Polyproteins. Initial findet sich das sogenannte Core-Protein, der Hauptbestandteil des Nukleokapsids (Yasui et al., 1998).

Neben dieser strukturellen Funktion ist das Core-Protein wahrscheinlich essentiell an Replikation, Reifung und Pathogenese beteiligt (Suzuki et al., 2007). Weitere Funktionen sind die Modulationen zellulärer Prozesse. So wurde die Induktion eines HCC bei transgenen Mäusen gezeigt (Chang et al., 1998; Matsumoto et al., 1997; Chen et al., 1997; Moriya et al., 1998). Durch Interaktion mit dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) werden Zytokine freigesetzt, welche inflammatorische Reaktionen hervorrufen können (Ruggieri et al., 1997). Das HCV Core-Protein aktiviert außerdem TGF Beta 1 (Transforming Growth Factor - Beta 1) und trägt somit zur Fibrosebildung bei (Taniguchi et al., 2004).

Im Jahr 1998 gab es erste Anzeichen für die Existenz eines Proteins, welches aus einem alternativen Leserahmen der Core-kodierenden Region exprimiert wird. Eine erste Beschreibung dieses ARFP (alternative reading frame protein) oder F (frameshift) oder core+1 (um die Position anzuzeigen) genannten Proteins gelang 2001 (Walewski et al., 2001). In weiteren Untersuchungen zeigte sich eine Beteiligung des core+1 Proteins an der cap-unabhängigen Translation (Vassilaki et al., 2008).

Die Hüllproteine E1 und E2 sind wichtige Bestandteile der Virushülle. Sie werden für den Zelleintritt des Virus benötigt. Es handelt sich um hoch glykosylierte Typ 1 Transmembranproteine, die als Heterodimere in der Hüllmembran verankert sind. Im Bereich von E2 befinden sich zwei hypervariable Regionen (HVR1 und HVR2), die sich durch den andauernden Selektionsdruck des Immunsystems ständig verändern. Antikörper, die eine ursprüngliche HVR Region als Epitop erkannt haben, können an der, durch Mutationen veränderten, Oberfläche nicht mehr binden, was zum sogenannten „immune escape“ führt. Außerdem interagiert E2 mit der Doppelstrang-RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR), die von der während der Virusreplikation intermediär vorhandenen Doppelstrang-RNA aktiviert wird. Nach Induktion durch IFN- $\alpha$  reduziert die Proteinkinase R (PKR) die Proteinsynthese durch Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors der Transkription (eIF) 2 $\alpha$ . In Zellen mit einer Expression eines Abschnittes des E2 Proteins von HCV

Genotyp 1 Isolaten, findet sich eine Inhibition der PKR (sogenannte PKR/eIF2 $\alpha$  Homologie-Domäne, PePHD), was einen Mechanismus des HCV zur Umgehung der Interferonwirkung darstellt (Taylor et al., 1999).

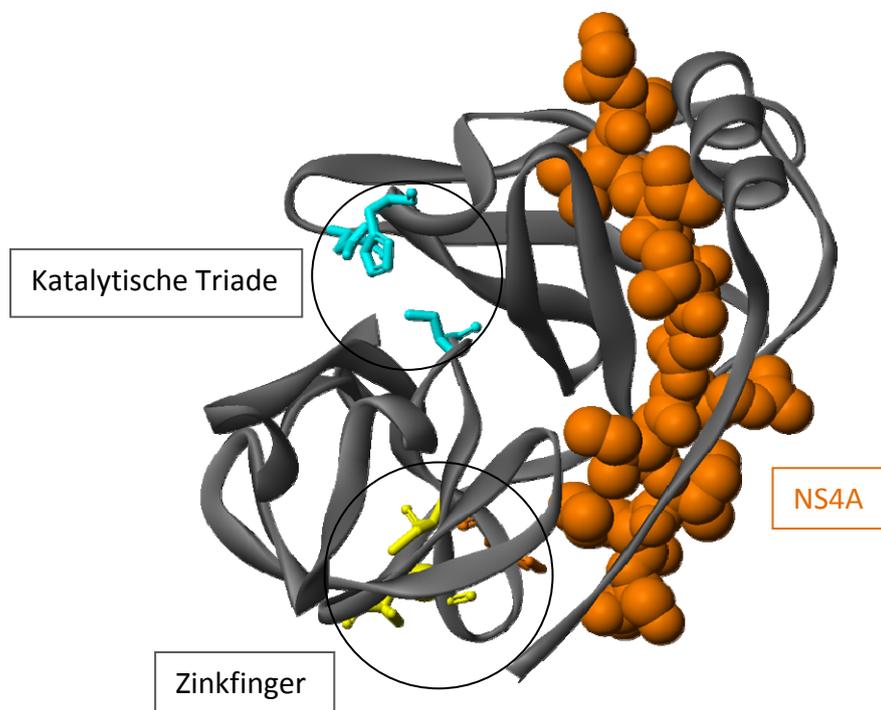
Am carboxy-terminalen Ende von E2 befindet sich ein hydrophobes Polypeptid namens p7. Es fördert die Produktion von Viruspartikeln durch Interaktionen mit anderen viralen Faktoren. Außerdem ist es am Zusammenbau und der Freisetzung infektiöser Virionen beteiligt. Die subgenomischen HCV Replikons besitzen kein p7, was zeigt, dass es für die virale Replikation nicht benötigt wird. Es ist also an Prozessen der späten Phase des HCV Replikationszyklus beteiligt. Als integrales Membranprotein besteht p7 aus zwei transmembranen Helices, die durch einen kurzen zytoplasmatischen Loop miteinander verbunden sind. Es ist in der Lage, Ionen über künstliche Membransysteme zu leiten. Diese Ionenkanalaktivität kann durch verschiedene Substanzen blockiert werden, was ein Ansatz für die Entwicklung einer antiviralen Therapie sein könnte (Griffin et al., 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde p7 vorläufig in die Familie der Viroporine eingeordnet (Steinmann et al., 2007). Die p7 Varianten verschiedener Isolate unterscheiden sich deutlich in ihrer Fähigkeit, die Virusproduktion zu fördern. Dies stellt einen wichtigen Faktor für die Virulenz dar, der Einfluss auf Fitness, Persistenz und möglicherweise auch die Pathogenität des jeweiligen Virusisolats hat.

#### 2.3.4 Nichtstrukturelle Proteine

NS2 und die amino-terminale Domäne von NS3 bilden die NS2/3 Zysteinprotease. Sie katalysiert die Spaltung zwischen NS2 und NS3. Für die Replikation der HCV RNA in Zellkultur wird NS2 nicht benötigt.

NS3 ist ein bifunktionales Molekül, das bei der Prozessierung des Polyproteins und der Replikation eine wichtige Rolle spielt. In Abbildung 3 ist die Struktur von NS3 zusammen mit dem NS4A Kofaktor dargestellt. Die amino-terminalen 181 Aminosäuren (AS) bilden die Serinprotease, die verantwortlich ist für die Spaltung zwischen NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A und NS5A/5B. Die NS3 Protease ist für eine volle Funktionalität obligat

mit dem NS4A Protein als Kofaktor nicht-kovalent verbunden. Die katalytische Triade wird durch His-1083, Asp-1107 und Ser-1165 gebildet. Der NS3/4A-Komplex besitzt eine sehr flache Substratbindungstasche. Somit wird für eine Bindung eine ausgedehnte Interaktion mit dem Substrat benötigt. Das carboxy-terminale Ende (442 AS) bildet die NTPase/Helikase, die für die Translation und Replikation essentiell ist. Zusätzlich ist NS3 an der Interferenz mit Wirtszellfunktionen beteiligt, wie der Inhibierung der Proteinkinase A vermittelten Signaltransduktion oder der Zelltransformation (Borowski et al., 1997).



*Abbildung 3: Sekundärstruktur-Darstellung (Ribbon-Modell) der NS3 Protease zusammen mit dem NS4A Kofaktor*

In Blau ist die katalytische Triade der NS3 Protease Domäne dargestellt, in Gelb das Zinkfingermotiv und in Orange der NS4A Kofaktor. Spiralen symbolisieren  $\alpha$ -Helices [Abbildung entnommen aus Sarrazin et al., 2005].

Eine virale Infektion hat das Auslösen diverser Immunantworten zur Folge. Das Vorkommen von dsRNA in den Zellen führt beispielsweise zur Aktivierung der antiviralen RIG-I (retinoic-acid-inducible gene I) und TLR3 (Toll-like receptor 3) Signalwege, die beide ein Freisetzen von Interferon- $\beta$

bewirken. NS3 ist in der Lage in diese antiviralen Signalkaskaden hemmend einzugreifen, indem es wichtige Faktoren daraus blockiert. TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) und CARDIF (CARD adaptor inducing IFN- $\beta$ ) können durch die HCV NS3 Protease gespalten werden, somit werden die RIG-I (CARDIF) und TLR3 (TRIF) Signalwege unterbrochen und mit ihnen die Induktion von Interferon und Zytokinen. Dadurch wird die Ausbreitung des Virus gefördert und es kann sich eine chronische Infektion entwickeln (Gale, Jr. und Foy, 2005).

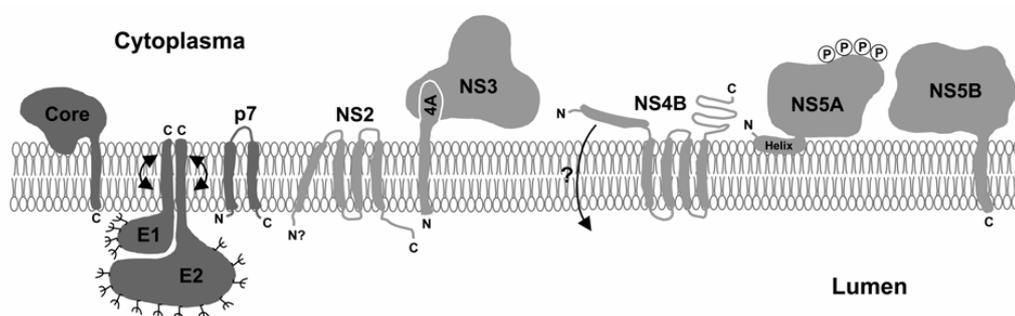
NS4A ist der Kofaktor von NS3 und wird für eine korrekte Prozessierung des Polyproteins benötigt.

NS4B ist ein integrales Membranprotein, das vermutlich vier transmembrane Domänen und eine amino-terminale amphipatische Helix besitzt (Lundin et al., 2003; Gouttenoire et al., 2009). Es induziert die Bildung einer Struktur, die als „membranous web“ bezeichnet wird und an der die Replikation der viralen RNA stattfindet (Egger et al., 2002). Weitere Funktionen des NS4B Proteins werden vermutet (Welker et al., 2009) sind aber noch nicht genau bekannt.

Das unterschiedlich ausgeprägt phosphoryliert vorliegende NS5A Protein ist ein Replikationsfaktor, dessen genaue Rolle bei der Replikation noch nicht vollends geklärt ist. Die Vermutung, dass NS5A an der Replikation der HCV RNA beteiligt ist, gründet sich auf die Tatsache, dass es sich um ein Membran-assoziiertes RNA-bindendes Protein handelt. Des Weiteren befindet sich ein Hot-Spot für Zellkultur-adaptive Mutationen, die die Replikationseffizienz erhöhen, im Bereich des NS5A Proteins (Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001). Kürzlich wurde eine wesentliche Rolle des NS5A Proteins als Schlüsselfaktor für den Zusammenbau infektiöser Viruspartikel beschrieben (Appel et al., 2008). Das NS5A Protein wird in 3 Domänen unterteilt. Die Domäne I wurde kristallographisch charakterisiert und scheint wesentlich für eine effektive Replikation der HCV RNA zu sein (Tellinghuisen et al., 2005). Die Domänen II und III sind ebenfalls für die Replikation des HCV von wesentlicher Bedeutung

(Tellinghuisen et al., 2008). Die carboxy-terminale Domäne III ist an der Formation der Viruspartikel beteiligt. Diese Domäne III ist sehr variabel, was ein Grund für die Unterschiede in der Produktion der Virionen, dem Fitnesslevel und der Pathogenese verschiedener Virusisolate sein könnte. NS5A zeigt einige Interaktionen mit der Wirtszelle, was Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Persistenz haben könnte (Moradpour et al., 2007). Zudem scheint das NS5A Protein auch für eine relative Sensitivität bzw. Resistenz bei einer Therapie mit IFN- $\alpha$  verantwortlich zu sein. Es wurde eine Interferon-Sensitivität determinierende Region im Bereich des NS5A Proteins beschrieben, die möglicherweise Teil einer PKR bindenden Domäne ist und so die Interferonantwort beeinflussen könnte (Wohnsland et al., 2007).

NS5B ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die zur RNA-Synthese benötigt wird. Sie katalysiert sowohl die Synthese der komplementären Negativstrang-RNA, die anschließend als Matrize dient, als auch die der Positivstrang-RNA. Die Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion, was phylogenetisch mit einem Einbau von  $2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotidposition pro Jahr assoziiert ist und die Heterogenität des HCV Genoms erklärt. Abbildung 4 zeigt schematisch die Anordnung der HCV Proteine nach heutigem Stand des Wissens.



*Abbildung 4: Membrantopologie der HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine*

Gezeigt ist die amino- und carboxy-terminale Lokalisation der Proteine relativ zum ER-Lumen [Abbildung entnommen aus Bartenschlager *et al.*, 2004].

## 2.4 Lebenszyklus des Hepatitis C Virus

### Zelleintritt

Der Eintritt des Virus in die Wirtszelle erfolgt, wie auch bei anderen Flaviviren, im Rahmen einer Clathrin-vermittelten pH-abhängigen Endozytose. Das Hepatitis C Virus liegt assoziiert mit Lipoproteinen im Blut vor.

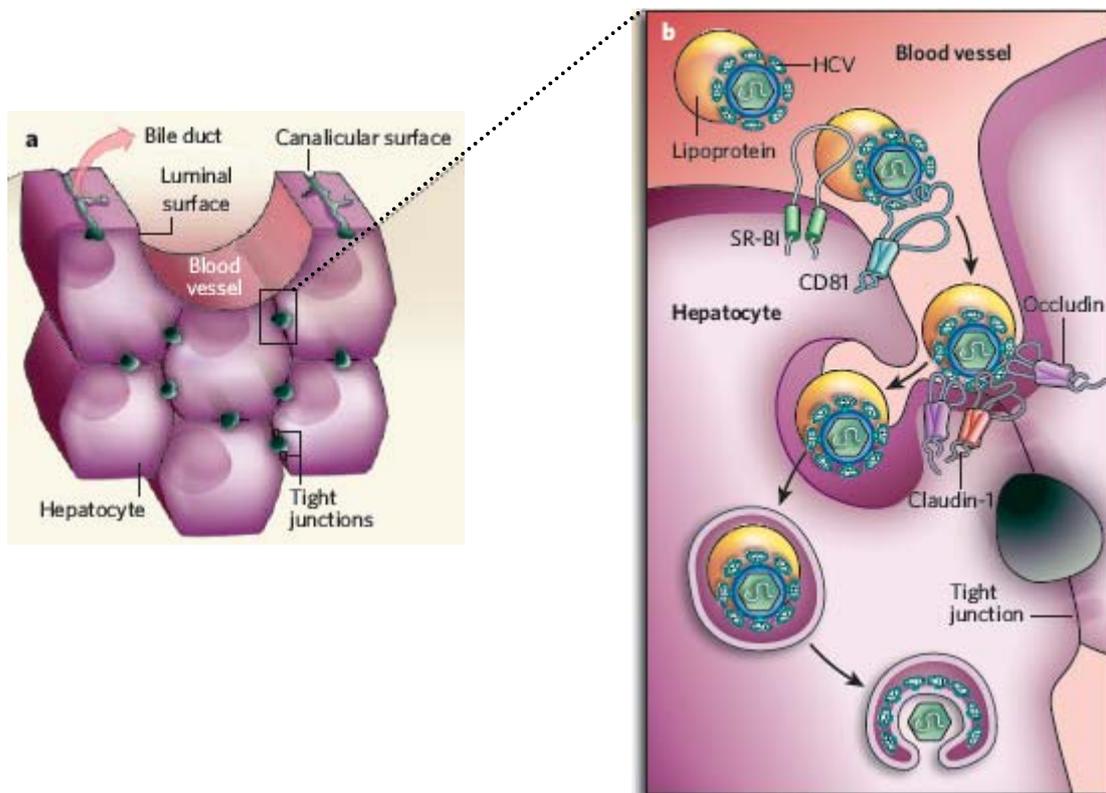


Abbildung 5: Zelleintritt des Hepatitis C Virus

**a:** Tight junctions zwischen Hepatozyten bilden funktionell verschiedene Zelloberflächendomänen: Die luminal Oberfläche, die Auskleidung des Blutstroms und die kanalikuläre Oberfläche, die in Kontakt mit dem Gallengangsystem steht. **b:** HCV wandert durch den Blutstrom in Assoziation mit Lipoproteinen. Die initiale Adhäsion könnte durch zusätzliche Faktoren vermittelt werden (nicht gezeigt) und/oder durch direkte Interaktion mit SR-BI und CD81 Proteinen. Nach dem Übergang zu einem tight junction Komplex interagiert das Virus wahrscheinlich direkt mit Claudin-1 und/oder, wie Ploss *et al.* (2009) zeigten, Occludin, was zur Aufnahme des Virus in die Zelle führt. [Abbildung entnommen aus Pietschmann, 2009].

Die initiale Adhäsion an Hepatozyten wird vermutlich durch LDL-Rezeptoren und/oder Glykosaminoglykane vermittelt. Anschließend binden die Hüllproteine E1/E2 an verschiedene Zellrezeptoren von denen bisher der SR-BI (scavenger receptor class B type I), das Tetraspanin CD81 sowie Claudin 1 näher bekannt sind (Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002; Evans et al., 2007). Der CD81 Rezeptor wird außer auf Hepatozyten und T-Zellen noch in vielen anderen Geweben exprimiert (von Hahn und Rice, 2008). Der Prozess des Zelleintritts ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. CD81 ist ein Post-Bindung-Eintrittsmolekül, welches erst nach Anhaftung des Virus in Erscheinung tritt. Durch Virusinteraktion mit CD81 auf B- und T-Zellen findet eine Modulation der adaptiven Immunantwort statt, was zur Persistenz des Virus beiträgt (Burlone und Budkowska, 2009). Es wurde gezeigt, dass der CD81-Rezeptor für das Eindringen von HCV in die Zellen essentiell ist. Da CD81 aber in vielen Zelltypen vorkommt, die nicht mit HCV infizierbar sind, müssen weitere Rezeptoren an diesem Prozess beteiligt sein. Ebenso wie CD81 ist auch SR-BI (scavenger receptor class B type I) ein Post-Bindungs-Rezeptor. SR-BI dient als „Multi-Ligand“ Rezeptor für viele Lipoproteine (HDL, VDL, VLDL). Unabhängig vom Virusisolat vermittelt SR-BI die Bindung der HVR1 Region auf E2 und verstärkt damit den HCV Eintritt in einer HDL (High Density Lipoprotein) abhängigen Art und Weise (Scarselli et al., 2002; Ploss et al., 2009). Interessanterweise ist die antivirale Aktivität von Interferon verknüpft mit einem Abfall der Expressionslevel von SR-BI auf der Zelloberfläche (Murao et al., 2008). Zwei weitere Rezeptoren komplettieren die essentiellen Faktoren für den Zelleintritt des Hepatitis C Virus: Claudin-1 (CLDN1) und Occludin. Es wurde gezeigt, dass eine Reihe verschiedener Zelltypen, sofern sie CD81, SR-BI, CLDN1 und Occludin besitzen, mit HCV infizierbar sind (Pietschmann, 2009a). Zu beachten ist dabei, dass CD81 und Occludin aufgrund der Speziesinkompatibilität menschlichen Ursprungs sein müssen. Keines dieser vier Proteine kommt ausschließlich in Leberzellen vor, aber nur wenige Zelltypen besitzen alle vier Rezeptoren zusammen. Das integrale Membranprotein CLDN1 (Evans et al., 2007) und Occludin

(Liu et al., 2009) sind Komponenten der tight junctions der Hepatozyten. Tight junctions sind die Hauptkomponenten von Zelladhäsionskomplexen, welche die apikale von der basolateralen Membrandomäne trennt und durch Bildung einer Intramembran die Zellpolarität aufrecht erhält. Nach der Bindung des Viruspartikels an CD81 und SR-BI erfolgt der Übergang zu einem tight junction Komplex, wo das Virus mit CLDN1 und/oder Occludin (Ploss et al., 2009) interagiert, was zur Aufnahme des Virus in die Zelle führt. Zwei weitere Mitglieder der Claudin-Familie, CLDN6 und CLDN9, fungieren als zusätzliche Co-Rezeptoren für HCV (Zheng et al., 2007). Diese beiden werden sowohl in der Leber als auch in peripheren Blutzellen exprimiert, im Gegensatz zu CLDN1, das nur in der Leber exprimiert wird. Trotz der hohen genetischen Variabilität von HCV ist die Funktion der Proteine sehr stabil.

### Replikation

Während der Replikation des Hepatitis C Virus wird initial die genomische (+)-Strang-RNA in eine (-)-Strang-RNA transkribiert. Diese dient dann zur Retranskription mehrerer (+)-Strang-RNAs. Die Replikation findet in einem Membran-assoziierten Komplex, dem sogenannten „membranous web“ statt, welches durch NS4B induziert wird (Moradpour et al., 2007). Alle HCV Proteine sind direkt oder indirekt mit dieser Netzstruktur verbunden. Der Lebenszyklus des Hepatitis C Virus ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Hauptsächlich findet die Replikation in den Hepatozyten statt, aber das Virus kann sich vermutlich auch extrahepatisch z. B. in B- und T-Lymphozyten vermehren.

Über die späten Schritte (Zusammenbau, Verpacken und Freisetzung) des viralen Lebenszyklus weiß man noch wenig, da es erst seit kurzem möglich ist, diese Prozesse systematisch in Zellkultur zu untersuchen (Wakita et al., 2005). Vermutlich formen sich die Virionen durch Knospung ins Endoplasmatische Retikulum und verlassen die Zelle über einen sekretorischen Stoffwechselweg.

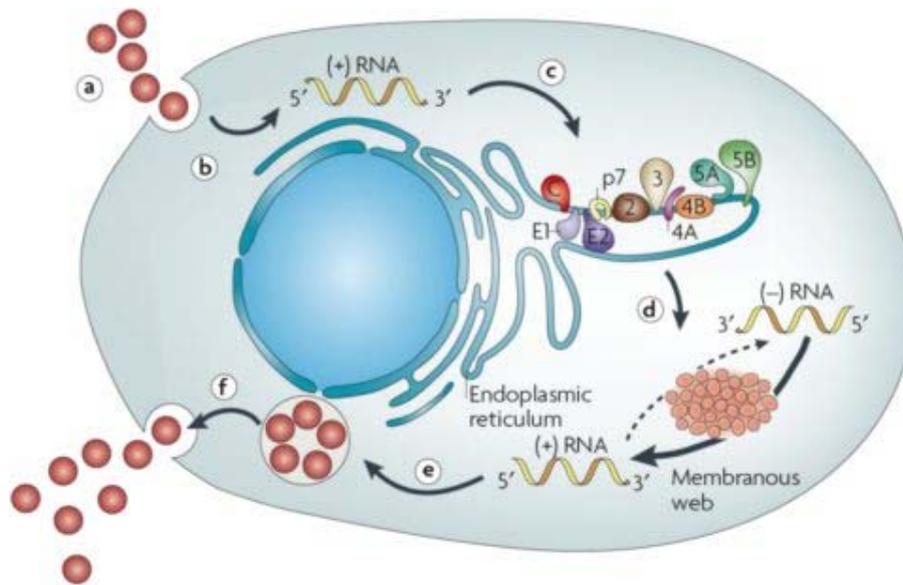


Abbildung 6: HCV Lebenszyklus

(a) Bindung und Zelleintritt, (b) zytoplasmatische Freisetzung und Enthüllung, (c) IRES-vermittelte Translation und Polyprotein Prozessierung, (d) RNA Replikation, (e) Verpacken und Zusammenbau, (f) Virionen-Reifung und Freisetzung. Die Topologie der HCV strukturellen und nicht-strukturellen Proteine an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Endoplasmic reticulum) ist schematisch dargestellt. Die Replikation der HCV RNA findet in einer speziellen Membran-Formation statt, dem „Membranous web“. Die IRES-vermittelte Translation und Polyprotein-Prozessierung, die Membranous web Ausbildung und die Replikation der RNA sind hier der Einfachheit halber als separate Schritte gezeigt, sie können aber in einer eng gekoppelten Art und Weise auftreten. [Abbildung entnommen aus Moradpour et al. (2007)].

## 2.5 Immunbiologie

Allein die Infektion mit HCV wirkt nicht direkt zytotoxisch auf Hepatozyten. Es kommt aber in der Folge zu einer Reihe von immunvermittelten Abwehrmechanismen, die das Absterben der infizierten Zellen nach sich ziehen können. Diese Immunantworten können ungerichtet oder spezifisch gegen Hepatitis C Viren gerichtet sein. Im Folgenden wird der Ablauf dieser Mechanismen näher beschrieben.

Wie auch bei anderen Virusinfektionen wird durch eine HCV-Infektion eine unspezifische Immunantwort ausgelöst. Infizierte Hepatozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche Viruspeptide und HLA Moleküle der Klasse I (HLA, Human Leukocyte Antigen). HLA-Klasse I restringierte zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CTL) erkennen diese Zellen mit ihrem T-Zell-

Rezeptor (Billerbeck und Thimme, 2008). Die Aktivierung der CTL führt zum Einen zur Aktivierung von Fas-Liganden, zum Anderen zur Freisetzung von Zytokinen und Perforinen und damit letztendlich zur Induktion von Apoptose und zur Zerstörung der Zellmembran in der infizierten Zelle. Außer den infizierten Hepatozyten produzieren dabei auch plasmazytoide dendritische Zellen Typ I Interferone (IFN $\alpha/\beta$ ). Diese Typ I Interferone induzieren eine große Zahl von Genen (PKR, MxA, 2'-5'-OAS-System). Die Expression der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase führt zu einer Aktivierung der RNase L Funktion und damit letztlich zur Inhibition der Replikation des HCV. Zusätzlich verstärken Typ I Interferone die Expression der humanen Leukozyten Antigen Proteine der Klasse I (HLA-I) auf der Oberfläche der dendritischen Zellen. Dies erhöht die zelluläre Immunantwort durch die gesteigerte Aktivierung natürlicher Killerzellen und zytotoxischer T-Zellen. Die Schädigung der HCV infizierten Hepatozyten durch diese Apoptose auslösenden Mechanismen führt zu einer Leberentzündung, also zu einer Hepatitis. Die Zerstörung der Hepatozyten stimuliert myeloide dendritische Zellen, was zur Sekretion großer Mengen an IFN $\gamma$  führt. IFN $\gamma$  wiederum aktiviert hepatische Makrophagen, welche die Entzündungsreaktion in der Leber zusätzlich verstärken (Hiroishi et al., 2008).

Die Aktivierung von virusspezifischen HLA-Klasse II restringierten CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Th1 und Th2) findet ohne direkte Interaktion mit HCV infizierten Zellen statt. Sie erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor antigenpräsentierende Zellen (APZ). Diese haben am Ort des Entzündungsgeschehens oder in den Lymphknoten extrazelluläre virale Antigene aufgenommen und exprimieren diese in einem Komplex mit HLA-Molekülen der Klasse II auf ihrer Oberfläche (Bowen und Walker, 2005). Antigenpräsentierende Zellen sind Makrophagen (in der Leber auch Kupffer-Sternzellen genannt), dendritische Zellen und B-Zellen. Die Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen bewirkt die Freisetzung von Zytokinen, was mehrere Reaktionen induziert. Es steigert die T-Zell-Proliferation und führt zur vermehrten Ausbildung von HLA-Molekülen auf der Hepatozytenoberfläche. Th1-Zellen produzieren

dabei Interleukin-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und die Tumornekrosefaktoren- $\alpha$  und - $\beta$  (TNF- $\alpha$ /- $\beta$ ). Sie stimulieren somit die zellvermittelte Immunreaktion. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ /- $\beta$  hemmen die virale Genexpression und Replikation, ohne infizierte Zellen strukturell zu zerstören. IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen, welche TNF- $\alpha$  sezernieren, was den Prozess der Virusinaktivierung verstärkt. Th2-Zellen sezernieren vorwiegend die Interleukine 4, 5 und 10 und kontrollieren die humorale Immunantwort (Post et al., 2009).

B-Zellen bilden spezifische Antikörper, die bestimmte Fremdkörper (Antigene) binden, damit diese dann phagozytiert oder über das Komplementsystem (humorale Abwehr) abgebaut werden können. Für Antikörper die gegen die HVR1 des HCV gerichtet sind, konnten neutralisierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Zein et al., 1999).

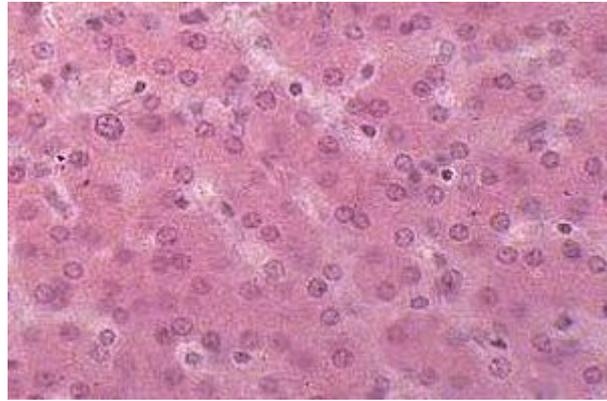
Es herrscht weitgehend Einigkeit darüber, dass eine unzureichende T-Zell-Antwort bei der Chronifizierung der HCV Infektion eine entscheidende Rolle spielt.

## 2.6 Medizinische Bedeutung des Hepatitis C Virus

### 2.6.1 Infektion und natürlicher Verlauf

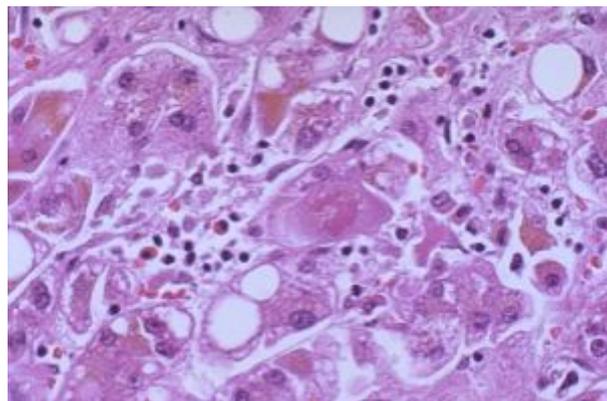
Nach heutigem Wissensstand ist die Übertragung des Hepatitis C Virus ausschließlich parenteral möglich (Zeuzem et al., 1996). Die Prävalenz der HCV Infektion in Deutschland liegt bei 0,5 – 0,6 % der Normalbevölkerung (Thierfelder et al., 2001; Niederau und Kapagiannidis, 2006). Weltweit wird die Prävalenz laut WHO auf 3 % geschätzt (WHO, 2009). Die Neuinfektionsrate in Deutschland liegt bei über 5000 Menschen jährlich (Gurtler, 2002). Eine durch HCV ausgelöste akute, klinisch apparent verlaufende Hepatitis ist selten. In mehr als 80 % der Fälle verläuft die akute Infektion unbemerkt mit unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen. Die spontane Ausheilung dieser akuten Infektion ist relativ selten und so kommt es in 60 – 80 % der Fälle zur Chronifizierung (Alter et al., 1992). Die chronische Entzündung führt dazu, dass im Verlauf von Jahrzehnten eine Zirrhose entsteht, wodurch dann das Risiko für die

Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms erhöht ist (Saito et al., 1990; Theodore und Fried, 2000). Ein Vergleich von gesundem und bereits stark geschädigtem Lebergewebe ist in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.



*Abbildung 7: Mikroskopisches Bild von normalem Lebergewebe.*

[Abbildung entnommen: [http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef\\_hepatitis\\_c.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef_hepatitis_c.htm)]



*Abbildung 8: Durch Hepatitis C stark verändertes Lebergewebe im mikroskopischen Bild.*

Zu erkennen sind: abgestorbene Zellen, verfettete Zellen, eingeströmte Entzündungszellen. [Abbildung entnommen aus: [http://www.med4you.at/laborbefunde/hep\\_c\\_histo.jpg](http://www.med4you.at/laborbefunde/hep_c_histo.jpg)]

## 2.6.2 Diagnostik

Nach der Infektion mit dem Hepatitis C Virus kommt es rasch zu einer effektiven Vermehrung des Virus und die HCV RNA im Blut lässt sich bereits nach 1 - 2 Wochen nachweisen, während HCV Antikörper

typischerweise frühestens nach 4 - 6 Wochen detektiert werden können. Aufgrund der hohen Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase sind aber nur 1 – 10 % der produzierten Partikel infektiös (Bradley, 2000; Major und Feinstone, 2000). Nach 4 – 12 Wochen entwickelt sich eine milde, meist anikterische Hepatitis, die zu einer mäßigen Erhöhung der Aminotransferasen (ALT und AST) im Serum führt. Ein fulminantes Leberversagen ist sehr selten. Bei Verdacht auf eine akute HCV Infektion erfolgt der Nachweis der HCV RNA mittels RT-PCR (Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) und kommerziellen Verfahren wie Cobas Amplicor™, Cobas Amplicor™ Monitor, Cobas Ampliprep™/Cobas TaqMan™, Roche Molecular Systems oder Abbott realtime HCV, Abbott Diagnostics, der TMA (Transcription Mediated Amplification, Versant™ HCV Qualitativ Siemens) oder dem bDNA Signalamplifikationsverfahren (branched DNA, Versant™ HCV Quantitativ, Siemens). Nach einer akuten Infektion kommt es in den meisten Fällen zu einer Chronifizierung und aufgrund der fehlenden klinischen Symptome wird in den meisten Fällen die Diagnose erst in diesem Stadium gestellt. Hierbei erfolgt bei einer entsprechenden Verdachtsdiagnose zunächst ein Screeningtest auf HCV Antikörper und im positiven Fall dann die Untersuchung auf HCV RNA mit den oben erwähnten Verfahren, um die chronische Replikation des Virus nachzuweisen bzw. eine ausgeheilte Infektion zu dokumentieren. Wichtig für die Wahl und den Erfolg der Therapie ist neben der Viruslast auch die Bestimmung des HCV Genotyps. Der Goldstandard der Genotypisierung beruht auf einer Sequenzierung verschiedener Abschnitte des Virusgenoms und dem Vergleich mit HCV Sequenzen aus Gendatenbanken. Für die klinische Routine stehen im Wesentlichen zwei kommerzielle Systeme zur Verfügung: Versant™ HCV Genotyp 2.0 System (LiPA) und TRUGENE® HCV 5'NC Genotyping Kit (Siemens).

### 2.6.3 Therapie

Ziel einer Therapie ist es, eine dauerhafte Elimination des Virus zu erreichen. Ein dauerhaftes virologisches Ansprechen ist dadurch definiert,

dass 24 Wochen nach der Beendigung der Therapie keine HCV RNA im Serum des Patienten mehr nachweisbar ist. Ausgehend von einer Monotherapie mit Standard-Interferon- $\alpha$  konnte durch den Einsatz länger wirkender pegylierter Interferone (PEG-IFN $\alpha$ -2a und PEG-IFN $\alpha$ -2b) in Kombination mit Ribavirin (RBV) die Standardtherapie seit den ersten Behandlungsversuchen der seinerzeit noch Non-A Non-B Hepatitis genannten Infektion kontinuierlich verbessert werden. Interferon hat antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung. Es verstärkt die zelluläre Immunantwort und hemmt die virale RNA Transkription und Translation (Takeda et al., 2004; Shin et al., 2006). Durch die Verbindung mit einem Polyethylenglykolmolekül (PEG) verlängert sich die Halbwertszeit, wodurch längere und konstantere Wirkspiegel erreicht werden. Ribavirin (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) ist ein Guanosinanalogen, das *in vitro* antivirale Aktivität gegen einige RNA- und DNA-Viren besitzt. Unter einer Ribavirinmonotherapie kommt es nicht zu einem signifikanten Abfall der HCV RNA Konzentration (Di Bisceglie et al., 1995). In der Kombinationstherapie mit Interferon- $\alpha$  wurde aber überraschenderweise eine erhebliche Steigerung der virologischen Ansprechraten beobachtet. Es werden aktuell vier verschiedene Wirkmechanismen für Ribavirin diskutiert (Hofmann et al., 2007), wobei die genaue Wirkungsweise jedoch noch nicht bekannt ist. Die Behandlungsdauer richtete sich bisher in erster Linie nach dem Genotyp des Virus. So genügt bei einer HCV GT2 oder GT3 Infektion eine Dauer von 24 Wochen, um dauerhafte Ansprechraten von ~ 80 % zu erreichen. Eine GT1 Infektion spricht schlechter auf die Therapie an. So zeigen nach einer Behandlung von 48 Wochen lediglich 40 – 50 % der Patienten ein dauerhaftes virologisches Ansprechen (sustained virologic response, SVR) (Zeuzem et al., 2009). Die Patienten haben während der Standardtherapie unter vielfältigen Nebenwirkungen zu leiden, wie beispielsweise Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Depressionen, Myalgien, Pruritus, Dermatitisen, Leukopenie, Thrombopenie, Anämie, neurologische und kardiale Störungen.

Ein weiterer Fortschritt in der Behandlung einer chronischen HCV Infektion könnte daher durch eine Verkürzung der Therapiedauer und somit der Nebenwirkungen, ohne gleichzeitige Einbußen der Effektivität erreicht werden. Hier hat sich in den letzten Jahren auf der Grundlage zahlreicher klinischer Studien eine Optimierung der individuellen Behandlungsdauer durch die Einteilung der Patienten nach der Geschwindigkeit des virologischen Ansprechens entwickelt, die in der aktuellen Leitlinie zur Behandlung der HCV Infektion empfohlen wird (Sarrazin et al., 2009b). So ist z. B. bei ca. 15 % aller GT1 infizierten Patienten, die eine niedrige Anfangsviruslast zeigen ( $\leq 600.000 - 800.000$  IU/ml), in Woche 4 der Therapie ein rasches virologisches Ansprechen mit nicht mehr nachweisbarer HCV RNA zu beobachten, wodurch die Dauer der Behandlung auf 24 Wochen reduziert werden kann, ohne die Chance auf dauerhaftes Ansprechen zu verschlechtern (89 % SVR). Damit wird nicht nur die Belastung des Patienten verringert, sondern es werden auch die Kosten für die Behandlung erheblich gesenkt. Allerdings zeigte sich, dass die ca. 20 % der Patienten, die in Therapiewoche 12 noch kein virologisches Ansprechen zeigen, von einer auf 72 Wochen verlängerten Therapie profitieren. Somit wird insgesamt auf der Grundlage des Abfalls der HCV RNA Konzentration in den ersten Wochen der Therapie eine individualisierte Therapiedauer angestrebt, die für jeden einzelnen Patienten eine optimierte Heilungschance ermöglicht. Weitere Parameter zur Optimierung des virologischen Therapieansprechens sind die Anpassung der Dosis des PEG-Interferons und des Ribavirins sowie das effektive Management von Nebenwirkungen unter der Therapie. Zudem wurden Regeln entwickelt mit denen die Therapie bei Patienten, die kein ausreichendes virologisches Ansprechen ausweisen, frühzeitig wieder beendet werden kann ( $< 2$  log Abfall der HCV RNA zu Woche 12 im Vergleich zur Ausgangsviruslast bzw. nachweisbare HCV RNA zu Woche 24 der Therapie) (Zeuzem et al., 2009).

#### 2.6.4 Neue Therapieansätze

Trotz der bisherigen Weiterentwicklungen der Standardtherapie ist die Erfolgsquote, insbesondere bei einer HCV GT1 Infektion, nicht zufriedenstellend. Aufgrund dessen und im Hinblick auf eine geringere Belastung der Patienten durch Nebenwirkungen kommt, neben der Optimierung der Standardtherapie, der Entwicklung spezifisch gerichteter antiviraler Therapien (specifically targeted antiviral therapies against hepatitis C – STAT-C) eine große Bedeutung zu. In den letzten Jahren wurden verschiedene antiviral wirkende Substanzen entwickelt, einschließlich direkter Inhibitoren von HCV Enzymen, wie der NS3 Protease, NS3 Helikase, NS5A Protein und NS5B Polymerase. Am weitestenden fortgeschritten in der klinischen Entwicklung sind Inhibitoren der HCV NS3/4A-Serinprotease und der HCV-spezifischen RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Verschiedene dieser Medikamente befinden sich aktuell in klinischen Phase 1, Phase 2 oder Phase 3 Studien.

Gegenwärtig befinden sich dabei eine Reihe von Proteaseinhibitoren in der klinischen Entwicklung (Boceprevir, Telaprevir, Ciluprevir, MK7009, ITMN-191, BI201335, TMC-435350) von denen zwei in der Phase 3 sind, bei denen wiederum mit einer Zulassung und damit Etablierung einer neuen Standardtherapie der Hepatitis C im Jahr 2010/11 zu rechnen ist (Boceprevir und Telaprevir). Durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der NS3 Protease (Kim et al., 1996) und der Entwicklung des HCV Replikons (Lohmann et al., 1999) konnten Moleküle hergestellt werden, die durch Bindung an das aktive Zentrum eine Prozession des eigentlichen Substrats, des HCV Polyproteins, verhindern. Diese sogenannten peptidomimetischen Inhibitoren führten sowohl bei zuvor unbehandelten als auch bei Patienten, die auf die Standardtherapie nicht ansprachen (Non-Responder, NR bzw. Relapser), zu einem HCV RNA-Abfall von mehreren  $\log_{10}$ -Stufen. Ein möglicher Nachteil dieser direkten Inhibition der NS3 Protease ist allerdings, dass es im Verlauf der Therapie zur Selektion resistenter Varianten aus der Virus-Quasispezies kommen kann. Durch die oben bereits beschriebene, sehr fehleranfällige

RNA-abhängige RNA-Polymerase entstehen ständig neue Varianten, von denen wiederum einzelne aufgrund von Mutationen, die die Bindungsstelle des Inhibitors verändern, unter Therapie einen Selektionsvorteil gegenüber den Wildtyp-Varianten, deren Replikation durch den Inhibitor effektiv blockiert wird, besitzen können. Diese vermehren sich dann trotz Therapie mit dem Proteaseinhibitor und führen zu einem Wiederanstieg der Viruslast und somit zum Scheitern der Therapie. Diese resistenten Varianten besitzen nur während des Vorhandenseins des Inhibitors einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp. Setzt man das Medikament ab, beobachtet man den Rückgang dieser Varianten und die Vermehrung der in der replikativen Fitness typischerweise überlegenen Wildtyp-Varianten. Die mögliche Persistenz der resistenten Varianten hat für zukünftige Therapieoptionen eine erhebliche Bedeutung und stellt für die HCV Infektion ein wesentliches Problem dar. Interessanterweise konnte in ersten Studien auch ohne Selektionsdruck des Inhibitors, noch Jahre nach dem Ende einer direkt antiviralen Therapie mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir ein mehr oder weniger großer Anteil dieser resistenten Varianten in der Viruspopulation nachgewiesen werden (Susser et al., 2009; Forestier et al., 2008). Jede erneute Behandlung mit demselben oder auch kreuzresistenten Medikamenten würde damit vermutlich sofort wieder zu einer raschen Selektion dieser resistenten Varianten führen und damit eine höchstens eingeschränkte Wirkung haben.

Für einige dieser Inhibitoren gibt es *in vitro* Untersuchungen, um festzustellen an welchen Positionen der Protease Resistenzmutationen auftreten (Tong et al., 2006; Lin et al., 2004). Dies ist aber letztendlich nur ein erster Hinweis darauf, was *in vivo* bei Patienten unter der Behandlung mit dem entsprechenden Inhibitor auftreten kann und es hat sich gezeigt, dass viele der selektionierten Mutationen unter der Therapie nicht durch *in vitro* Untersuchungen vorhergesagt werden konnten. Um genau zu wissen, welche Mutationen unter einer direkt antiviralen Behandlung selektioniert werden, muss eine genaue Sequenzanalyse der Varianten,

die vor, während und nach der Therapie mit einem NS3 Protease Inhibitor vorhanden sind, erfolgen (Sarrazin et al., 2007b).

Aufgrund der raschen Resistenzentwicklung in der Monotherapie wurde in den folgenden Studien eine Kombination der Proteaseinhibitoren mit PEG-IFN $\alpha$  und Ribavirin untersucht. Dabei konnte eine klinische Resistenzentwicklung mit Durchbruch der Viruslast effektiv reduziert werden (Forestier et al., 2007; Lawitz et al., 2008a). Allerdings war bei einer frühen Sequenzuntersuchung in den ersten Tagen der Behandlung durchaus eine Selektion resistenter Varianten nachweisbar. Da diese resistenten Varianten jedoch gegenüber einer Behandlung mit Interferon- $\alpha$  sensitiv sind, kam es im weiteren Verlauf zu einem kontinuierlichen Virusabfall (Kieffer et al., 2007).

Für beide NS3 Proteaseinhibitoren (Telaprevir und Boceprevir) konnte in den abgeschlossenen Phase 2b Studien eine signifikante Steigerung der dauerhaften virologischen Ansprechraten gezeigt werden. Bei einer Behandlung mit 1250 mg Telaprevir am ersten Tag, gefolgt von 750 mg alle acht Stunden, 180  $\mu$ g PEG-IFN $\alpha$ -2a pro Woche und Ribavirin (Dosis 1000 oder 1200 mg pro Tag entsprechend eines Körpergewichts) für 12 Wochen und anschließender Standardbehandlung (PEG-IFN $\alpha$ -2a und Ribavirin) für weitere 12 Wochen betrug die dauerhafte Ansprechrate von zuvor unbehandelten Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion in zwei Studien 61 bzw. 69 % (PROVE 1 und 2) (Hezode et al., 2009; McHutchison et al., 2009). Im Vergleich dazu lagen die dauerhaften Ansprechraten im Kontrollarm der beiden Studien bei 41 und 46 %. Mit derselben Therapie wurden bei HCV Genotyp 1 Patienten, die zuvor bereits auf eine Standardtherapie mit PEG-Interferon und Ribavirin nicht angesprochen hatten (Non-Responder) oder einen Rückfall nach Therapieende erlitten hatten (Relapser) 39 % bzw. 69 % mit einem dauerhaften Ansprechen geheilt. Hier lag die Kontrollgruppe ohne die Gabe des Proteaseinhibitors Telaprevir bei 9 bzw. 20 %. Bei einer Verdoppelung der Therapiedauer auf 24 Wochen Triple-Therapie mit Telaprevir und anschließend 24 Wochen Standardtherapie waren die dauerhaften Ansprechraten ähnlich (Non-Responder 38 % SVR, Relapser 76 % SVR ), aber die Relapse- und

Breakthrough-Raten verringerten sich von 28 % auf 4 % bzw. von 10 % auf 7 % (Manns et al., 2009). Boceprevir wurde in der Phase 1 zunächst bei Non-Respondern eingesetzt und hier zeigte sich zum ersten Mal, dass ein Durchbruch des Non-Response durch die Gabe eines Proteaseinhibitors in Kombination mit Ribavirin möglich ist (Sarrazin et al., 2007a). In der Phase 2 Studie wurde dann ein etwas abgewandelter Ansatz mit einer vierwöchigen vorgeschalteten Behandlung mit PEG-IFN $\alpha$ -2b (1,5  $\mu$ g/kg Körpergewicht) und Ribavirin (800 – 1400 mg pro Tag nach Körpergewicht) als sogenannte „Lead-In“ Phase, gefolgt von 24 oder 44 Wochen Kombinationstherapie mit 800 mg Boceprevir dreimal täglich, PEG-IFN $\alpha$ -2b und Ribavirin in den oben genannten Dosen bei therapienaiven Patienten mit einer HCV Genotyp1 Infektion verfolgt. Dies führte in dem Arm mit einer insgesamt 48-wöchigen Therapiedauer zu einer dauerhaften Ansprechraten von 75 %, was die bisher höchste erreichte SVR Rate bei Genotyp 1 Patienten darstellt (Kwo et al., 2009). Wie in den Studien mit Telaprevir zeigte sich, dass insbesondere bei Patienten mit einem raschen Ansprechen zu Woche 4 (RVR) eine Therapieverkürzung auf 24 bzw. 28 Wochen mit gleichzeitig hohen virologischen Ansprechraten von > 70 % möglich ist. Dabei kommt es durch die Gabe des Proteaseinhibitors wesentlich häufiger zu einem raschen virologischen Therapieansprechen (RVR) als bei der alleinigen Standardtherapie mit PEG-IFN und Ribavirin (40 – 70 % vs. ca. 15 %) (Hezode et al., 2009; McHutchison et al., 2009; Kwo et al., 2009).

Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Substanzen (Boceprevir und Telaprevir) werden im Folgenden näher beschrieben.

### **SCH503034 (Boceprevir) und VX-950 (Telaprevir)**

SCH503034 und VX-950 sind oral verfügbare, selektive peptidomimetische Inhibitoren der HCV NS3 Protease. Sie gehören beide zur Klasse der  $\alpha$ -Ketoamide und binden kovalent am aktiven Zentrum der NS3 Protease. Dadurch wird kompetitiv die Prozessierung des Polyproteins durch die NS3 Protease verhindert und es kommt in der Folge zum

Erliegen der Replikation. Die Strukturformeln der beiden Substanzen sind in Abbildung 9 dargestellt.

NS3 kodiert für eine typische Serinprotease mit einem relativ flachen hydrophoben aktiven Zentrum. Das Substrat bzw. die Inhibitoren binden erst leicht, nicht-kovalent, bevor es zu einer festen kovalenten Bindung und anschließender Konformationsänderung kommt. Gleichzeitig wird die Immunantwort auf Interferon wiederhergestellt.

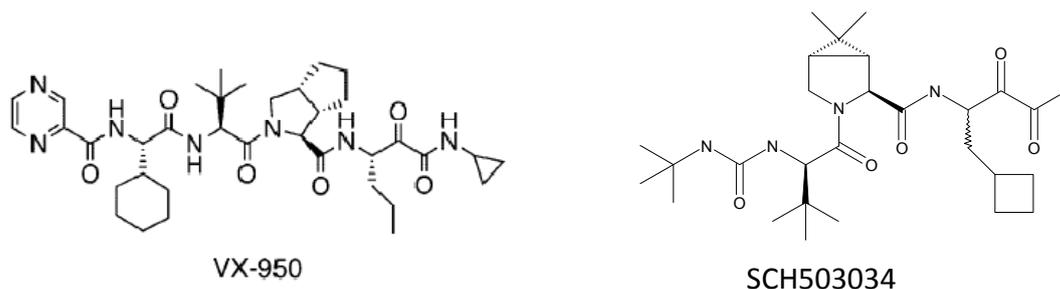


Abbildung 9: Strukturformeln von VX-950 (Telaprevir) und SCH503034 (Boceprevir)

Für beide Substanzen wurde in klinischen Studien gezeigt, dass es in der Monotherapie zu einem raschen initialen HCV RNA-Abfall bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion kommt (Reesink et al., 2006; Sarrazin et al., 2007a). Unter optimaler Dosierung von Telaprevir mit 3 x 750 mg pro Tag für 2 Wochen sank die HCV RNA-Konzentration im Mittel um 4,4 log<sub>10</sub>-Stufen. Unter der Gabe von 3 x 400 mg Boceprevir für 14 Tage ebenfalls bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion konnte ein mittlerer HCV RNA-Abfall von 2,1 log<sub>10</sub>-Stufen erreicht werden (Zeuzem et al., 2005).

## 2.7 Modellsysteme zur *in vitro* Analyse von HCV

### 2.7.1 Tiermodelle

HCV besitzt eine hohe Speziesselektivität, weshalb lange Zeit keine Kleintiermodelle für Versuche zur Verfügung standen. Außerhalb des Menschen sind lediglich Schimpansen mit dem HCV infizierbar. Entsprechende Tierversuche sind sehr aufwendig und es zeigt sich ein

deutlich milderer und häufig kürzerer Verlauf der Infektion mit spontaner Ausheilung, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse von Untersuchungen an Schimpansen eingeschränkt wird (Bartenschlager und Lohmann, 2000). Seit kurzem sind auch immundefiziente Mäuse mit implantierten menschlichen Leberzellen verfügbar (Kimura et al., 2008). Doch auch hier sind die Versuche sehr aufwendig und kostenintensiv. Die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ist sehr fragwürdig und zudem sind diese, wie alle Tierversuche, ethisch sehr bedenklich.

### 2.7.2 Zellkulturmodelle

Es dauerte bis 1999, mehr als zehn Jahre nach Entdeckung des Hepatitis C Virus, bis das erste stabil replizierende Zellkultursystem für den Abschnitt der nicht-strukturellen HCV Gene auf der Grundlage eines HCV Genotyp 1b Isolates von Volker Lohmann und Ralf Bartenschlager entwickelt wurde (Lohmann et al., 1999). Das System beruht auf der Transfektion der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh-7 mit selektionierbarer subgenomischer HCV RNA. Die Strukturproteine werden für die Replikation nicht benötigt und wurden ebenso wie die NS2 Protease, die lediglich die eigene Spaltung katalysiert, deletiert und dafür die Neomycin-Phosphotransferase (*neo*) als Resistenzgen eingefügt. Am 5'-Ende des *neo*-Gens befinden sich die ersten 12 Codons des HCV Core-Proteins, damit die vorgeschaltete HCV-IRES ihre volle Aktivität entfalten kann. Die nicht-strukturellen Proteine NS3 bis NS5B stehen unter Kontrolle der IRES des Encephalomyokarditisvirus (EMCV).



Abbildung 10: Schematische Darstellung des Replikon-Konstrukts

Die 5' und 3' NTRs sind als schwarze Linien dargestellt. Das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (npt) folgt auf die HCV-IRES und vor den Genen für die nicht-strukturellen Proteine NS3 – NS5B befindet sich die EMCV-IRES.

Da sowohl die 5'NTR als auch die 3'NTR essentiell für die Replikation sind, wurden beide unverändert übernommen. Um eine ausreichend effiziente Replikation zu gewährleisten, wurden drei adaptive Mutationen in das Replikon eingefügt (Krieger et al., 2001). Eine schematische Darstellung des Replikon-Konstrukts ist in Abbildung 10 dargestellt.

Neben diesem selektionierbaren gibt es auch ein transientes Replikon-System, in dem statt des Neomycinresistenzgens ein Luziferasegen eingebaut ist. Mittlerweile sind auch Replikonsysteme für die HCV Genotypen 1a und 2a entwickelt worden.

Seit 2003 steht ein weiteres Zellkultursystem zur Verfügung, mit dem der Viruseintritt und die Neutralisierung untersucht werden können (Bartosch et al., 2003). Durch die Inkorporierung der HCV E1 und E2 Glykoproteine in lenti- oder retrovirale Core-Partikel entstehen infektiöse Pseudopartikel (HCVpp). Dieses System stellt eine gute Ergänzung zum Replikonsystem dar, da hiermit die im Replikon fehlenden strukturellen Oberflächenproteine des HCV untersucht werden können.

Durch die Entwicklung von Vollängenkonstrukten, welche in der Lage waren in Zellkultur zu replizieren, konnte nun ein vollständiges HCV Zellkultursystem einschließlich der Produktion von infektiösen Partikeln etabliert werden (HCVcc). Dieses System existiert gegenwärtig auf der Grundlage eines sehr hoch replizierenden Genotyp 2a Isolates (Wakita et al., 2005) und als GT 1a/2a Chimäre (Lindenbach et al., 2005). Inzwischen sind noch weitere Chimären konstruiert worden (Gottwein et al., 2007; Pietschmann, 2009b). Somit sind nun auch vergleichende Analysen verschiedener Isolate möglich, die Aufschluss über Mechanismen der Virusbildung und Freisetzung sowie des Infektionsweges geben können.

Schließlich wurde kürzlich ein System mit einem chimären Reporterassay vorgestellt, das es nun erstmals ermöglicht, nicht nur einzelne Virusvarianten, sondern ein breiteres Spektrum der

---

Quasispeziespopulation des Virus eines Patienten zu untersuchen. Es wurde von Hong et al. (2008) entwickelt.

### 3 Fragestellung

Aufgrund der hohen Bedeutung der HCV Infektion für die Entwicklung der Leberzirrhose, des Leberzellkarzinoms und der Lebertransplantation und den eingeschränkten Therapiemöglichkeiten auf der Grundlage der bestehenden PEG-Interferon/Ribavirin Kombinationstherapie werden bessere Behandlungsmöglichkeiten dringend benötigt.

Aktuell sind zahlreiche direkt antivirale Substanzen in der klinischen Entwicklung. Bei diesen Substanzen ist jedoch ähnlich wie bei der HIV und HBV Infektion eine Selektion von resistenten Varianten zu erwarten, so dass eine genaue Charakterisierung des Resistenzprofils für jedes der neuen direkt antiviralen Medikamente für die HCV Infektion von entscheidender Bedeutung für seinen optimalen Einsatz ist. Gegenwärtig befinden sich zwei HCV NS3 Proteaseinhibitoren (Telaprevir, Boceprevir) in der klinischen Phase 3 Entwicklung, mit deren Zulassung 2010/2011 zu rechnen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die erste genotypische und phänotypische Charakterisierung des NS3 Protease Inhibitors Boceprevir, (SCH503034) auf der Grundlage einer randomisiert, Placebo-kontrollierten Phase 1 Studie mit der 14-tägigen Gabe einer Boceprevir Monotherapie in verschiedenen Dosierungen, durchgeführt.

Dabei wurde zunächst eine genotypische Charakterisierung von potentiellen Resistenzmutationen unter der Behandlung und im Verlauf nach dem Therapieende im Vergleich zum Wildtyp vor Therapiebeginn durchgeführt und eine mögliche Korrelation mit der HCV RNA Viruslast, der Pharmakokinetik des Boceprevirs und der Boceprevirdosierung analysiert. Im nächsten Schritt erfolgte dann eine phänotypische Charakterisierung des Resistenzniveaus der detektierten einzelnen und kombinierten Mutationen im HCV Con1b-basierten Replikonsystem bezüglich ihres Resistenzniveaus gegenüber dem Boceprevir. Zusätzlich erfolgte eine phänotypische Analyse einer möglichen Kreuzresistenz gegenüber dem zweiten Phase 3 Proteaseinhibitor Telaprevir. Schließlich

---

erfolgte eine Untersuchung zur replikativen Fitness der beobachteten Resistenzmutationen mit Hilfe eines mathematischen Modells.

## 4 Material und Patienten

### **Adressen der Lieferanten und Hersteller**

Agilent Technologies GmbH & Co. KG  
Hewlett-Packard-Straße 8, D-76337 Waldbronn

AppliChem  
Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH  
Frankfurter Straße 129B, D-64293 Darmstadt

Beckman Coulter GmbH  
Europark Fichtenhain B13, D-47807 Krefeld

Bio-Rad Laboratories GmbH  
Heidemannstraße 164, D-80939 München

Biozym Scientific GmbH  
Steinbrinksweg 27, D-31840 Hessisch Oldendorf

Carl Roth GmbH + Co. KG  
Schoemperlenstr. 1-5, D-76185 Karlsruhe

Carl Zeiss MicroImaging GmbH  
Carl Zeiss Promenade 10, D-07745 Jena

Eppendorf AG  
Barkhausenweg 1, D-22339 Hamburg

Fermentas GmbH  
Opelstraße 9, D-68789 St. Leon-Rot

Fluka Chemie AG  
Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs

Gibco®/Invitrogen GmbH  
Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Straße 10, D-76131 Karlsruhe

Infors AG

Rittergasse 27, CH-4103 Bottmingen-Basel

Invitrogen GmbH

Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Straße 10, D-76131 Karlsruhe

Millipore

Am Kronberger Hang 5, D-65824 Schwalbach/Ts.

New England Biolabs

Brüningstraße 50, D-65926 Frankfurt am Main

PAA Labor- und Forschungsgesellschaft mbH

Wiener Straße 131, A-4020 Linz

Promega GmbH

High-Tech-Park, Schildkrötstraße 15, D-68199 Mannheim

QIAGEN

QIAGEN Straße 1, D-40724 Hilden

Roche Applied Science

Sandhofer Straße 116, D-68305 Mannheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Eschenstraße 5, D-82024 Taufkirchen bei München

SoftGenetics

State College, PA 16803, USA

Stratagene

11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

The MathWorks, Inc.

3 Apple Hill Drive, Natick, MA, USA

SPSS Inc.

233 S. Wacker Drive, Chicago, IL 60606, USA

## 4.1 Reagenzien

### **Bakterienmedium**

25 g/l Luria-Broth (Roth)

Ampicillin (Ampicillin Natriumsalz; Sigma-Aldrich)/Kanamycin (Kanamycin A, Monosulfat; Sigma-Aldrich) (50 µg/ml)

für Festmedium zusätzlich 15 g/l Agar (Fluka)

### **Zellkulturmedium**

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose (Gibco®) mit einem Zusatz von:

10 % Fetal Calf Serum (FCS, PAA)

2 % Glutamin (PAA)

1 % Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (Sigma-Aldrich)

### **Selektionsmedium**

Zellkulturmedium mit einem Zusatz von:

0,25 – 1 mg/l G418 (G418 Sulphate, Gibco®)

### **Einfriermedium**

DMEM mit einem Zusatz von 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich)

### **TAE-Puffer 50x**

242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l Aqua dest. (pH 8,3)

### **Laufpuffer**

1x TAE-Puffer

### **Agarose-Gel 1 %**

1 g Agarose (Invitrogen oder Biozym) ad 100 ml 1x TAE-Puffer

**TE-Puffer**

1 mM Tris; 0,1 mM EDTA (pH 8)

**Cytomix**

120 mM KCl; 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6);  
25 mM HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)  
(pH 7,6); 2 mM EGTA (*Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure*); 5 mM MgCl<sub>2</sub>

pH-Wert 7,6 mit KOH einstellen.

Immer frisch zugeben:

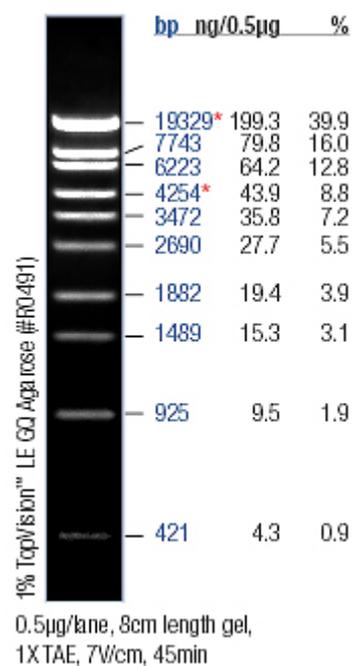
2 mM ATP (pH 7,6) (Roth)

5 mM Glutathion (L-Glutathion, reduziert; Roth)

anschließend steril filtrieren.

**DNA-Längenstandard**

Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker (Fermentas)



**MOPS-Acetat-Puffer 10x**

0,2 M MOPS (pH 7); 1 M NaAc; 0,5 M EDTA (pH 8); pH mit NaOH eingestellt und steril filtriert.

**DMPC-Wasser**

1 ml DMPC (Dimethylpyrocarbonat; Sigma-Aldrich) in 1 l Aqua dest. für 30 min bei RT stehen lassen und anschließend DMPC durch Autoklavieren inhibieren.

2X RNA Loading Dye (Fermentas)

DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich)

dNTP Set 100 mM (Invitrogen)

Dulbecco's PBS, phosphate buffered saline (PAA)

Formaldehyd-Lösung 37 % (AppliChem)

Formamid (Roth)

Glyzerin 100 % (Roth)

MgCl<sub>2</sub> (Magnesiumchlorid 25 mM; Roche Applied Science)

Multiscreen<sup>®</sup>-HV Filterplatten (Millipore)

NaAc (Natriumacetat 3 M, pH 5,2) (Sigma-Aldrich)

Phenol/Chloroform, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 49,5:49,5:1 (Fluka)

SDS/Natriumlaurylsulfat (Roth)

Sephadex<sup>®</sup> G-50 Dextran-Gel (Sigma-Aldrich)

## 4.2 Proteaseinhibitoren

VX-950 (Telaprevir) wurde von dem European Network of Excellence for Viral Resistance in Hepatitis C (viRgil, Drugpharm, Dr. Johan Neyts) synthetisiert, zur Verfügung gestellt und in Dimethylsulfoxid (DMSO) als eine 6,6 mM Lösung angesetzt.

SCH503034 (Boceprevir) wurde von der Schering-Plough Corporation (Kenilworth, N.J.) synthetisiert, zur Verfügung gestellt und in DMSO gelöst mit einer Konzentration von 19 mM.

Beide Substanzen werden bei 4°C gelagert.

## 4.3 Enzyme

### 4.3.1 Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs:

- AgeI
- AseI
- Bsu36I
- DpnI
- KpnI
- ScaI
- SfiI

### 4.3.2 Andere Enzyme

Promega GmbH:

- BSA
- RNasin
- DNase
- T7-RNA-Polymerase

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH:

- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase

Gibco®/Invitrogen GmbH:

- SuperScript™ II Reverse Transcriptase
- RNaseOut™ (40u/μl)
- Trypsin

Roche Applied Science:

- Pwo DNA Polymerase (5u/μl)

#### 4.4 Fertige Reagenziensets

QIAGEN:

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit
- RNeasy® Mini Kit
- QIAprep® Spin Miniprep Kit
- QIAquick® Gel Extraction Kit
- DyeEx® 2.0 Spin Kit

Invitrogen GmbH:

- TOPO® XL PCR Cloning Kit

Stratagene:

- QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Roche Applied Science:

- Expand Long Template PCR System

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH:

- BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
- TaqMan® Gene Expression Assay GAPDH
- TaqMan® Gene Expression Master Mix
- TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix

## 4.5 Zellen

### **Bakterien**

DH5 $\alpha$ , Genotyp:

*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*,  
*relA1*

TOP10, Genotyp:

F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  
 $\Delta$ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

XL10-Gold<sup>®</sup>, Genotyp:

Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1*  
*gyrA96* *relA1* *lac* Hte[F<sup>-</sup> *proAB* *lacI* $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]

### **Säugerzellen**

Huh-7 Lunet:

Humane Hepatoma Zelllinie; wurde mit HCV infiziert und mit Interferon wieder geheilt; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Volker Lohmann, Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Heidelberg.

## 4.6 Vektoren

- TOPO XL (Invitrogen)
- pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET
- pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ $\Delta$ 5B

Beide Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Volker Lohmann, Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Heidelberg.

## 4.7 Oligonukleotide

Gibco<sup>®</sup>/Invitrogen GmbH:

- Random Hexamere

## 4.7.1 Primer für die Mutagenese

<b>Mutageneseprimer</b>	<b>Sequenz</b>
sMutV36A	5'-GGAGGTCCAAGTGG <b>C</b> CTCCACCGCAACACAATC-3'
asMutV36A	5'-GATTGTGTTGCGGTGGAG <b>G</b> CCACTTGGACCTC-3'
sCon1/ET-V36G	5'-GGGGAGGTCCAAGTGG <b>G</b> CTCCACCGCAACACAA-3'
asCon1/ET-V36G	5'-TTGTGTTCCGGTGGAG <b>C</b> CCACTTGGACCTCCCC-3'
sCon1/ET-T54S	5'-AATGGCGTGTGTTGG <b>A</b> GTGTCTATCATGGTGCC-3'
asCon1/ET-T54S	5'-GGCACCATGATAGACACT <b>T</b> CCAACACACGCCATT-3'
sCon1/ET-T54A	5'-AATGGCGTGTGTTGG <b>G</b> CTGTCTATCATGGTGCC-3'
asCon1/ET-T54A	5'-GGCACCATGATAGACAG <b>C</b> CCAACACACGCCATT-3'
sMutR155K_1	5'-GCTGTGGGCATCTTTC <b>A</b> GGCTGCCGTGTGCACC-3'
asMutR155K_1	5'-GGTGCACACGGCAGCC <b>T</b> GAAAGATGCCACAGC-3'
sMutR155K_2	5'-GCTGTGGGCATCTTT <b>A</b> AGGCTGCCGTGTGCACC-3'
asMutR155K_2	5'-GGTGCACACGGCAGCC <b>T</b> TAAAGATGCCACAGC-3'
sCon1/ET-R155L	5'-GCTGTGGGCATCTTTC <b>T</b> GGCTGCCGTGTGCACC-3'
asCon1/ET-R155L	5'-GGTGCACACGGCAGCC <b>A</b> GAAAGATGCCACAGC-3'
sMutA156S	5'-GGCATCTTTCGG <b>T</b> CTGCCGTGTGCACCCGAG-3'
asMutA156S	5'-CTCGGGTGCACACGGCAG <b>A</b> CCGAAAGATGC-3'
sCon1/ET-A156T	5'-GTGGGCATCTTTCGG <b>A</b> CTGCCGTGTGCACCCGA-3'
asCon1/ET-A156T	5'-TCGGGTGCACACGGCAG <b>T</b> CCGAAAGATGCCAC-3'
sCon1/ET-V170A	5'-AAGGCGGTGGACTTTG <b>C</b> ACCCGTCGAGTCTATG-3'
asCon1/ET-V170A	5'-CATAGACTCGACGGGT <b>G</b> CAAAGTCCACCGCCTT-3'
sMutV48I	5'-TCCTGGCGACCTGC <b>A</b> TCAATGGCGTGTGTTGG-3'
asMutV48I	5'-CCAACACACGCCATTG <b>A</b> TGCAGGTCGCCAGGAAAG-3'
sCon1/ET-V55A	5'-TGGCGTGTGTTGGACTG <b>C</b> CTATCATGGTGC-3'
asCon1/ET-V55A	5'-GGCACCATGATA <b>G</b> CAGTCCAACACACGCCATTG-3'
sMutT72I	5'-CCAAAGGGCCCAATCA <b>T</b> CCAAATGTACACCAATG-3'
asMutT72I	5'-CATTGGTGTACATTTGG <b>A</b> TGATTGGGCCCTTTGG-3'
sMutI153V	5'-GCTGTGGGC <b>G</b> TCTTTCGGGCTGCCGTG-3'
asMutI153V	5'-CACGGCAGCCCGAAAG <b>A</b> CGCCACAGC-3'

#### 4.7.2 Primer für PCR und Sequenzierung

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
M13forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
NS3-sense	5'-CACGATAATACCATGGCG-3'
NS3-antisense	5'-ACGAGTTGTCCGTAAG-3'
NS3 outer antisense	5'-ATGGGCCACCTGGATG-3'
sEMCV-vorNS3	5'-GAGTCAAATGGCTCTCCTCAAG-3'
Antisenseprimer PCR	5'-GACAGAGCCACCTCCTCGAT-3'
NS3-1b-1s	5'-GGCGTGTGGGGACATCATC-3'
NS3-1b-3a	5'-GGTGGAGTACGTGATGGGGC-3'
NS3-1b-4a	5'-CATATACGCTCCAAAGCCCA-3'
NS3-1a-1s	5'-CCGGGAGATACTGCTCGGAC-3'
NS3-1a-2s	5'-CCGATGGAATGGTCTCCAAGG-3'
NS3-1a-1a	5'-GCTCTGGGGCACTGCTG-3'
NS3-1a-2a	5'-GAGAGGAGTTGTCCGTGAACAC-3'

#### 4.7.3 TaqMan Primer und Sonde

<b>Primer/Sonde</b>	<b>Sequenz</b>
HCV-S	5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT-3'
HCV-AS	5'-TACTCACCGGTCCGCAGA-3'
HCV-Sonde	5'-6FAM-TCCTGGAGGCTGCACGACACTCA-TAMRA-3'

## 4.8 Geräte

Agilent Technologies GmbH & Co. KG:

- 2100 Electrophoresis Bioanalyzer

Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH:

- GeneAmp® PCR System 9700
- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler
- StepOne™ Plus Real-Time PCR System
- 3130xl Genetic Analyzer

Eppendorf AG:

- Zentrifuge 5417C
- Thermomixer compact

Beckman Coulter GmbH:

- Spectrophotometer DU 800

Bio-Rad Laboratories GmbH:

- Molecular Imager Gel Doc XR System
- Gene Pulser® II Electroporation System

Infors AG:

- HT Tischschüttler

Carl Zeiss MicroImaging GmbH:

- Axiovert 200M

## 4.9 Software

### MathWorks

- MATLAB

### SoftGenetics

- Mutation Surveyor V2.52

### SPSS Inc.

- SPSS 16.0

## 4.10 Patienten

Die in dieser Arbeit untersuchten HCV RNA Isolate wurden aus Seren gewonnen, die von Patienten stammen, welche an chronischer Hepatitis C (Genotyp 1a und 1b) erkrankt sind und im Rahmen einer klinischen, doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie eine 14-tägige Therapie mit unterschiedlicher Dosierung des HCV NS3 Proteaseinhibitor Boceprevir erhielten. Für die genotypische Analyse wurden nur die Patienten untersucht, die die in dieser Studie maximale Dosierung von 400 mg Boceprevir zwei- oder dreimal täglich verabreicht bekamen. Patienten, die mit einer geringeren Dosis behandelt wurden, sind aufgrund einer minimalen antiviralen Aktivität in diesen Dosisgruppen nicht berücksichtigt worden. Die Seren wurden vor der Therapie (Baseline), am letzten Tag der Therapie (End-of-Treatment, EOT) und zwei Wochen nach Ende der Therapie (Follow-Up, FU) entnommen und bei -80°C gelagert. Alle Patienten haben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie und den im Rahmen des vorliegenden Projektes durchgeführten Untersuchungen gegeben, haben die Studie abgeschlossen und sind vollständig dokumentiert.

## 5 Methoden

### 5.1 HCV RNA Extraktion aus Patientenserum

Die HCV RNA Extraktion aus den Patientenseren erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben.

### 5.2 Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die reverse Transkription wurde die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, die dann als Template für die Amplifikation des NS3 Protease Gens diente. Als reverse Transkriptase wurde SuperScript II (Invitrogen), welche eine reduzierte RNase-H Aktivität besitzt, verwendet. Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

#### RT

3 µl	HCV RNA
1 µl	Random Hexamere
1 µl	RNase-freies Wasser
<b>10 min 65°C</b>	
2 µl	10 x PCR-Puffer + MgCl <sub>2</sub>
4 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
4 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	RNaseOut (40 u/µl)
0,3 µl	SuperScript II
4,2 µl	RNase-freies Wasser
<b>60 min 42°C</b>	

Aus der so gewonnenen cDNA wurde nun das NS3 Protease Gen in einer „nested“ (Genotyp 1a) bzw. „semi-nested“ (Genotyp 1b) PCR amplifiziert. Die Protokolle sind im Folgenden dargestellt:

**Genotyp 1a äußere PCR (I)**

6 µl	cDNA
5 µl	10 x Expand PCR Puffer 3
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	DMSO
5 µl	dNTPs (10 mM)
27,75 µl	RNase-freies Wasser
1,5 µl	äußerer sense Primer
1,5 µl	äußerer antisense Primer
0,75 µl	Expand Enzyme Mix

PCR Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
94°C	2 min	1
94°C	10 s	35
53°C	30 s	35
68°C	2 min	35
68°C	7 min	1

**Genotyp 1a innere PCR (II)**

5 µl	PCR I
5 µl	10 x Expand PCR Puffer 3
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	DMSO
5 µl	dNTPs (10 mM)
28,75 µl	RNase-freies Wasser
1,5 µl	innerer sense Primer
1,5 µl	innerer antisense Primer
0,75 µl	Expand Enzyme Mix

## PCR Programm:

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklenzahl</b>
94°C	2 min	1
94°C	10 s	35
54°C	30 s	35
68°C	2 min	35
68°C	7 min	1

**Genotyp 1b äußere PCR (I)**

6 µl	cDNA
5 µl	10 x Expand PCR Puffer 3
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	DMSO
5 µl	dNTPs (10 mM)
27,75 µl	RNase-freies Wasser
1,5 µl	sense Primer
1,5 µl	äußerer antisense Primer
0,75 µl	Expand Enzyme Mix

## PCR Programm:

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklenzahl</b>
94°C	2 min	1
94°C	10 s	35
53°C	30 s	35
68°C	2 min	35
68°C	7 min	1

**Genotyp 1b innere PCR (II)**

5 µl	PCR I
5 µl	10 x Expand PCR Puffer 3
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	DMSO
5 µl	dNTPs (10 mM)
28,75 µl	RNase-freies Wasser
1,5 µl	sense Primer
1,5 µl	innerer antisense Primer
0,75 µl	Expand Enzyme Mix

## PCR Programm:

<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklenzahl</b>
94°C	2 min	1
94°C	10 s	35
54°C	30 s	35
68°C	2 min	35
68°C	7 min	1

## 5.3 Elektrophorese

### 5.3.1 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern hierbei in einem konstanten, elektrischen Feld. Die elektrophoretische Auftrennung der geladenen DNA-Fragmente hängt dabei von der Gesamtnettoladung, der Größe und Gestalt des Moleküls, der Porengröße des Trägers, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Puffers und der elektrischen Feldstärke ab. Abhängig von der gewählten Gel- und Pufferkonzentration ist die Auftrennung von Fragmenten in einem Bereich von 0,1 kb bis 50 kb möglich.

Um ein 1 %-iges Agarosegel herzustellen, wurde 1 g Agarose (Invitrogen) in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf Handwärme wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben. Anschließend wurde das noch flüssige Gemisch in eine Gelform gegossen. Nach vollständiger Abkühlung und Auspolymerisieren des Gels wurde dieses in eine Gelkammer gelegt und vollständig mit 1x TAE-Puffer übergossen. Für ein Kontrollgel wurden 5 µl DNA mit 1 µl Ladepuffer aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 110 V.

Präparative Gele wurden mit 1 g Gold Agarose (Biozym) hergestellt. Zum Aufreinigen wurden 45 µl DNA mit 9 µl Ladepuffer versetzt und aufgetragen.

Die Auswertung des Gels erfolgte mit dem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad), wobei die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera fotografiert wurden.

### 5.3.2 RNA Formaldehyd-Gelelektrophorese

Um RNA gelelektrophoretisch auftrennen zu können, muss darauf geachtet werden, vollkommen RNase-frei zu arbeiten. Die Zusammensetzung des RNA-Gels unterschied sich deshalb von der eines DNA-Gels. Zu 1 g Agarose (Invitrogen) kamen 10 ml MOPS-Acetat-Puffer 10 x und 75 ml DMPC Wasser. Alles zusammen wurde aufgekocht, nach Abkühlen 10 ml Formaldehyd zugegeben und alles in eine Gelform gegossen. Von der RNA wurden 5 µl mit 5 µl 2X RNA Loading Dye (Fermentas) 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend mit 0,6 µl EtBr versetzt und auf das Gel aufgetragen, welches bei 50 mA ca. 2,5 Stunden lief.

Die Auswertung erfolgte mit dem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad).

### 5.3.3 On-Chip-Elektrophorese

Um zusätzlich eine Qualitätskontrolle der transkribierten RNA zu bekommen, wurde diese auf einem RNA Chip (RNA 6000 Nano Kit) im Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer analysiert. Durch mikrofluide

Technologie ist es möglich, die RNA elektrophoretisch innerhalb eines Chips aufzutrennen. Vorteile dieses Systems sind unter anderem, dass alle Komponenten RNase-frei gehalten werden können und der Einsatz von 1 µl RNA genügt, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten. Die Detektion der RNA erfolgt frei von Ethidiumbromid durch eine Laser-induzierte Fluoreszenzmessung des in die RNA eingelagerten dye-Farbstoffes. Neben der Größe der transkribierten RNA konnte so auch die Konzentration und die RNA-Qualität abgelesen werden. Die RNA-Konzentrationen liegen unter den Werten der photometrisch bestimmten Konzentrationen. Eventuelle Kontaminationen (Phenol, genomische DNA, Matrixbestandteile) absorbieren, ebenso wie Nukleinsäuren, Licht der Wellenlänge 260 nm. Durch die Laser-basierte Messung können diese Substanzen die Konzentrationsmessungen nicht mehr verfälschen.

## 5.4 Aufreinigung von DNA

### 5.4.1 Gelaufreinigung

Die PCR-Produkte, die kloniert werden sollen, werden zuvor über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Gelelektrophorese geschieht nach demselben Prinzip, das in Kapitel 5.3.1 beschrieben wurde. Ist eine klare Trennung der Banden erkennbar, kann die Bande, die die gewünschte DNA enthält, aus dem Gel mithilfe eines Skalpell ausgeschnitten werden. Anschließend wird die DNA unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben eluiert und kann für die Klonierung verwendet werden.

### 5.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die linearisierte Plasmid-DNA, die als Matrize für die *in vitro*-Transkription dient, wird mit Phenol-Chloroform (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol im Verhältnis 49,5 : 49,5 : 1; Fluka, Seelze) aufgereinigt und anschließend mit Ethanol gefällt. Beide Schritte erfolgten nach Standardprotokollen.

### 5.5 Klonierung und Transformation von PCR-Produkten

Die gelaufgereinigten PCR-Produkte wurden mit dem TOPO® XL PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen gemäß Herstellerangaben kloniert und anschließend in chemisch kompetente TOP10 Zellen, ebenfalls nach Herstellerangaben, transformiert.

### 5.6 Retransformation von Plasmiden

Zur Retransformation der Plasmide wurden 100 µl kompetente DH5α Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl der Plasmid DNA erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde durch Hitzeschock (45 s bei 42°C) transformiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und alles für 30 min bei 37°C im Thermoblock mit 350 upm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 6000 upm abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen. Die resuspendierten Zellen wurden auf LB-Ampicillin-Agar Platten ausplattiert und für 16 Stunden bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert.

### 5.7 Animpfen der Über-Nacht-Kulturen

Für Flüssigbakterienkulturen wurden Einzelkolonien in 5 ml LB-Ampicillin bzw. LB-Kanamycin Medium bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert.

Zur langfristigen Lagerung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurde von den Über-Nacht-Kulturen ein Aliquot mit dem gleichen Volumen 100 % Glycerin gemischt und bei -20°C gelagert.

### 5.8 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben.

### 5.9 Photometrische Nukleinsäurekonzentration Bestimmung

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem Spectrophotometer DU 800 (Beckman Coulter) bestimmt.

## 5.10 Sequenz-PCR und Sequenzierung

Die Sequenzanalyse des NS3 Protease Bereichs der einzelnen Klone erfolgte nach der Kettenabbruch-Synthese-Methode nach Sanger in einem 16-Kapillar 3130xl Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems.

Zunächst musste in einer Sequenz-PCR der klonierte NS3 Protease Bereich amplifiziert werden, wobei neben dNTPs auch ddNTPs (2',3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphate) im Ansatz vorhanden sind. Diese werden mit einer gewissen statistischen Häufigkeit an jeder Position des zu amplifizierenden Bereichs eingebaut und führen dort zu einem Strangabbruch. Jedes der vier verschiedenen Dideoxyribonukleosid-Triphosphate ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach Auftrennung aller Kettenabbruchprodukte in einer Kapillarelektrophorese werden die verschiedenen Farbstoffe durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Ein Detektor erkennt die Fluoreszenz der Farbstoffe an der jeweiligen Position, woraus letztendlich die Sequenz abgeleitet werden kann.

Das Protokoll der Sequenz-PCR ist im Folgenden dargestellt:

### Sequenz-PCR

2 µl	BigDyes (Sequenzier-Kit)
0,5 µl	M13-Primer
6,5 µl	Wasser
1 µl	Plasmid-DNA

### Sequenz-PCR Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
96°C	2 min	1
96°C	10 s	35
45°C	15 s	35
60°C	4 min	35
72°C	10 min	1

### 5.11 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Mutation Surveyor V2.52 (SoftGenetics, State College, PA) ausgewertet. Die Nukleotidsequenzen wurden im entsprechenden Leserahmen in Aminosäuresequenzen translatiert und gegen die jeweilige Konsensussequenz zu Baseline verglichen. Die Elektropherogramme der Sequenzen wurden parallel zur Auswertung visuell kontrolliert, um Fehler der Software auszuschließen.

### 5.12 Mutagenese

Die Punktmutationen wurden mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) generiert. Alle Schritte wurden gemäß Herstellerangaben ausgeführt. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Kapitel 4.7.1 aufgelistet. Der Reaktionsansatz ist im Folgenden dargestellt:

#### Mutagenese-PCR

5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	Replikon-Plasmid
1,5 µl	Mutageneseprimer sense
1,5 µl	Mutageneseprimer antisense
1 µl	dNTP Mix
3 µl	QuikSolution™
37 µl	Wasser
1 µl	<i>PfuUltra</i> ™ HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

#### PCR Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	2 min	1
95°C	50 s	18
60°C	50 s	18
68°C	11 min	18
68°C	7 min	1

Der komplette PCR Ansatz wurde anschließend mit 1 µl *DpnI* für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die mutationsfreie Template DNA zu zerstören. Die *DpnI* Endonuklease greift nur methylierte DNA an und sorgt so dafür, dass nur die neu synthetisierten DNA-Stränge, welche die Mutation enthalten, unversehrt bleiben.

Aus diesem Ansatz wurden 2 µl entnommen und in XL10-Gold® ultrakompetente Zellen transformiert.

### 5.13 Restriktion von DNA

Die Restriktion der Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer verwendet.

### 5.14 *In vitro* Transkription

Das Plasmid pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET enthält eine subgenomische HCV Replikon-Konsensussequenz, die von einem HCV-1b Genotyp stammt, und einen stromaufwärts liegenden T7 Promotor für die *in vitro* RNA Synthese. Um eine *in vitro* Transkription durchführen zu können, muss das Plasmid zunächst linearisiert werden. Dies geschieht über einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *AseI*. Anschließend ist das Restriktionsenzym *ScaI* in der Lage, das linearisierte Plasmid direkt am T7 Promotor zu schneiden und diesen zugänglich zu machen. Die so zurechtgeschnittene Plasmid-DNA wird durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kapitel 5.4.2) aufgereinigt. Das linearisierte und aufgereinigte Plasmid wird dann durch eine T7 RNA Polymerase (Promega, Madison, WI) nach Herstellerangaben transkribiert. Der Ansatz ist im Folgenden dargestellt:

50 $\mu$ l	DNA
20 $\mu$ l	5x Transkriptionspuffer
6 $\mu$ l	25mM rNTPs
10 $\mu$ l	100mM DTT
2,5 $\mu$ l	RNasin (40 u/ $\mu$ l)
9 $\mu$ l	Wasser RNase-frei
2,5 $\mu$ l	T7-RNA-Polymerase

Der Ansatz wird zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden weitere 2  $\mu$ l T7-RNA-Polymerase zugegeben und weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgt ein DNase-Verdau durch die Zugabe von 7,5  $\mu$ l DNase (1 u/ $\mu$ l) und 30 min Inkubation bei 37°C. Alle Inkubationsschritte werden im Thermoblock (Eppendorf, Thermomixer compact) ausgeführt.

### 5.15 Transfektion von Huh-7-Lunet Zellen

Huh-7-Lunet Zellen werden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), das 10 % fötales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Pasching) und 2 mM L-Glutamin enthält, kultiviert.

Die Zellen werden mit *in vitro* transkribierter subgenomischer HCV Replikon RNA transfiziert. Die Wildtyp-Sequenz ist identisch mit dem pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET Replikon, das von Krieger et al. beschrieben wurde (Krieger et al., 2001).

Die Zellen werden trypsiniert, mit PBS gewaschen, gezählt (siehe Kapitel 5.17) und resuspendiert mit einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen pro ml Cytomix, der 2 mM ATP und 5 mM Glutathion enthält. Ein Mikrogramm der *in vitro*-transkribierten RNA wird mit 400  $\mu$ l der Zellsuspension gemischt und elektroporiert. Die Zellen werden direkt in 8 ml DMEM aufgenommen. Davon werden 3 ml und 5 ml auf 10 cm Platten ausgesät und das Volumen mit DMEM auf jeweils 8 ml aufgefüllt. Die Elektroporationsbedingungen sind 975  $\mu$ F und 270 V mit einem Gene Pulser II System (Bio-Rad, München) und Küvetten mit einem Durchmesser von 0,4 cm.

Die Zellen, die stabil und eigenständig replizierende HCV Replikon RNA enthalten, werden mit 750 µg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) selektioniert und kultiviert. Anschließend können diese Zellen für den HCV Replikon Assay verwendet werden. Ein Teil der Zellen wird geerntet (siehe Kapitel 5.17) und in DMEM mit 10 % DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 5.16 HCV Replikon Assay

Die HCV Replikon Zellen werden in 500 µl DMEM mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wird das Medium ausgetauscht gegen DMEM mit 750 µg/ml G418 und entweder DMSO als Kontrolle oder verschiedene Verdünnungen des Proteaseinhibitors. Achtundvierzig Stunden später werden die Zellen geerntet und die RNA wird mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Menge der HCV RNA wird bestimmt durch eine real-time reverse Transkription PCR (RT-PCR), einem quantitativen Assay (TaqMan, siehe Kapitel 5.19) mit HCV-spezifischen Primern (5'-ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT-3' und 5'-TAC TCA CCG GTT CCG CAG A-3'), einer HCV-spezifischen Sonde (5'-6FAM-TCC TGG AGG CTG CAC GAC ACT CA XT--PH-3) und dem StepOne™ Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt).

Der IC<sub>50</sub> Wert wird definiert als die Konzentration der Substanz, bei der die HCV RNA Menge in den Replikonzellen um 50 % reduziert wird.

### 5.17 Zellkultur

Alle Versuche wurden mit der humanen Hepatoma Zelllinie Huh-7 Lunet (Friebe et al., 2005) durchgeführt. Diese zeichnet sich durch eine höhere Replikationsrate des HCV Con-1b Replikons, im Vergleich zu ursprünglichen Huh-7 Zellen, aus.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in handelsüblichen Zellkulturflaschen oder -schalen verschiedener Größen im Brutschrank bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Als Kulturmedium wurde DMEM mit einem Zusatz von 10 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Antibiotic

Antimycotic Solution (100x) verwendet. Die Zellen bekamen ein- bis zweimal wöchentlich einen Mediumwechsel und wurden je nach Bedarf gesplittet. Ein Teil der Zellen wurde zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Einfriermedium diente DMEM mit 10 % DMSO. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen geerntet und in 10 ml PBS aufgenommen. Von den gut resuspendierten Zellen wurden 10 µl mit 90 µl Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese besteht aus neun gleich großen Quadraten, wobei jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> besitzt. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt dies ein Volumen von 0,1 µl. Je Kammer wurden vier, d. h. insgesamt acht, große Quadrate mit einem inversen Mikroskop ausgewertet. Es wurden lediglich die hellen runden Zellen gezählt, da der Farbstoff nur Zellmembranen beschädigter oder toter Zellen passieren kann, so dass diese im Mikroskop dunkel erscheinen. Nach Berechnung der Zellzahl wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen Medium aufgenommen, so dass pro Milliliter Medium eine definierte Anzahl an Zellen vorhanden war.

### 5.18 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen gemäß den Herstellerangaben.

### 5.19 Real-time quantitative PCR (TaqMan)

Die momentan sensitivste Methode, um RNA zu quantifizieren, ist die real-time quantitative PCR. Verglichen mit anderen Techniken zur Quantifizierung, wie Northern Blot oder RNase Protection Assay, liefert diese Methode auch bei geringsten RNA Mengen noch zuverlässige Ergebnisse.

Eine Variante der real-time PCR ist die TaqMan PCR. Sie zeichnet sich durch eine hohe Geschwindigkeit, große Sensitivität und Spezifität aus. Grundlage dieses Verfahrens ist der von Holland *et al.* (1991) beschriebene 5'-3'-Exonukleaseaktivität der TaqMan DNA Polymerase zur Sequenz-spezifischen Amplifikation

ausgenutzt. Lee *et al.* (1993) entwickelten schließlich fluorogene Sonden, die es ermöglichen, den Abbau der Sonde zeitnah während der Amplifikation zu detektieren.

### **TaqMan Sonden**

Die TaqMan Sonde hybridisiert am Ziel-Amplikon zwischen zwei PCR Primern, wobei das gesamte Amplifikat eine Größe von 200 bp nicht überschreiten sollte. TaqMan Sonden sind Oligonukleotidsonden, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM, TAMRA), dem Reporter, markiert sind. Am 3'-Ende befindet sich der so genannte Quencher, welcher die Fluoreszenzemission des Reporters inaktiviert. TaqMan Sonden nutzen das Förster/fluorescence resonance energy transfer (FRET) Prinzip. Der Reporterfarbstoff dient als Donor-Fluorochrom, der mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird. Die frei werdende Energie wird auf den in der Nähe befindlichen Quencher, das Akzeptor-Fluorochrom, übertragen und somit die Fluoreszenz-Emission unterbunden. Während der Synthese des Gegenstranges führt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase zum Abbau der Sonde am 5'-Ende und somit werden Reporter und Quencher voneinander getrennt. Das Fluoreszenz-Signal des Reporters wird nun frei und kann am Ende der Elongation in jedem Zyklus mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) gemessen werden.

### **Relative Quantifizierung**

Zur Ermittlung der eingesetzten RNA Mengen gibt es zwei Ansätze. Zum Einen die absolute Quantifizierung, die die Menge der eingesetzten RNA als Kopienzahl liefert. Diese Methode ist sehr anfällig für Fehler und sehr aufwendig, weshalb sie in dieser Arbeit keine Anwendung fand.

Zum Anderen die relative Quantifizierung, bei der man eine interne Kontrolle benötigt, auf die die Expression des Zielgens normalisiert wird. In der Regel besteht die interne Kontrolle aus einem Housekeeping-Gen, das durch die experimentelle Behandlung (mit Medikament/ohne Medikament) nicht beeinflusst wird. Die Kontrolle gleicht Fehler aus, die durch das Einsetzen unterschiedlicher Zellmengen entstehen können. Die

RNA Menge wird in Relation zu einer unbehandelten Probe (100 %) angegeben, so dass der Abfall an RNA prozentual dazu dargestellt werden kann.

### **$2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode**

Um die unterschiedlichen Expressionsraten zu berechnen, wurde die  $\Delta\Delta CT$  Methode verwendet. Die Amplifikation während einer PCR kann in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten flachen Phase ist wenig Template DNA vorhanden, die Wahrscheinlichkeit auf Primer und Polymerase zu treffen ist also noch sehr gering. Folglich ist zu Beginn keine exponentielle Verdoppelung der DNA Menge zu erwarten. Die zweite Phase zeigt einen exponentiellen Verlauf, sobald genügend DNA Moleküle vorhanden sind, um eine effiziente Amplifikation zu gewährleisten. Wird ein bestimmter Schwellenwert überschritten, beginnt die quantifizierbare exponentielle Phase der PCR. Für die TaqMan RT-PCR ergibt sich hieraus der CT-Wert (threshold cycle), welcher den Zeitpunkt der Amplifikation beschreibt, ab dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. In der dritten Phase hemmt die Menge an PCR-Produkten die Reaktion, außerdem können Substrate verbraucht sein und die Polymerasen werden zunehmend durch die Hitze zerstört.

Die CT-Werte der internen Kontrolle werden von den CT-Werten der Probe subtrahiert ( $\Delta CT$ -Wert).

Diese Differenz ( $\Delta CT$ ) wird wiederum von der Kalibratorprobe (unbehandelte Zellen) subtrahiert und man erhält  $\Delta\Delta CT$ . Dies in die Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  eingesetzt, liefert das Ergebnis als n-fache Expression im Vergleich zum Kalibrator.

### 5.20 Curve-Fitting

Die aus den TaqMan-Messungen erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Programms MATLAB in einem Drei-Parameter Kurven-Fit angepasst, um etwaige Schwankungen der Messungen auszugleichen.

## 5.21 Statistik

Die statistische Auswertung der erzielten Daten erfolgte mit dem Statistikpaket SPSS (Version 16, SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A.). Zur Anwendung kamen deskriptive und inferenzstatistische Analysen. Paarweise Vergleiche wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Die aufgestellten Hypothesen waren ungerichtet, so dass ein zweiseitiger Test gewählt wurde. Weiterhin wurden Rang-Korrelationen berechnet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,5$  gewählt, d. h. p-Werte kleiner als 0,05 kennzeichnen signifikante Testergebnisse.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Virologisches Ansprechen auf die Therapie

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen von 22 Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert sind und als Non-Responder aus einer Standardtherapie mit PEG-Interferon und Ribavirin hervorgingen. Sie wurden 14 Tage mit Boceprevir in einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase 1 Studie behandelt. Eine genaue Charakterisierung der untersuchten Patienten ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Viruslasten und Medikamentendosierung der untersuchten Patienten

<b>Pat.-Nr.</b>	<b>VL vor Therapie [IU/ml]</b>	<b>VL EOT [IU/ml]</b>	<b><math>\Delta\log_{10}</math> vor <math>\leftrightarrow</math> Ende Therapie</b>	<b>VL Follow-up [IU/ml]</b>	<b>-log Nadir</b>	<b>Dosierung Boceprevir</b>
<b>9</b>	1.133.721	113.372	1,0	1.308.140	-2,13	400 mg BID
<b>10</b>	1.569.767	165.698	1,0	1.395.349	-2,22	400 mg BID
<b>12</b>	340.116	7.413	1,7	51.453	-2,66	400 mg TID
<b>13</b>	497.093	24.419	1,3	279.070	-2,85	400 mg TID
<b>14</b>	12.209.302	122.093	2,0	2.180.233	-2,47	400 mg TID
<b>15</b>	72.384	4.099	1,2	139.535	-2,01	400 mg TID
<b>16</b>	828.488	235.465	0,5	1.220.930	-2,16	400 mg TID
<b>17</b>	616.279	17.442	1,5	76.163	-2,57	400 mg BID wf
<b>3</b>	5.377.907	404.070	1,1	87.209	-3,23	400 mg BID wf
<b>6</b>	668.605	8.459	1,9	781.977	-2,26	400 mg BID wf
<b>19</b>	1.462.209	6.977	2,3	741.279	-2,84	400 mg TID wf
<b>7</b>	837.209	10.000	1,9	209.884	-2,17	400 mg TID wf
<b>21</b>	1.642.442	4.738	2,5	633.721	-3,26	400 mg TID wf
<b>8</b>	278.488	17.762	1,2	69.186	-3,41	400 mg TID wf
<b>22</b>	137.209	12.587	1,0	62.791	-2,04	400 mg TID wf
<b>11</b>	13.953.488	2.790.698	0,7	8.633.721	-1,92	400 mg BID
<b>1</b>	139.535	8.023	1,2	95.930	-1,84	400 mg TID
<b>2</b>	1.933.140	683.140	0,5	1.744.186	-1,59	400 mg BID wf
<b>4</b>	976.744	220.930	0,6	273.547	-1,88	400 mg BID wf
<b>5</b>	147.093	24.448	0,8	587.209	-1,51	400 mg BID wf
<b>18</b>	5.290.698	444.767	1,1	1.843.023	-1,95	400 mg BID wf
<b>20</b>	805.233	81.105	1,0	639.535	-1,73	400 mg TID wf

VL: Viruslast; EOT: End of Treatment - Therapieende; Follow-up: Verlauf 14 Tage nach Therapieende, BID: bis in die, zweimal täglich; TID: ter in die, dreimal täglich; wf: with food, Tabletteneinnahme zusammen mit einer standardisierten Mahlzeit; oben: Patienten mit max. HCV RNA Abfall  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml; unten: Patienten mit max. HCV RNA Abfall  $< 2\log_{10}$  IU/ml.

Es wurden nur die Seren untersucht, die von Patienten stammten, welche mit 400 mg Boceprevir zwei- oder dreimal täglich behandelt wurden. Diese Patienten zeigten das deutlichste Ansprechen auf die Monotherapie, was sich in den höchsten Viruslastabfällen zeigte. In der untersuchten Patientengruppe fanden sich maximale HCV RNA Abfälle zwischen 1,5 und 3,4  $\log_{10}$  Stufen. Die Messung der HCV RNA Konzentrationen wurde im Rahmen der Studie mit einem eigenen real-time PCR basierten Verfahren der Firma Essex/Schering-Plough durchgeführt.

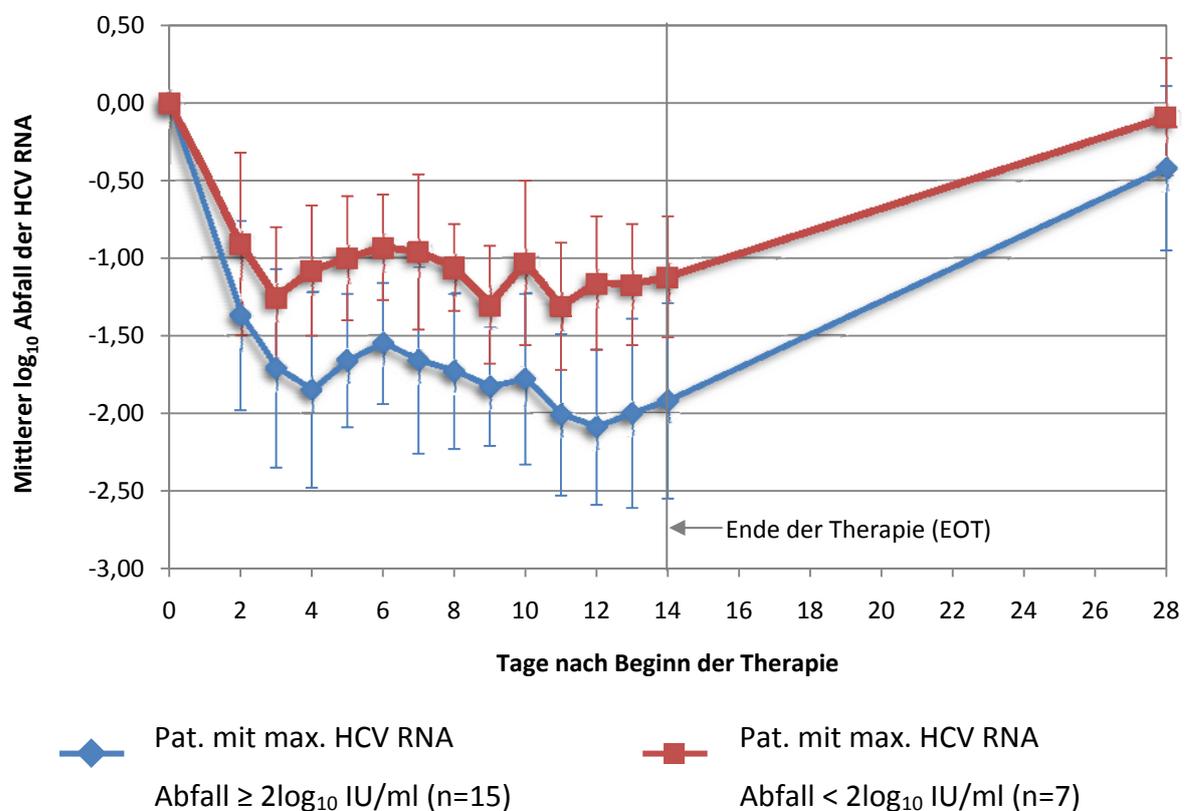


Abbildung 11: Mittlerer Viruslastverlauf der zwei Patientengruppen

Die Quadrate zeigen die einzelnen Zeitpunkte, an denen die Viruslast der Patienten bestimmt wurde. Die Werte sind Mittelwerte aller gemessenen Viruslasten der gruppenzugehörigen Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Balken zeigen die Standardabweichung.

Da davon ausgegangen wurde, dass das Ausmaß des Selektionsdruckes, der durch die antivirale Aktivität gemessen an dem Abfall der HCV RNA Konzentration unter Therapie beeinflusst wird, Einfluss auf die Art und Anzahl der sich bildenden Resistenzmutationen hat, wurden die Patienten

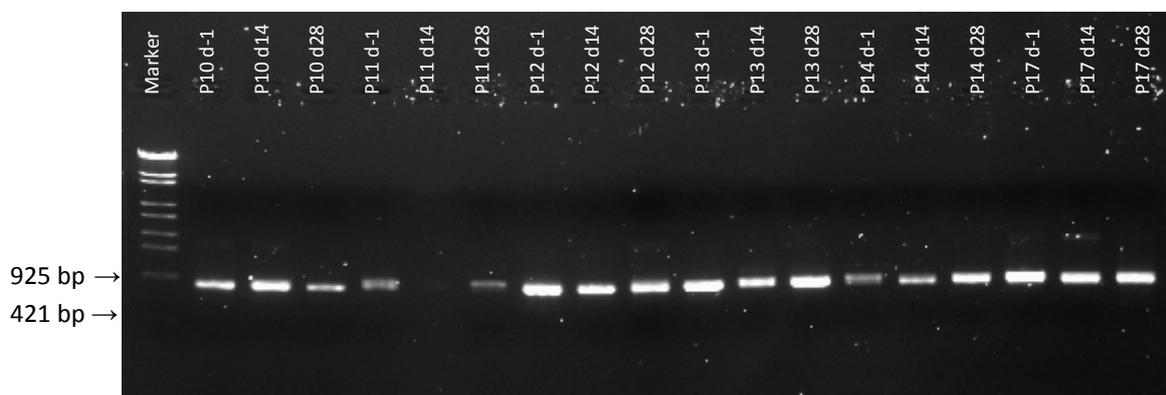
anhand des maximalen Abfalls der HCV RNA Konzentration in zwei Gruppen eingeteilt und separat analysiert. Die erste Gruppe repräsentiert einen hohen Selektionsdruck auf das Virus, was durch einen hohen Abfall der HCV RNA deutlich wird. Der maximale HCV RNA Abfall während der Therapie lag in dieser Gruppe bei  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml. Die zweite Gruppe zeigt die Entwicklung der Mutationen unter einem niedrigeren Selektionsdruck. Hier war der maximale HCV RNA Abfall unter Therapie  $< 2\log_{10}$  IU/ml. Patienten der Gruppe mit hohem Viruslast-Abfall sind in Tabelle 4 im oberen Teil zusammengefasst und Patienten der Gruppe mit niedrigeren Viruslast-Abfall sind in Tabelle 4 im unteren Teil zusammengefasst. Die Viruslastverläufe der zwei Patientengruppen sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Viruslast der Patienten wurde während der Behandlungsphase jeden Tag und zusätzlich zwei Wochen nach Ende der Therapie (Follow-Up) bestimmt.

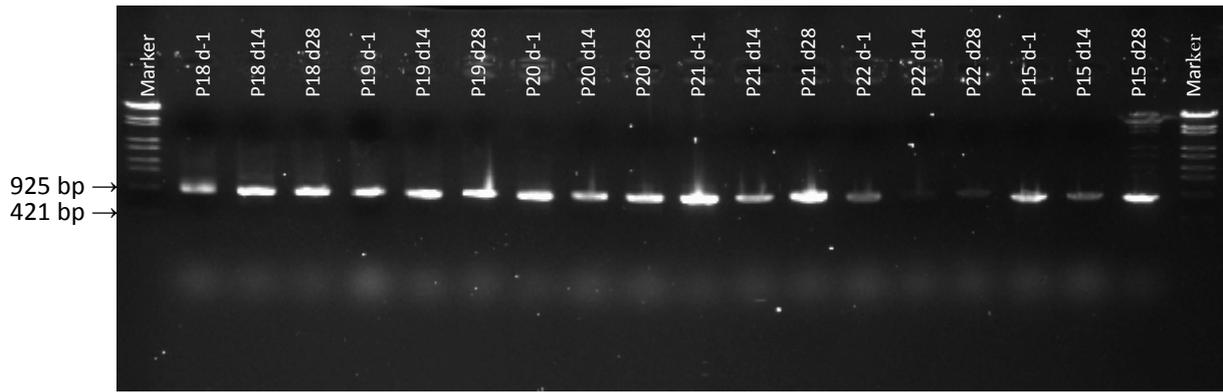
## 6.2 Genotypische Resistenzanalyse

Die Proben für die Sequenzanalysen wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- ⌚ Tag -1 vor Therapie (Baseline)
- ⌚ Tag 14 Ende der Therapie (EOT, End-of-Treatment)
- ⌚ Tag 28 Ende der Verlaufsbeobachtung (EFU, End-of-Follow-Up)

Die HCV RNA wurde aus dem Patientenserum isoliert und mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben. In einer „semi-nested“ (GT 1b) bzw. „nested“ (GT 1a) PCR wurde das NS3 Protease Gen amplifiziert.

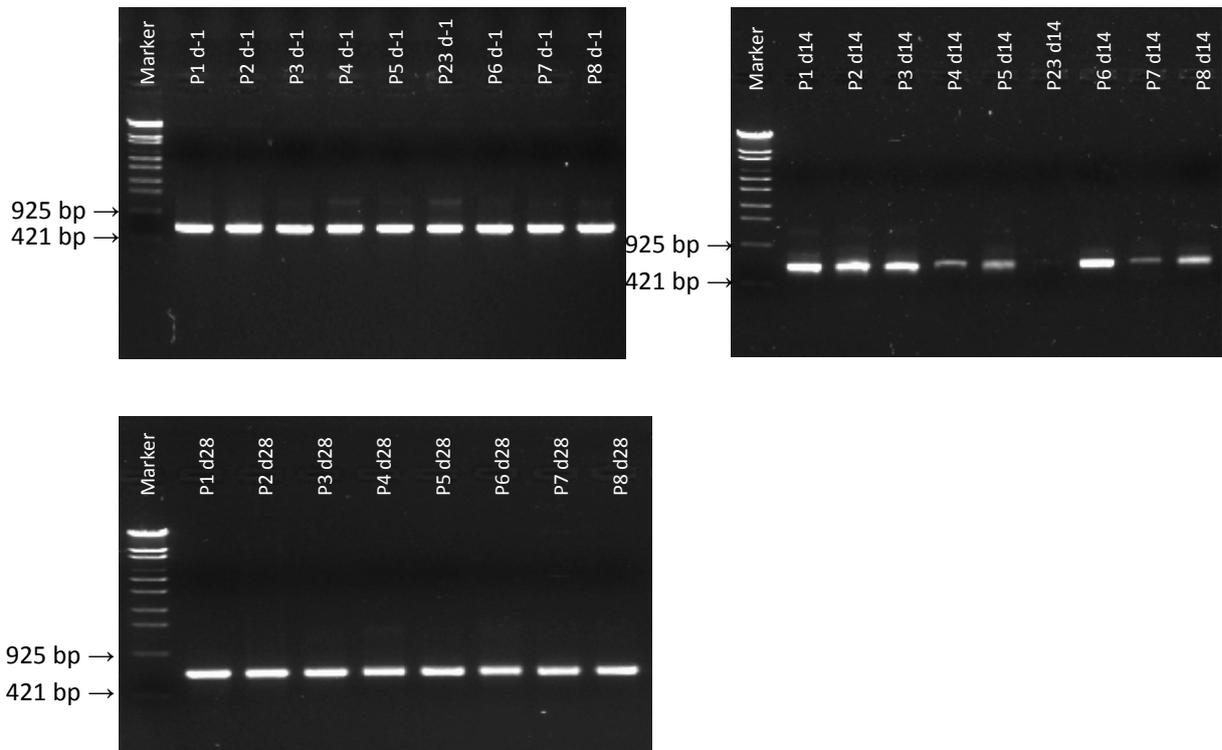




*Abbildung 12: Ergebnisse der Amplifikation des NS3 Protease Gens der Genotyp 1b Patienten*

Amplifikate des NS3 Protease Gens aus Subtyp 1b Patienten mit einer Größe von 831 bp; Marker jeweils: Lambda DNA/Eco130I (Styl)

Die Ergebnisse der Amplifikation sind in Abbildung 12 und 13 dargestellt. Die Größe der Banden unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Subtypen (GT1b: 831 bp; GT1a: 624 bp).



*Abbildung 13: Ergebnisse der Amplifikation des NS3 Protease Gens der Genotyp 1a Patienten*

Amplifikate des NS3 Protease Gens aus Subtyp 1a Patienten mit einer Größe von 624 bp; Marker jeweils: Lambda DNA/Eco130I (Styl)

Für die anschließende Klonierung wurden die PCR-Produkte über ein Agarosegel aufgereinigt.

Nach der Klonierung in den pCR®-XL-TOPO® Vektor wurden jeweils 48 Klone sequenziert. Aus den einzelnen Sequenzen der Proben von Tag -1 wurde für jeden Patienten eine Baseline Konsensus-Sequenz mit Hilfe des Programms Mutation Surveyor V.2.52 (Softgenetics) gebildet. Alle Sequenzen der weiteren Zeitpunkte (EOT, EFU) wurden gegen diese Baseline verglichen. Zum Teil wurde die Baseline-Sequenz auch durch eine Direktsequenzierung erhalten, da keine Unterschiede in der Konsensussequenz bei beiden Methoden zu erkennen war. Es konnten durchschnittlich 47 Sequenzen des NS3 Protease Gens pro Patient und Zeitpunkt ausgewertet werden. Diese klonale Analyse zeigte, dass am Ende der zweiwöchigen Behandlung mit Boceprevir als Monotherapie eine hohe Heterogenität in der HCV Quasispezies vorliegt. Um aus der Vielzahl der auftretenden Mutationen, echte Resistenzmutationen herausfiltern zu können, wurden bestimmte Auswahlkriterien getroffen. Nach zwei Wochen Selektion durch den Proteaseinhibitor sollten die Resistenzmutationen, im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Quasispezies der Baseline in einem relevanten Anteil in der Quasispezies aufgrund der relativen Resistenz gegenüber dem Proteaseinhibitor repräsentiert sein. So kamen nur Mutationen, welche mit einer Häufigkeit von mindestens 5 % im Vergleich zur Baseline auftraten, in die weitere Auswertung.

An den folgenden 31 Positionen innerhalb der NS3 Protease (AS 1 - 181) traten Mutationen zu über 5 % in der Quasispezies am Ende der Therapie im Vergleich zu Baseline auf: Positionen 7, 8, 14, 18, 33, 36, 46, 48, 49, 54, 55, 61, 71, 72, 80, 86, 87, 91, 117, 119, 122, 127, 131, 146, 147, 153, 155, 156, 170, 174 und 179. Austausche hin zur Wildtypsequenz des jeweiligen Prototyps wurden nicht mitberücksichtigt. An 19 dieser Positionen wurden Mutationen bei mehr als einem Patienten gefunden. Die Verteilung dieser Mutationen ist in Abbildung 14 dargestellt.

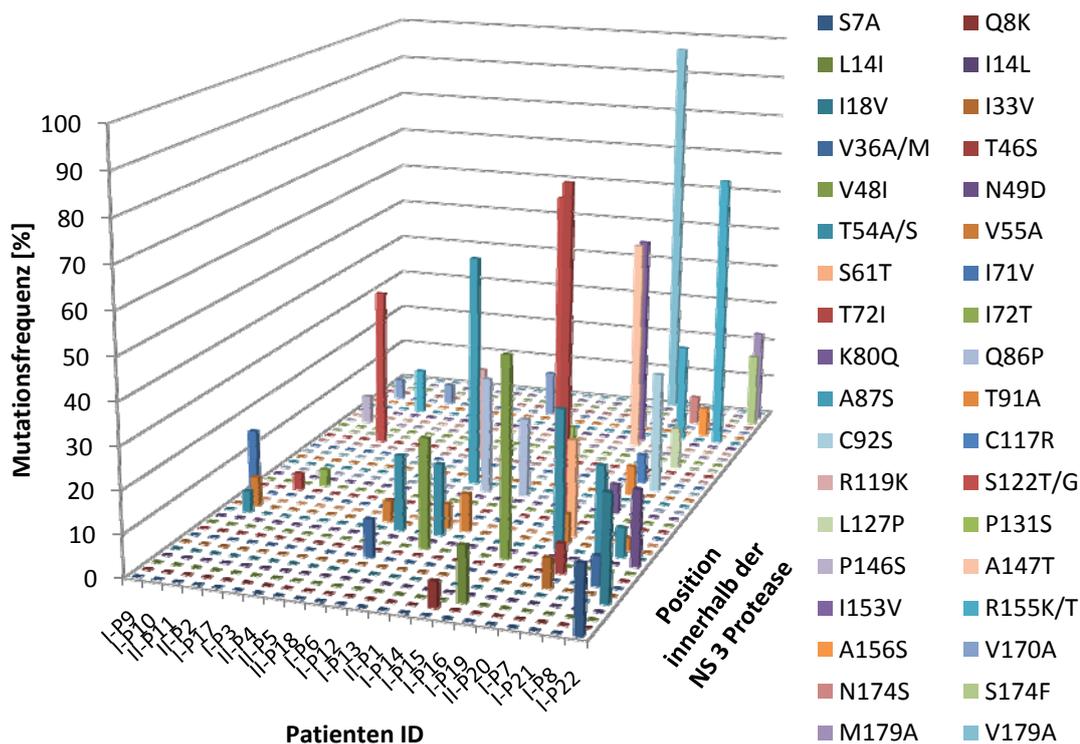


Abbildung 14: Alle Mutationen über 5 % (EOT) in beiden Patientengruppen

Die einzelnen Mutationen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Je höher der Balken, desto öfter das Vorkommen der jeweiligen Mutation. Je weiter hinten sich der Balken auf der z-Achse befindet, desto weiter in Richtung 3'-Ende des NS3 Protease Gens befindet sich die zugehörige Mutation. I: HCV RNA-Abfall  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml (n = 15); II: HCV RNA-Abfall  $< 2\log_{10}$  IU/ml (n=7).

Um den Einfluss des Selektionsdruckes auf die generelle Bildung von Mutationen deutlich zu machen, wurde das Vorkommen aller Mutationen über 5 %, also auch Rückmutationen zur Wildtypsequenz, für die verschiedenen Patientengruppen in Abbildung 15 gezeigt.

Um aus der Fülle der auftretenden Mutationen geeignete Kandidaten mit Resistenzeigenschaften gegenüber dem Boceprevir herauszufiltern, wurden weitere Einschränkungen getroffen. Bei bekannten Resistenzmutationen ist im Verlauf zu erkennen, dass sie in der Quasispezies gar nicht mehr nachweisbar sind oder ihre Häufigkeit ohne vorhandenen Selektionsdruck zumindest aufgrund einer geringeren Replikationseffektivität abnimmt. Deshalb wurden nur die Mutationen weiter untersucht, die zum Zeitpunkt der Verlaufsuntersuchung, also

nach zwei Wochen ohne Einnahme der Proteaseinhibitors Boceprevir, weniger häufig auftraten als am Ende der Therapie.

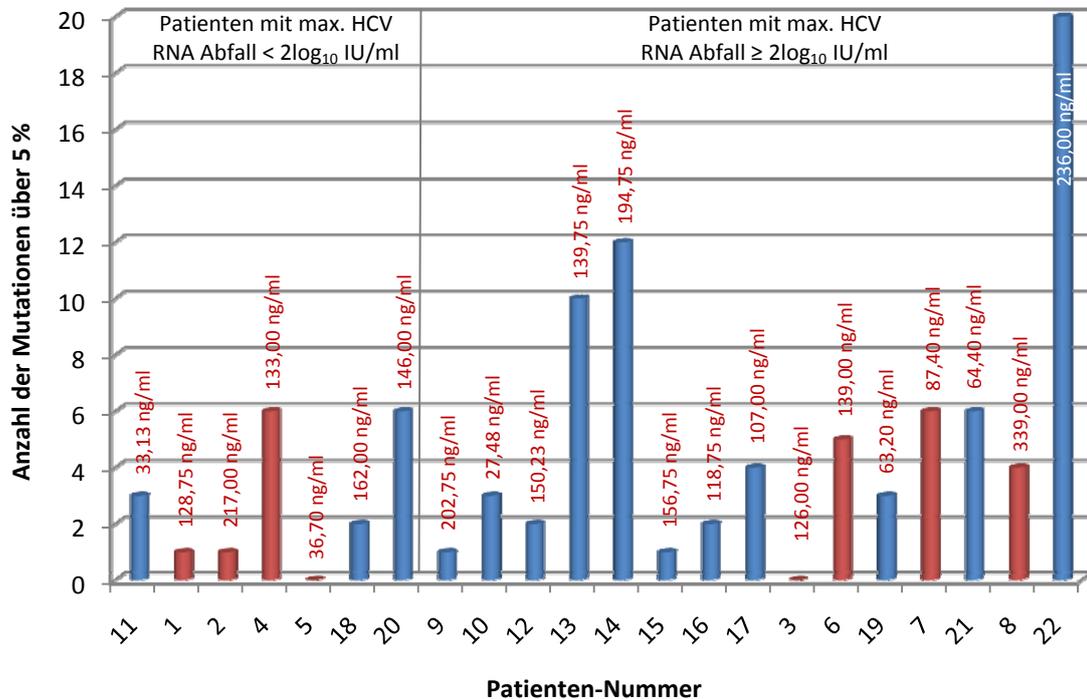


Abbildung 15: Anzahl der Mutationen über 5 % in den verschiedenen Patientengruppen und zugehörige Plasmaspiegel von Boceprevir

Links: Patienten mit max. HCV RNA Abfall  $< 2\log_{10}$  IU/ml; rechts: Patienten mit max. HCV RNA Abfall  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml. In rot dargestellt sind GT1a Patienten; in blau dargestellt sind GT1b Patienten. Die roten Zahlen über den Balken stellen die mittleren Plasmaspiegel (gemessen unmittelbar vor der nächsten Medikamentengabe) von Boceprevir dar.

In Tabelle 5 sind alle Mutationen aufgeführt, die diese Bedingungen erfüllten. Darunter finden sich an den Positionen 36, 54, 155, 156 und 170 Aminosäureaustausche mit bereits bekannter klinischer Resistenz gegenüber dem Proteaseinhibitor Telaprevir bzw. einer *in vitro* Resistenz gegenüber Boceprevir (Sarrazin et al., 2007b; Tong et al., 2008). Diese liegen als Einzel- oder Doppelmutationen (V36M + T54S, V36A + R155K, T54S/A + R155K, T54S + A156S) vor. Zusätzlich zu den oben genannten bekannten Resistenzmutationen wurden an vier weiteren Positionen Mutationen gefunden (V48I, V55A, T72I, I153V), die alle genannten

Kriterien erfüllten und somit genauer auf ihr Resistenzpotential gegenüber Proteaseinhibitoren untersucht wurden.

Tabelle 5: Mutationen (> 5 % zu EOT) mit Abfall im Verlauf bei mehr als einem Patienten

Mutationen	Patienten-Nummer (GT)
V36M/A	6 (1a), 8 (1a)
V48I	13 (1b), 16 (1b)
T54S/A	10 (1b), 13 (1b), 6 (1a), 20 (1b), 21 (1b), 8 (1a)
V55A	10 (1b), 13 (1b), 1 (1a), 18 (1b), 20 (1b)
T72I	11 (1b), 19 (1b)
I153V	19 (1b), 22 (1b)
R155K	2 (1a), 7 (1a), 8 (1a)
A156S	21 (1b)
V170A/L	10 (1b), 12 (1b), 17 (1b)

In schwarz geschrieben sind Mutationen an den Positionen, die bereits im Zusammenhang mit Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren beschrieben wurden. In blau geschrieben sind Mutationen mit bislang unbekanntem Resistenzpotential gegenüber Proteaseinhibitoren. GT = Genotyp. In rot geschrieben sind die Nummern der Patienten mit niedrigerem Abfall der HCV RNA.

## 6.2.1 Verteilungsmuster der Mutationen unter Berücksichtigung des virologischen Ansprechens und des Subtyps

### 6.2.1.1 Verteilung der Mutationen bei den zwei Patientengruppen

Die durchschnittliche Häufigkeit von Mutationen an den Positionen V36, T54, R155, A156 und V170 an Tag 14 (EOT) beträgt 17 % in der Gruppe der Patienten mit einem maximalen HCV RNA Abfall von  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml. Zu Tag 28 (EFU) nimmt die Frequenz dieser Mutationen auf 6 % ab ( $p = 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt findet sich an Position A156 keine Mutation mehr. Die potentiellen neuen Resistenzmutationen an den Positionen V48, V55, T72 und I153 zeigen am Ende der Therapie eine

mittlere Frequenz von 15 % und einen Abfall am Ende der Verlaufsuntersuchungen auf 10 % ( $p > 0,2$ ).

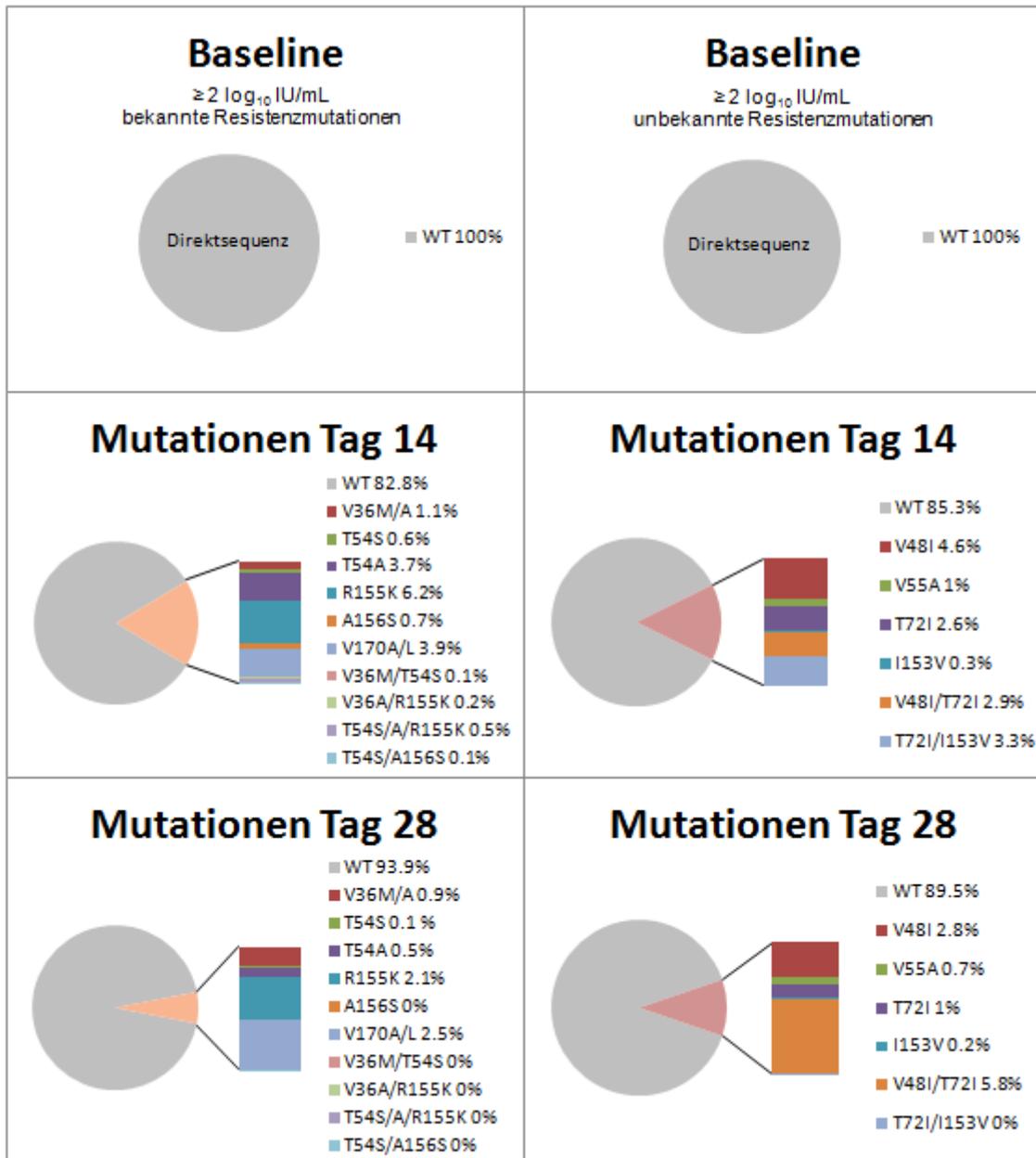


Abbildung 16: Verteilung der Mutationen bei Patienten mit maximalem HCV RNA Abfall  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml

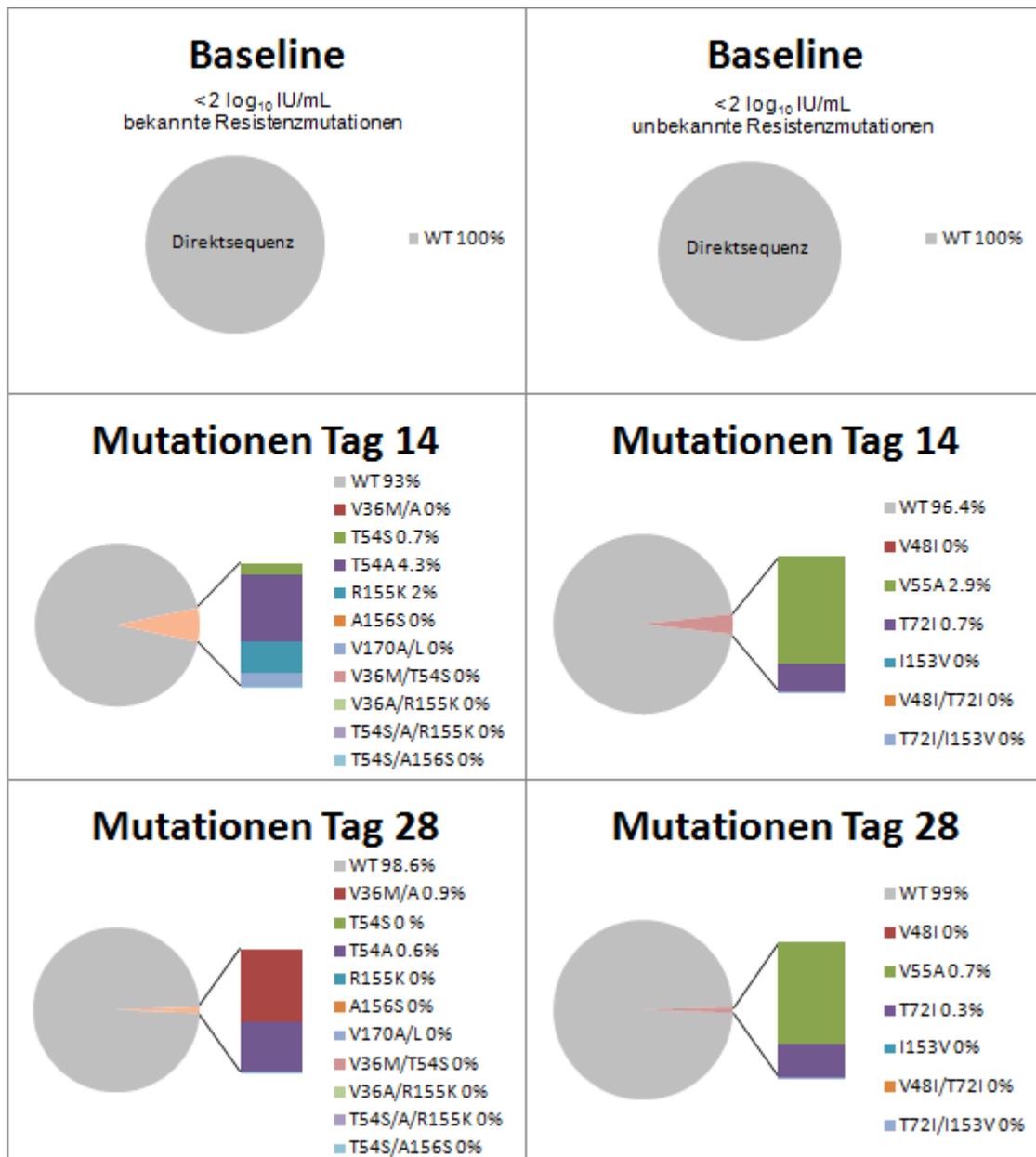


Abbildung 17: Verteilung der Mutationen bei Patienten mit maximalem HCV RNA Abfall  $< 2 \log_{10}$  IU/ml

In der Patientengruppe mit einem maximalen HCV RNA Abfall von  $< 2 \log_{10}$  beträgt der Anteil der bereits bekannten Mutationen am Ende der Therapie 7 % und der, der möglichen neuen Resistenzmutationen 4 % wobei beide am Ende der Verlaufsuntersuchungen auf 1 % gesunken sind ( $p > 0,2$  bzw.  $p = 0,06$ ). Abbildungen 16 und 17 zeigen die Verteilung der bekannten und bisher unbekanntes Mutationen für alle drei Zeitpunkte bei beiden Patientengruppen.

### 6.2.1.2 Verteilung der Mutationen bei Patienten mit Subtyp 1a bzw. 1b

Bei Patienten mit dem Subtyp 1a wurden zum Ende der Therapie weniger Varianten über 5 % Häufigkeit selektioniert als bei Patienten mit Subtyp 1b (siehe Abbildung 15). Zum Ende der Verlaufsbeobachtung geht die Anzahl der Mutationen nochmals stark zurück und liegt weit unter dem Niveau der Subtyp 1b Patienten.

Die Mutationen V36M und R155K/T kommen ausschließlich bei Subtyp 1a Patienten vor. Bei den Subtyp 1b Patienten wurden, mit Ausnahme eines Klons mit R155P bei einem Patienten, an Position 155 gar keine Mutationen detektiert, Bei den Mutationen V170A, T72I und V48I verhält es sich genau gegenteilig. Diese Mutationen waren ausschließlich bei Subtyp 1b Patienten nachweisbar. Beim Gesamtvorkommen der bekannten Resistenzmutationen, sind keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung innerhalb der verschiedenen Subtypen zu erkennen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Verteilung der Resistenzmutationen bei Patienten verschiedener Subtypen

Subtyp 1a (n=8)	Virologisches Ansprechen	Mutationen mit bekanntem Resistenzpotential
1	< 2log <sub>10</sub> Abfall	V55A 9%
2	< 2log <sub>10</sub> Abfall	T54S 3%, R155K 11%
3	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	-
4	< 2log <sub>10</sub> Abfall	V55A 3%, R155K 3%
5	< 2log <sub>10</sub> Abfall	-
6	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	V36A/M 9%, T54S/A 18%, V55A 2% R155K 2%, A156S 2%
7	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	V36M 4%, R155K 24%
8	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	V36A/M 7%, T54S/A 7%, V55A 2%, R155K/T 68%, A156S 2%
Subtyp 1b (n=14)	Virologisches Ansprechen	Mutationen mit bekanntem Resistenzpotential
9	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	T54A 1%, V170L 2%
10	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	V55A 7%, T54A 5%, V170A 5%
11	< 2log <sub>10</sub> Abfall	-
12	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	T54A 2%, V170A/L 11%
13	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	T54A 17%, V55A 6%, V170A 4%
14	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	-
15	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	-
16	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	-
17	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	V170A 4%
18	< 2log <sub>10</sub> Abfall	V55A 5%
19	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	-
20	< 2log <sub>10</sub> Abfall	T54S/A 33%, V55A 7%
21	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	T54A 21%, A156S 7%
22	≥ 2log <sub>10</sub> Abfall	T54A 2%

### 6.3 Phänotypische Resistenzanalyse

Um zu zeigen, ob die Mutationen an den Positionen 48, 55, 72 und 153 das Resistenzniveau der HCV NS3 Protease gegenüber Boceprevir erhöhen, wurde eine phänotypische Resistenzanalyse durchgeführt. Dafür wurden diese und die bereits bekannten Mutationen in das HCV Con-1b Replikon eingebaut. Anschließend wurde das Resistenzpotential

gegenüber Boceprevir (SCH503034) und Telaprevir (VX-950) durch Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Konzentrationen untersucht.

### 6.3.1 Einbau der Mutationen ins Replikon

Die Mutationen wurden mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit unter Verwendung der in Kapitel 4.7.1 angegebenen Mutageneseprimern in das Plasmid pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET eingebaut. Der korrekte Einbau der Nukleotide wurde anschließend durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs im NS3 Protease Gen bestätigt. Dies ist beispielhaft für T54A in Abbildung 18 gezeigt.

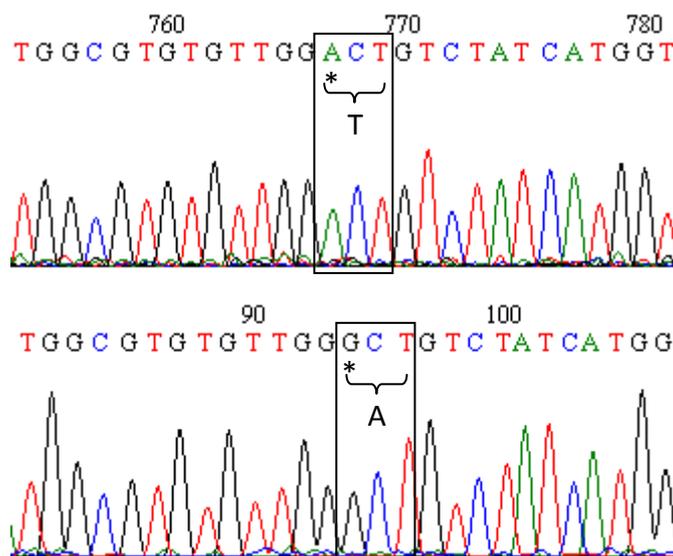


Abbildung 18: Wildtyp - T54A Mutation

Gezeigt ist ein Ausschnitt zweier Sequenzen des Plasmids pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET. Oben: Eine Wildtyp-Sequenz mit dem Codon ACT (Threonin) an Position 54 der NS3 Protease. Unten: Durch den Austausch von Adenosin gegen Guanosin ändert sich das Triplet zu GCT und kodiert nun für Alanin. Die Punktmutation ist durch \* gekennzeichnet.

Die Plasmide, die jetzt die Mutationen tragen, wurden nun durch einen Verdau mit *ScaI* an der entsprechenden Stelle geschnitten, um die Transkription zu ermöglichen. Zuvor mussten die Plasmide allerdings mit dem Restriktionsenzym *AseI* linearisiert werden, da das Enzym *ScaI* nur linearisierte DNA schneiden kann. Abbildung 19 zeigt beispielhaft das

Ergebnis des aufgereinigten doppelten Restriktionsverdaus von sieben Plasmiden pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET.

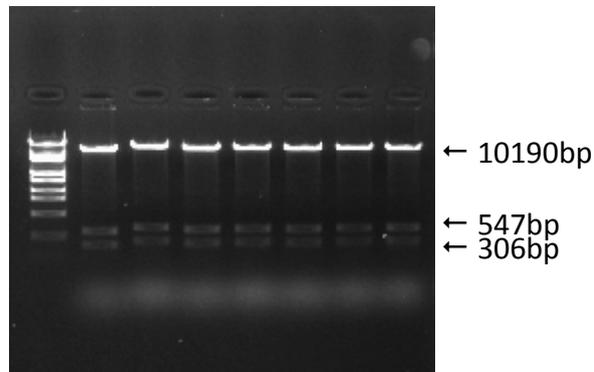


Abbildung 19: Kontrollgel des aufgereinigten AseI/ScaI-Verdaus

Die nun 10190 bp große lineare DNA ist nach einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung bereit für die Transkription durch eine T7-RNA-Polymerase, um die benötigte Replikon RNA zu erhalten.

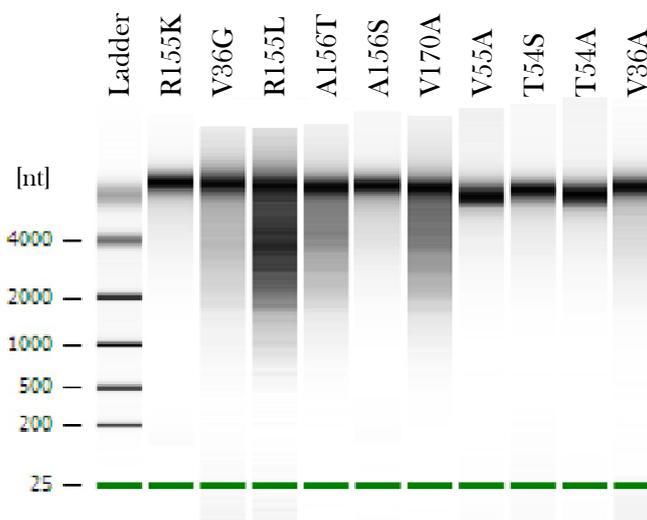


Abbildung 20: Qualitätskontrolle der transkribierten RNA

nt: Nukleotide. Die Größe der Replikon-RNA liegt bei ca. 8000 nt, was den Banden am oberen Ende des Messbereichs entspricht.

Die Qualität dieser transkribierten RNA wurde durch On-Chip Elektrophorese auf einem RNA Chip (RNA 6000 Nano Kit) im Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Mittels Elektroporation konnte die Replikon RNA nun in Huh-7 Lunet Zellen eingebracht werden. Zusätzlich zu den Mutationen beinhaltenden RNAs wurde immer auch eine Negativkontrolle elektroporiert. Diese besitzt eine Deletion im NS5B Gen und ist somit nicht in der Lage, selbstständig zu replizieren. Allein durch die Menge aufgenommener RNA in den Zellen direkt nach der Elektroporation, unabhängig von einer Replikation, ist eine Resistenz gegenüber Geneticin für eine gewisse Zeit gegeben. Das heißt, dass auch die Zellen, die die RNA mit der Deletion in NS5B aufgenommen haben eine gewisse Zeit überleben, da deren Phosphotransferasegen voll funktionsfähig ist. Erst wenn die initial eingeführte RNA größtenteils abgebaut wurde, ist die Resistenz allein davon abhängig, ob durch Replikation genügend neue RNA produziert wird. Da dies bei der Kontroll-RNA nicht der Fall sein konnte, starben diese Zellen dann ab. Je nach Höhe des Selektionsdruckes, in Form der G418-Konzentration im Medium, konnte nach zwei bis vier Wochen selbst replizierende Replikon RNA nachgewiesen werden, wenn die Kontrollzellen vollständig abgestorben waren, während sich die Zellen mit der Replikon RNA, die die Mutationen im NS3 Protease Gen enthielten, weiterhin vermehrten.

Die so erhaltenen Zellen wurden direkt für die weiteren Versuche verwendet, wobei ein Teil davon in 10 % DMSO-haltigem Medium eingefroren wurde und somit für spätere Versuche zur Verfügung stand.

### 6.3.2 Replikon IC<sub>50</sub>-Bestimmung

Die IC<sub>50</sub> Werte für die verschiedenen Mutationen und Proteaseinhibitoren wurden mit dem Con-1b Replikonassay bestimmt. Eine definierte Anzahl Huh-7 Lunet Zellen (20.000 Zellen/well auf 24 well-Platten; 200.000 Zellen/well auf 6 well-Platten) wurde auf Multiwellplatten ausgesät und für 24 Stunden in Zellkulturmedium ohne Geneticin kultiviert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Das Zellkulturmedium enthielt nun 250 µg/ml Geneticin und verschiedene Verdünnungen eines Proteaseinhibitors. Die verwendeten Konzentrationen für den jeweiligen Inhibitor sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Konzentrationen der Proteaseinhibitoren für den Replikonassay

SCH 503034	VX-950
0 $\mu\text{M}$	0 $\mu\text{M}$
0,15 $\mu\text{M}$	0,35 $\mu\text{M}$
1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
15 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$

Da beide Substanzen in DMSO gelöst vorlagen, wurde zu jedem Ansatz eine entsprechende Menge reines DMSO gegeben, um die Unterschiede in der Menge durch die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen auszugleichen. So konnten eventuell auftretende Effekte durch das für Zellen toxisch wirkende DMSO gleichverteilt werden. Somit sollte jede Minderung der Replikation des Replikons auf die Behandlung mit dem Proteaseinhibitor zurückzuführen sein.

Nach weiteren 48 Stunden wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer real time TaqMan PCR fand schließlich die HCV-spezifische Quantifizierung statt. Die  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  Methode lieferte die Werte für das Ausmaß der Replikation der Replikon RNA in den Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen eines Proteaseinhibitors behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese Werte wurden durch eine dreiparametrische Kurven-Fit Methode angepasst und daraus der 50 % inhibitorische Wert ( $\text{IC}_{50}$ ) ermittelt. Für jede Mutation wurden mehrere unabhängige Messungen durchgeführt und anschließend der Mittelwert aller verwertbaren  $\text{IC}_{50}$  Werte gebildet. So besteht jeder Wert aus mindestens zwei Messungen, mit Ausnahme der Werte für A156T, hier konnte nur eine erfolgreiche Messung durchgeführt werden.

Die Boceprevir Replikon  $\text{IC}_{50}$  Werte für die bekannten und die möglicherweise neuen Resistenzmutationen sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Austausch an Position 156 lieferten erwartungsgemäß die höchsten Resistenzen (18 - 125-fache Erhöhung des  $\text{IC}_{50}$ ) gegenüber der

Substanz. Die Mutationen an den Positionen 36, 54, 155 und 170 führten zu niedrigen bis mittleren Resistenzen (3,8 – 16-fache Erhöhung des  $IC_{50}$ ). Drei der vier neu entdeckten Varianten (V48I, T72I, I153V) zeigten keine deutliche Änderung des  $IC_{50}$  Wertes im Vergleich zum Wildtyp  $IC_{50}$  (0,8 – 1,8-fache Erhöhung des  $IC_{50}$ ). Der Austausch von Valin gegen Alanin an Position 55 zeigt dagegen eine deutliche Erhöhung des Resistenzniveaus im Replikon Modell (6,9-fach).

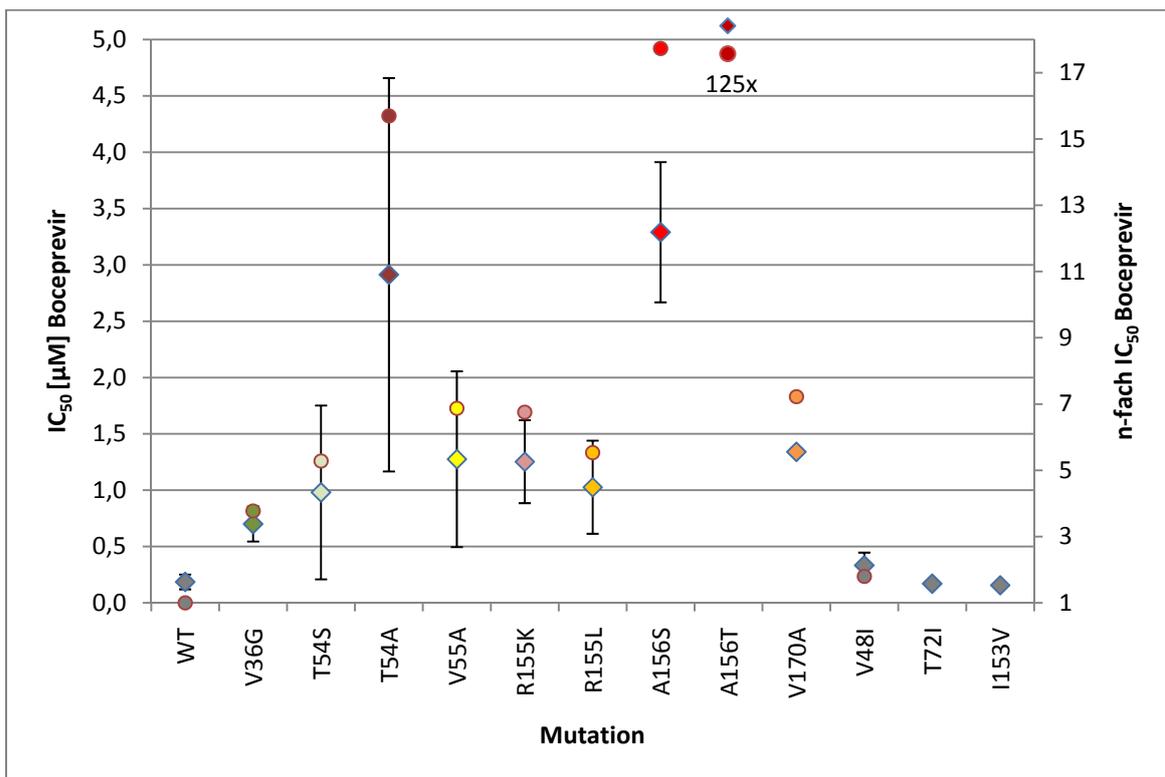


Abbildung 21: Boceprevir Replikon  $IC_{50}$  Phänotyp

Gezeigt ist der n-fache  $IC_{50}$  (Punkte) und die gemittelten Replikon  $IC_{50}$ -Werte (Karo) für den Wildtyp und die verschiedenen Mutationen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Ergebnisse für A156T liegen außerhalb der Grenzen der Abbildung und werden am oberen Ende des Diagramms mit den genauen Werten dargestellt.

Für drei der vier erstmals untersuchten Mutationen, konnte somit kein Resistenzpotential gegenüber Boceprevir nachgewiesen werden.

In einem mathematischen Modell wurde die relative *in vivo* Fitness der resistenten Varianten geschätzt. Die Fitness einer Variante ist ein Maß, für deren Fähigkeit *in vivo* zu replizieren. Die Schätzung basiert auf dem

Vorkommen der Mutationen, den phänotypischen Resistenzniveaus und der viralen Kinetik. Die so ermittelten Werte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Geschätzte relative Fitness Werte der resistenten Varianten

<b>Variante</b>	<b>Relative Fitness</b>
Wildtyp	1.000
A156S	0.001
R155K/P/T	0.500
T54A	0.143
T54S	0.182
V36M/A	0.499
V55A	0.356
V170A/L	0.229
T54S + A156S	0.502
T54S/A + R155K	0.531
V36A + R155K	0.677
V36M + T54S	0.522

Das Ausbilden von Resistenzmutationen kann die Effizienz der Replikation beeinträchtigen. In der vorliegenden Arbeit ist mit einem eigenen mathematischen Modell eine umgekehrte Korrelation zwischen der geschätzten Fitness und dem Resistenzpotential der einzelnen Varianten für Boceprevir nachweisbar (siehe Abbildung 22).

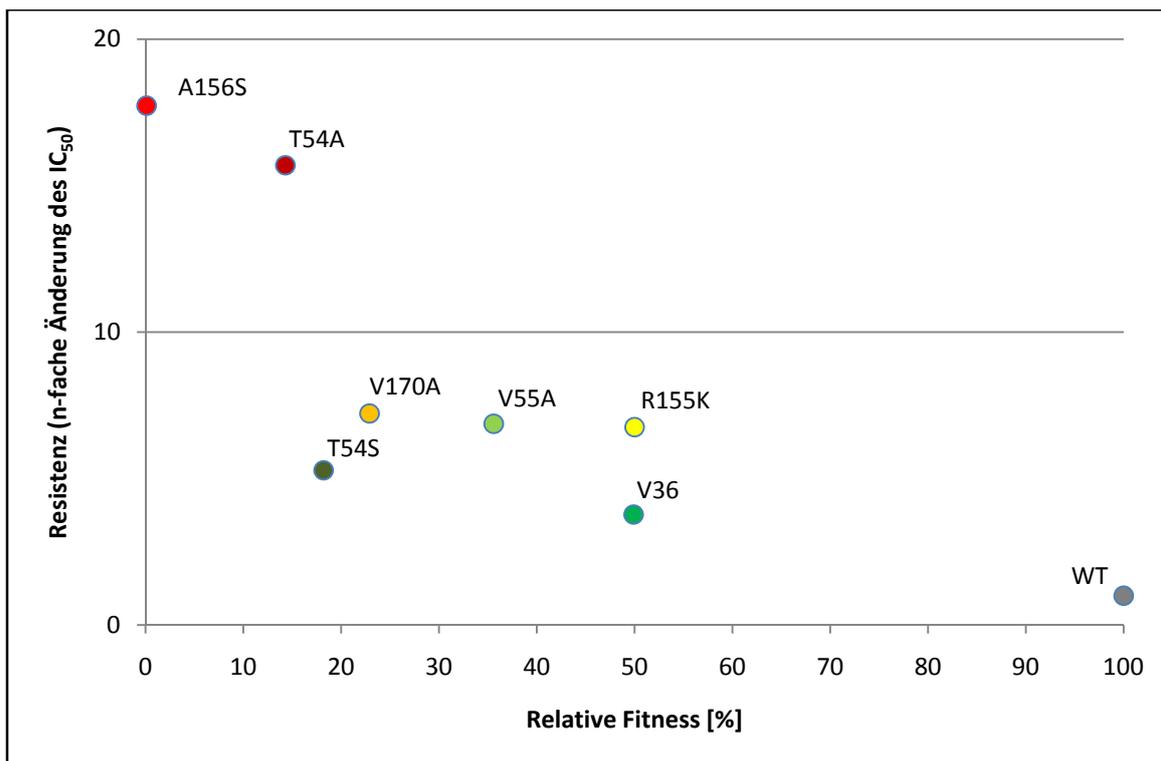


Abbildung 22: Relative Fitness der Boceprevir resistenten Varianten

Die Resistenz ist als n-fache Änderung des IC<sub>50</sub>-Wertes auf der y-Achse aufgetragen. Die relative Fitness wurde in einem multiplen viralen Kinetik Modell geschätzt (x-Achse).

Mutationen an Position A156 verleihen die größte Resistenz gegenüber den zwei getesteten Substanzen, gleichzeitig sind diese Varianten aber auch am meisten in ihrer Replikationsfähigkeit beeinträchtigt. Durch eine zweite, kompensatorisch wirkende Mutation, kann die Fitness erhöht werden (siehe Tabelle 8).

### 6.3.3 Neue Resistenzmutation

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Resistenzmutation für den Proteaseinhibitor Boceprevir detektiert (V55A). Im Replikon Assay *in vitro* konnte gezeigt werden, dass V55A eine 6,9-fache Erhöhung des IC<sub>50</sub> im Vergleich zur Wildtypsequenz bewirkt, was einem mittleren Resistenzlevel in Bezug auf Boceprevir entspricht. Das Resistenzpotential von V55A gegenüber Boceprevir wurde durch das Schering Plough Research Institute mit einem zweiten enzymbasierten IC<sub>50</sub> Assay für die NS3 Protease bestätigt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Enzym  $IC_{50}$  von V55A im Vergleich zum Wildtyp

	Wildtyp (WT)	Mittel V55A ± Standardabweichung	V55A/WT
	Ki* [nM]	Ki* [nM]	
<b>Boceprevir</b>	19	80 ± 18	4,2 ± 0,96
<b>Telaprevir</b>	21	58 ± 7	2,7 ± 0,33

Im Rahmen einer Kooperation wurde am Max Planck Institut für Informatik in Saarbrücken (Dr. Welsch) eine *in silico* Analyse durchgeführt. Hierbei konnte auf molekularer Ebene die verminderte Bindungsaffinität des Boceprevirs durch die V55A Mutation erklärt werden (siehe Diskussion).

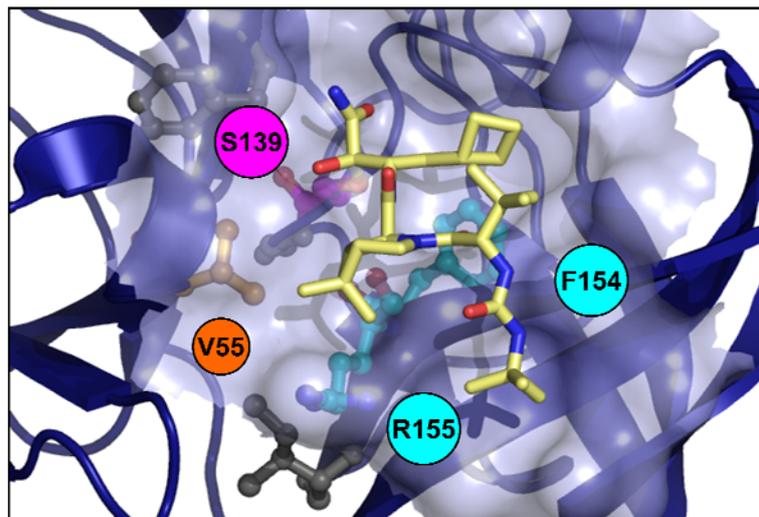


Abbildung 23: SCH503034 am aktiven Zentrum der NS3 Protease

Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 23 die Lage eines Moleküls Boceprevir (SCH503034), welches am aktiven Zentrum der HCV NS3 Protease (Bändermodell) gebunden ist, als Drahtmodell dargestellt. Zusätzlich sind wichtige Aminosäurepositionen gekennzeichnet.

### 6.3.4 Kreuzresistenzen

Alle Mutationen, die auf ihre Resistenz gegenüber Boceprevir (BOC) untersucht wurden, sind auch auf ihr Verhalten gegenüber Telaprevir (TVR) getestet worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zu sehen.

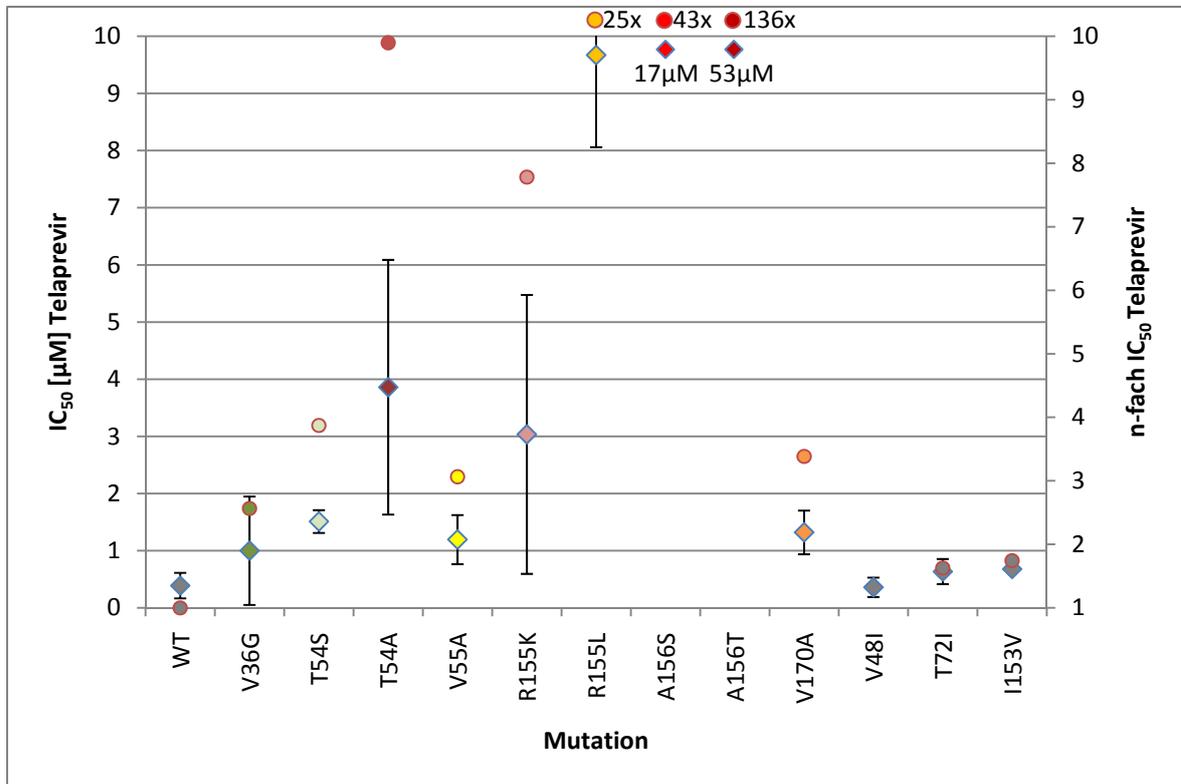


Abbildung 24: Telaprevir Replikon IC<sub>50</sub> Phänotyp

Gezeigt ist der n-fache IC<sub>50</sub> (Punkte) und die Replikon IC<sub>50</sub>-Werte (Karus) für den Wildtyp und die verschiedenen Mutationen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Ergebnisse für A156S, A156T und der n-fache IC<sub>50</sub> für R155L sind außerhalb der Grenzen der Abbildungen und werden am oberen Ende des Diagramms mit den genauen Werten dargestellt.

Für Mutationen an den Positionen V36, T54, R155 und A156 konnte die von Sarrazin (2007b) und Welsch (2008) bereits berichtete Resistenz gegenüber Telaprevir bestätigt werden. Zusätzlich konnte eine Kreuzresistenz zu Telaprevir für Mutationen an Position V170 und für die neu charakterisierte Mutation V55A gezeigt werden. Ein direkter Vergleich der Erhöhung der IC<sub>50</sub> Werte im Vergleich zum Wildtyp für beide Substanzen ist in Abbildung 25 dargestellt.

Die Rangkorrelation zwischen den  $IC_{50}$ -Werten für beide Substanzen beträgt  $r = 0,82$  ( $p = 0,002$ ).

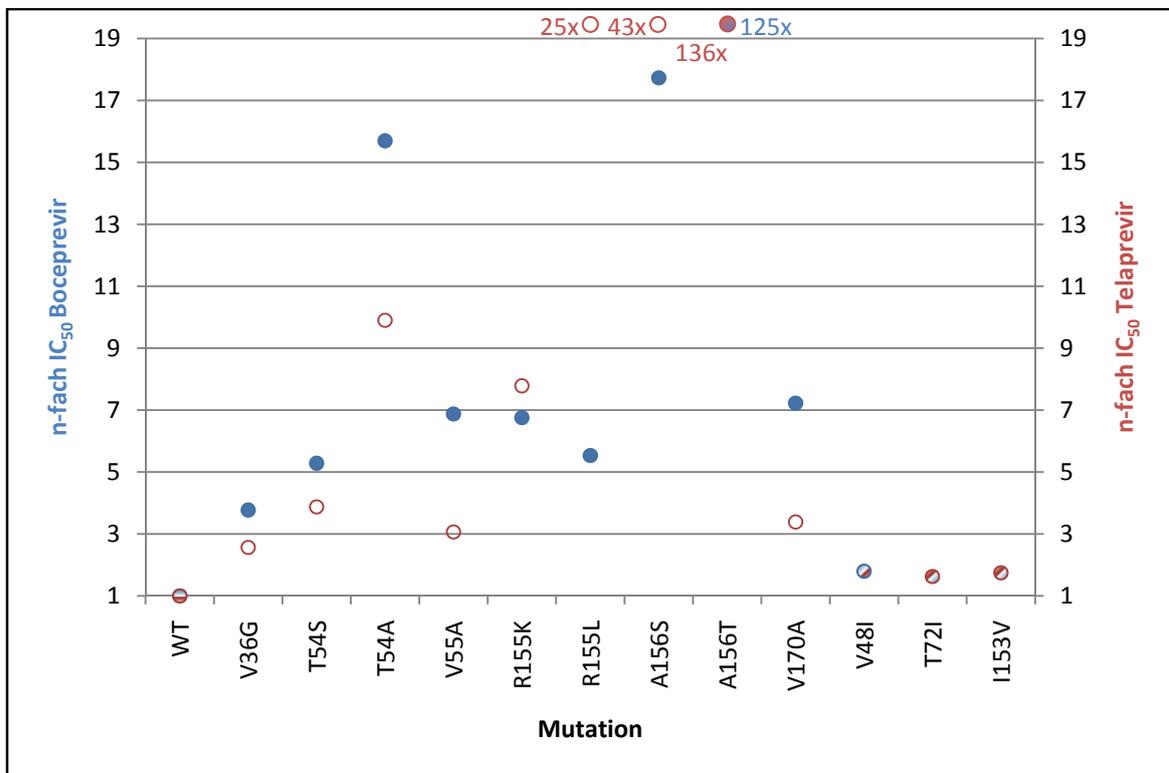


Abbildung 25: Vergleich der n-fachen  $IC_{50}$  Änderung bei Boceprevir und Telaprevir

Die blauen ausgefüllten Punkte zeigen die n-fache Erhöhung der  $IC_{50}$  Werte im Vergleich zum WT für Boceprevir (BOC) und die unausgefüllten roten Punkte zeigen die entsprechenden  $IC_{50}$  Werte für Telaprevir (TVR). Für den WT und A156T repräsentiert ein Punkt mit beiden Farben die Werte für beide Inhibitoren. Die Ergebnisse für R155L (TVR), A156S (TVR) und A156T (BOC/TVR) liegen außerhalb des darstellbaren Bereichs und sind deshalb mit dem genauen Wert am oberen Rand des Diagramms positioniert. Die Werte für V48I, T72I und I153V überlagern sich für beide Substanzen und sind deshalb als zweifarbiger Punkt dargestellt.

V48I, T72I und I153V unterschieden sich auch hier nicht signifikant vom Wildtyp. Es ist zu erkennen, dass die Mutationen V36G, T54S, T54A, V55A, A156T und V170A eine höhere Resistenz gegenüber Boceprevir verleihen, wohingegen die Mutationen R155K, R155L und A156S das höchste Resistenzniveau bei der Behandlung mit Telaprevir aufweisen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass durch Schwankungen beim Replikonassay ein Fehler von ungefähr 2x angenommen wird. Eine

eindeutige Aussage bei Unterschieden, die weniger als 2x sind, kann also nicht getroffen werden. Die Tendenz der gemessenen  $IC_{50}$ -Werte war jedoch bei allen Messungen erkennbar. Die größten Unterschiede im Vergleich der beiden Substanzen, die mehr als doppelt so groß waren und somit eindeutig zu interpretieren sind, treten hier bei folgenden Varianten auf:

- V55A → 6,9x  $IC_{50}$  BOC vs. 3,1x  $IC_{50}$  TVR
- R155L → 5,5x  $IC_{50}$  BOC vs. 24,8x  $IC_{50}$  TVR
- A156S → 17,7x  $IC_{50}$  BOC vs. 43,3x  $IC_{50}$  TVR
- V170A → 7,2x  $IC_{50}$  BOC vs. 3,4x  $IC_{50}$  TVR

## 7 Diskussion

Durch die Entwicklung direkt antiviral wirkender Substanzen werden die Möglichkeiten zur Behandlung der Hepatitis C Virus Infektion in naher Zukunft voraussichtlich deutlich verbessert werden (McHutchison et al., 2009; Manns et al., 2009; Kwo et al., 2009; Hezode et al., 2009). Eine der direkt antiviralen Substanzen, die sich gegenwärtig in der klinischen Entwicklung befinden, ist der HCV NS3 Proteaseinhibitor Boceprevir. Ebenso wie Telaprevir, ein weiterer HCV NS3 Proteaseinhibitor, wird Boceprevir momentan in klinischen Phase 3 Studien untersucht. Auf der Grundlage der laufenden Phase 3 Studien und der vorliegenden Ergebnisse der Phase 2 Studien ist in naher Zukunft (ca. 2010/2011) mit der Zulassung einer neuen Standardtherapie für die Behandlung der chronischen HCV Infektion mit den Proteaseinhibitoren Boceprevir bzw. Telaprevir in Kombination mit PEG-IFN $\alpha$  und Ribavirin bei Patienten mit einer HCV Genotyp 1 Infektion zu rechnen. Es gibt bereits Therapien gegen andere Viren, wie z. B. HIV oder HBV, bei denen direkt antivirale Substanzen zum Einsatz kommen. Hier hat sich gezeigt, dass unter Therapie resistente Varianten des Virus selektioniert werden können, die klinisch mit einem Wirkungsverlust der Behandlung assoziiert sind. Mit derselben Problematik ist auch bei der Behandlung der HCV Infektion mit direkt antiviralen Substanzen wie den NS3 Proteaseinhibitoren zu rechnen. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal das Resistenzprofil von Boceprevir auf der Grundlage von Patienten, die im Rahmen einer Phase 1 Studie mit einer Monotherapie behandelt wurden, genauer untersucht.

### 7.1 Genotypische Resistenzanalyse

In einer 14-tägigen, randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Phase 1 Studie wurden 22 Patienten mit dem Proteaseinhibitor Boceprevir (400 mg zwei- oder dreimal täglich) in einer Monotherapie behandelt. Diese Patienten zeigten vorher kein Ansprechen auf die Standardtherapie mit PEG-IFN $\alpha$  und Ribavirin. Die Behandlung

mit Boceprevir führte in der untersuchten Patientengruppe zu maximalen Viruslastabfällen von 1,5 bis 3,4 log<sub>10</sub> Stufen. Dieses unterschiedliche virologische Ansprechen kann durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Zum Beispiel findet man unterschiedlich hohe Wirkspiegel des Medikaments im Blut der Patienten. Eine verminderte Aufnahme, rascherer Abbau oder eine beschleunigte Dissoziation der Substanz kann die Wirkung negativ beeinflussen. In einer 14-tägigen Studie, in der Patienten Telaprevir als Monotherapie verabreicht bekamen, konnte gezeigt werden, dass die niedrigsten Wirkspiegel des Medikaments bei den Patienten zu finden war, welche noch unter Therapie einen viralen Durchbruch (Breakthrough) zu verzeichnen hatten. Patienten, die einen signifikant höheren Wirkspiegel von Telaprevir aufbauen konnten, zählten zu der Gruppe mit einem kontinuierlichen HCV RNA Abfall unter Therapie. Bei mittleren Konzentrationen des Medikaments im Blut der Patienten war schließlich eine sogenannte Plateauphase der HCV RNA Konzentration zu erkennen, in der die Viruslast nach anfänglichem starken Abfall nach ca. drei Tagen Behandlung weniger stark sank, ohne aber unter Therapie wieder anzusteigen (Sarrazin et al., 2007b). Eine solche Korrelation des Virusabfalls mit den Talwirkspiegeln von Boceprevir war in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die fehlende Konzentrationsbestimmung des Medikaments im Lebergewebe sein. Diese könnte sich von der Konzentration im Blut unterscheiden, die Wirkspiegel in den Leberzellen sind aber letztlich verantwortlich für die Effektivität der Behandlung.

Zudem kann das Immunsystem der einzelnen Patienten individuell verschieden effektiv sein. Die NS3/4A Protease kann zur Hemmung des angeborenen Immunsystems beitragen, indem sie zwei wichtige Faktoren der Signalkaskaden der Immunantwort spaltet (TRIF, CARDIF; siehe Kapitel 2.3.4). Daten von klinischen Studien mit HCV NS3 Proteaseinhibitoren liegen hierzu noch nicht vor, aber *in vitro* zeigte sich, dass die gehemmte Aktivität der angeborenen Immunität durch die NS3/4A Protease durch Proteaseinhibitoren wiederhergestellt werden kann. Eine unterschiedliche Effektivität bei der Behandlung von Patienten

mit Proteaseinhibitoren kann also auch daraus resultieren, dass die Patienten im Bereich der Proteine der Signaltransduktionskaskaden der angeborenen Immunität verschiedene genetische Polymorphismen aufweisen.

Für eine Korrelation der verschiedenen antiviralen Effektivitäten mit der Selektion oder dem Verteilungsmuster von Resistenzmutationen, wurden die Patienten zur weiteren Auswertung in zwei Gruppen mit und ohne einen minimalen Abfall der HCV RNA Konzentration um  $2 \log_{10}$  IU/ml aufgeteilt. Ein starker Abfall der HCV RNA reflektiert einen großen selektiven Druck auf das Virus und damit eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Selektion von höher resistenten Varianten sowie im Verlauf von kompensatorischen Mutationen, die eine Steigerung der Replikationseffektivität der typischerweise hoch replikationsdefizienten hoch-resistenten Varianten ermöglichen. Minimale oder niedrige Abfälle der HCV RNA Konzentration unter der Therapie mit Boceprevir dagegen könnten zur Selektion von niedrig resistenten Varianten führen, deren Replikationseffizienz entsprechend gering eingeschränkt ist und bei denen sich damit die Wahrscheinlichkeit einer Langzeitpersistenz erhöht.

Am Ende der Therapie konnte eine Vielzahl von Varianten nachgewiesen werden. An insgesamt 31 Positionen innerhalb der 181 Aminosäuren der NS3 Proteaseregion konnten Mutationen mit einer Frequenz über 5 % im Vergleich zur Baseline der jeweiligen Patienten beobachtet werden. Davon konnten 19 Mutationen bei mehr als einem Patienten gefunden werden. Dazu gab es an weiteren 20 Positionen Mutationen über 5 %, welche an dieser Stelle die Prototyp-Wildtypsequenz des entsprechenden Subtyps repräsentierten. Diese Austausche wurden nicht näher untersucht, da davon ausgegangen werden kann, dass sie vermutlich nicht zur Erhöhung des Resistenzniveaus beitragen, sondern nur eine Variante des Wildtyps wiederherstellen. Eventuell trägt dieses Phänomen zur Verbesserung der Replikationsfähigkeit bei, indem eine individuell auf das jeweilige Isolat abgestimmte, die Replikationseffizienz optimierende Sequenz selektioniert wird. Das Genom des Hepatitis C Virus zeigt also eine enorme Variabilität,

welche durch einen erhöhten Selektionsdruck, den die Einnahme eines direkt antiviralen Medikaments darstellt, noch erhöht wird.

In bisherigen genotypischen Analysen dieser Studie konnte mittels Direktsequenzierung der HCV Quasispezies nur in einem Patienten eine Mutation an Position V170 nachgewiesen werden (Zeuzem et al., 2005). Die fehlende Sensitivität dieser Sequenzierungsmethode ist eine Erklärung hierfür. Kommt eine Mutation in weniger als 25 % der direkt sequenzierten Quasispeziesvarianten vor, kann man den Austausch eines Nukleotids nur schwer bis gar nicht erkennen. Versuche im Replikonsystem, in dem die Zellen immer höheren Konzentrationen von SCH503034 ausgesetzt wurden (Tong et al., 2006), zeigten die Selektion der Mutationen T54A, A156S/T und V170A. Der fehlende Einfluss des menschlichen Immunsystems könnte ein Grund für die limitierte Anzahl der *in vitro* selektionierbaren Mutationen sein. Eventuell ist diese Methode auch nicht dafür geeignet, Mutationen mit geringem Resistenzniveau zu selektionieren, da mit zu hohen Konzentrationen des Inhibitors gearbeitet wurde. T54A und A156S konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch *in vivo* gefunden werden. V36M/A, T54S und R155K waren bisher nur als Resistenzmutationen gegenüber dem Proteaseinhibitor Telaprevir bekannt (Sarrazin et al., 2007b) und wurden hier erstmals für Boceprevir beschrieben.

Zudem ist nur mit einer klonalen Analyse die exakte Kopplung bestimmter Mutationen untereinander nachweisbar. Damit kann offensichtlich durch eine klonale Analyse eine wesentlich sensitivere als auch differenziertere Charakterisierung der Resistenzmutationen innerhalb der HCV Quasispezies im Vergleich zur Methode der Direktsequenzierung erfolgen. Alternative Methoden zur Detektion und Quantifizierung von Resistenzmutationen sind z. B. TaqMAMA (TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay) (Curry et al., 2008) oder Next Generation Sequencing (Pyrosequenzing etc.). Doch auch mit diesen Methoden kann keine Aussage über die Kopplung von Mutationen getroffen werden. Beim Next Generation Sequencing muss die zu untersuchende DNA, je nach System (454 Sequencing, Roche; SOLiD System, Applied Biosystems;

Genome Analyser, Illumina), in Längen von 30 – 450 bp vorliegen. Die 543 bp große Sequenz des NS3 Proteasegens muss also in kleinere Abschnitte fragmentiert werden, was eine Kopplungsanalyse unmöglich macht. Durch das Verwenden spezifischer Primer, deren Sequenz die zu analysierende Mutation beinhaltet, fallen mit dem TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay neue, bisher noch nicht beschriebene Mutationen nicht auf. Es kann immer nur auf eine einzige definierte Mutation untersucht werden. Das gemeinsame Vorkommen zweier oder mehrerer Mutationen auf einem Isolat ist durch diese Methode ebenfalls nicht möglich. Der Vorteil der beiden Alternativmethoden ist deren erheblich höhere Sensitivität, wodurch Mutationen, die in weniger als 1 % der Quasispezies vorkommen, noch sicher detektiert werden können.

Alle nachgewiesenen Resistenzmutationen traten am Ende der Therapie gehäuft auf. Zwei Wochen nach dem Ende der Therapie nahm das Vorkommen dieser Varianten wieder deutlich ab. Aufgrund der hohen Sensitivität der klonalen Analyse war ein Nachweis im Verlauf noch weiterhin möglich. Der Vergleich wurde mit den Sequenzierungsergebnissen zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn durchgeführt. Hier wurde bei einigen Patienten lediglich eine Direktsequenzierung durchgeführt, da das Vorkommen von resistenten Varianten nicht zu erwarten ist. In einer kleineren Studie fanden sich keine resistenten Varianten bei einer klonalen Analyse vor einer Therapie mit Telaprevir (Sarrazin, Gastro 2007) und in einer Studie an einem großen Patientenkollektiv konnten mit einer Direktsequenzierung in < 1 % der Fälle bekannte resistente Varianten nachgewiesen werden (Bartels et al., 2008).

Neben den oben beschriebenen Varianten konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Varianten charakterisiert werden, die im Verlauf das gleiche Verhalten wie die bereits erwähnten bekannten Resistenzmutationen zeigten, d.h. ein Vorkommen mit einer Frequenz von über 5 % in der HCV Quasispezies am Ende der Therapie und eine Abnahme im Verlauf zur Untersuchung zwei Wochen nach Therapieende. Auf dieser Grundlage wurden vier weitere Mutationen (V48I, V55A, T72I und I153V) für eine

phänotypische Charakterisierung ihrer möglichen Resistenz gegenüber Boceprevir ausgewählt, die zusätzlich bei mehr als einem Patienten vorkamen, wodurch die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Auftretens weiter reduziert wurde.

Grundsätzlich stellt sich aufgrund der hohen Heterogenität der NS3 Proteasesequenz sowie der Vielzahl an selektionierten Varianten unter der Therapie mit Boceprevir die Frage nach einer geeigneten Methode zur Differenzierung von relevanten Resistenzmutationen von Wildtyp Varianten. Bei der Untersuchung des Resistenzprofils von Telaprevir wurde ebenfalls eine Vielzahl von Varianten selektioniert ( $n = 25$ ), welche am Ende der Therapie einen Anstieg der Frequenz von mindestens 5 % im Vergleich zur Baseline aufwiesen. Auch hier wurden zusätzliche Bedingungen an die Auswahl der näher zu untersuchenden Mutationen gestellt. So mussten sie in mindestens 5 % der Klone und in mindestens zwei Patienten nachzuweisen sein (Sarrazin et al., 2007b). Durch eine auf Selektionsdruck basierte Methode haben Qiu et al. (2009) eine weitere Resistenzmutation für Boceprevir gefunden (V158I), doch auch hier wurden Einschränkungen getroffen, indem nur Mutationen mit einer Frequenz über 1 % ausgewertet wurden.

Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Resistenzmutationen fällt auf, dass das Vorkommen mancher Varianten auf einen Subtyp beschränkt ist. So findet man V170A ausschließlich bei GT1b Patienten, was sich dadurch erklären lässt, dass die GT1a Virenstämme an Position 170 als Wildtyp-Aminosäure Isoleucin und nicht Valin besitzen. Ein Austausch von Isoleucin zu Alanin wurde nicht beobachtet. Isoleucin wird durch ATC bzw. ATA kodiert, Alanin durch GCA bzw. durch GCC. Eine Mutation I170A würde also den Austausch von mindestens zwei Nukleotiden voraussetzen, was als sehr unwahrscheinlich einzustufen ist und unter einer Therapie mit Boceprevir oder Telaprevir bisher nicht beobachtet wurde. Häufig jedoch trat zu einem geringen Prozentsatz Valin an die Stelle des Isoleucins. Ein ähnliches Bild findet man bei den Mutationen V36M, R155K und R155T, welche nur bei GT1a Patienten gefunden wurden. Die Restriktion auf den 1a Subtyp lässt sich auch dadurch

erklären, dass diese Mutationen die Änderung von zwei Nukleotiden benötigen, um in GT1b Isolaten entstehen zu können, während bei GT1a Sequenzen der Austausch eines einzigen Nukleotids ausreicht. Die höhere genetische Barriere verhindert also die Entstehung dieser Resistenzmutationen bei Patienten, die mit einem Virus des Subtyps 1b infiziert sind. V36A trat ebenfalls nur bei GT1a Patienten auf, jedoch kann dieses Phänomen nicht durch eine hohe genetische Barriere erklärt werden, da im Falle beider Subtypen der Austausch eines Nukleotids genügen würde, um die Mutation zu generieren. Hier müssen andere Faktoren eine Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass V36A die Fitness einer Variante mit einer Subtyp 1b Hintergrundsequenz (Backbone) so sehr herabsetzen würde, dass die relativ geringe Steigerung des Resistenzniveaus diesen Austausch nicht ausreichend kompensiert. Erste Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit V36A im Con-1b Replikon (Genotyp 1b) bestätigen eine entsprechend deutlich verschlechterte Fitness allerdings nicht. Zwei weitere Subtyp-abhängige Varianten sind V48I und T72I. Sie findet man nur in GT1b Patienten, da, ähnlich wie an Position 170, im GT1a Isolat jeweils Isoleucin bereits die Wildtyp-Aminosäure darstellt. Auch bei anderen HCV NS3 Proteaseinhibitoren wurde eine Restriktion der Selektion bestimmter Mutationen auf bestimmte Subtypen beobachtet (Sarrazin et al., 2007b; Sarrazin et al., 2009a).

Wie eingangs erwähnt, sind nicht nur die bekannten Resistenzmutationen zu finden, sondern auch eine Reihe bisher nicht beschriebener Varianten. Betrachtet man das Vorkommen dieser Varianten, so ist kein durchgängiges Muster erkennbar. In Abbildung 15 sieht man, dass am Ende der Therapie bei den meisten Patienten maximal sechs verschiedene Mutationen über 5 % vorkommen. Die Ausnahme bilden drei Patienten mit Subtyp 1b, bei denen 10, 12 bzw. 20 verschiedene Varianten mit einer Frequenz über 5 % zu finden sind. Dabei sind bei zwei Patienten keine Resistenzmutationen nachzuweisen, während 23 % der untersuchten Quasispezies des dritten Patienten resistente Varianten darstellen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl vorkommender Mutationen

und deren Resistenzpotential ist also nicht zu erkennen. Auch unter der Therapie mit Telaprevir und anderen Proteaseinhibitoren (z. B. ITMN-191) sind zahlreiche Varianten in niedriger Frequenz bzw. bei einzelnen Patienten selektioniert worden, deren Bedeutung bisher nicht bekannt ist. Hier sind weitere vergleichende genotypische Untersuchungen sowie auch eine Ausweitung der phänotypischen Charakterisierung unter Einschluss weiterer detektierter Mutationen, als auch auf der Grundlage des gesamten Sequenzhintergrundes (Backbone) des entsprechenden Isolates, notwendig.

### 7.1.1 Korrelation von Viruslast und Mutationen mit dem Plasmaspiegel

Beim Betrachten des Vorkommens der Mutationen in Relation zur Medikamentenkonzentration im Plasma (Abbildung 15), fällt auf, dass sich im Fall der höchsten mittleren Konzentration von 339 ng/ml (GT1a) eine hohe Anzahl verschiedener Resistenzmutationen gebildet hat. Der Patient (GT1b) mit dem zweithöchsten mittleren Plasmaspiegel (236 ng/ml) entwickelte die meisten Varianten über 5 % am Ende der Therapie, jedoch befindet sich darunter keine einzige bekannte Resistenzmutation. Bei allen weiteren Patienten mit mittleren bis hohen Plasmaspiegeln (> 100 ng/ml) zeigt sich ein heterogenes Bild. Man findet zwischen null und zwölf verschiedene Varianten über 5 % zu Therapieende. Die Patienten zeigen sowohl einen hohen ( $\geq 2\log_{10}$  IU/ml) als auch einen geringen ( $< 2\log_{10}$  IU/ml) HCV RNA-Abfall. Ein ähnliches Bild findet sich bei Patienten mit niedrigen Plasmaspiegeln (< 100 ng/ml). Hier finden sich zwischen null und sechs verschiedene Mutationen über 5 % an Tag 14 und die Verteilung der Patienten erstreckt sich ebenfalls über beide virologischen Ansprechgruppen. Die bereits oben erwähnten drei Patienten (alle GT1b) mit auffällig hoher Anzahl an Varianten am Ende der Therapie gehören allesamt zur Gruppe mit hohem HCV RNA-Abfall. Hier führt der hohe Selektionsdruck, wie vermutet, offensichtlich dazu, dass resistente Varianten selektioniert werden, um eine persistierende Replikation des Virus zu ermöglichen. Ansonsten sind keine ersichtlichen

Zusammenhänge von Viruslast oder entstehenden Mutationen und den Plasmaspiegeln zu erkennen und insgesamt findet sich keine eindeutige Korrelation der Selektion von resistenten Varianten mit den Boceprevirplasmaspiegeln.

Bei Patienten, welche eine 14-tägige Telaprevir Monotherapie erhielten, zeigte eine klonale Analyse der Quasispezies, dass weit mehr als die Hälfte aller untersuchten Varianten zum Ende der Therapie eine Resistenzmutation aufweisen. Bei drei Patienten konnten sogar in 100 % der Varianten Resistenzmutationen nachgewiesen werden (Sarrazin et al., 2007b). Bei der vorliegenden Studie mit Boceprevir, sind insgesamt nur in 14,1 % der Klone Resistenzmutationen zu finden. Betrachtet man die Patientengruppe mit größerem HCV RNA Abfall alleine, so finden sich 18,2 % resistente Varianten. Diese insgesamt seltenere Selektion resistenter Varianten könnte ein Grund für die fehlende Korrelation dieser Selektion mit den Boceprevirplasmaspiegeln sein.

In der aktuellen Phase 3 Zulassungsstudie wird Boceprevir, mit dreimal täglich 800 mg, nun erheblich höher dosiert als in dieser Phase 1 Studie. Die relativ geringe Dosis von zwei- oder dreimal täglich 400 mg Boceprevir könnte somit auch dazu beigetragen haben, dass nur eine relativ geringe Anzahl an gesicherten resistenten Varianten zusammen mit einer Vielzahl unklarer Varianten aufgetreten ist.

Die Bedeutung des Großteils der gefundenen Varianten ist bisher noch unklar. Es ist durchaus denkbar, dass ein Teil der Varianten zufällig auf einem Isolat mit einer Resistenzmutation vorhanden war und so in der Frequenz zusammen mit der Resistenzmutation zugenommen hat. Allerdings ist ebenfalls wahrscheinlich, dass ein Teil der Varianten durchaus, vermutlich auf niedrigem Level, eine Resistenz gegenüber Boceprevir verursacht bzw. zusammen mit anderen Varianten die Replikationsfähigkeit verbessert. Insbesondere Varianten, die nur ein geringes Resistenzniveau aufweisen, aber dabei gleichzeitig eine hohe Replikationsfähigkeit besitzen, haben ein relativ hohes Potential im Langzeitverlauf zu persistieren. Hier sind weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren und Dosierungen zu verschiedenen

Zeitpunkten vor, unter und nach Therapie und im Langzeitverlauf notwendig.

### 7.1.2 Korrelation von Mutationen und virologischem Ansprechen

Die unterschiedliche Selektion verschiedener Varianten bei Subtyp 1a oder 1b Patienten, welche zuvor schon für Telaprevir beschrieben wurde (Kieffer et al., 2007; Sarrazin et al., 2007b), konnte im Rahmen dieser Arbeit für Boceprevir *in vivo* bestätigt werden. Bei der Häufigkeit des Vorkommens dieser spezifischen Resistenzmutationen sind allerdings große Unterschiede festzustellen, vergleicht man die klinischen Monotherapiestudien von Telaprevir und Boceprevir. Diese Unterschiede könnten durch Differenzen des Bindungsprofils, der antiviralen Aktivität oder der genetischen Barriere der beiden Substanzen bzw. durch nicht vergleichbare Dosierungen erklärt werden. Unterschiede durch die verschiedenen Patientenpopulationen sind ebenfalls denkbar. Bei zuvor unbehandelten und bereits behandelten Patienten, welche Telaprevir in den folgenden Dosierungen verabreicht bekamen; 450 mg alle acht Stunden, 750 mg alle acht Stunden oder 1250 mg alle 12 Stunden, zeigten durchschnittlich etwa 90 % der sequenzierten Klone von Proben vom Ende der Therapie resistente Varianten (Sarrazin et al., 2007b). In dieser Studie mit Interferon Non-Responder Patienten, die Boceprevir als Monotherapie mit Dosen von 400 mg zwei- oder dreimal täglich verabreicht bekamen, zeigen 85,9 % der Klone die Wildtyp-Sequenz der NS3 Protease am Ende der Therapie. Außerdem ist die Frequenz der bekannten und der potentiellen neuen resistenten Varianten mit dem Viruslast-Abfall verknüpft. Bei Patienten mit einem maximalen HCV RNA Abfall von mindestens 2 log<sub>10</sub> Stufen konnten Resistenzmutationen in 18 % der Varianten am Ende der Therapie nachgewiesen werden. Zum Ende der Verlaufsbeobachtung sinkt die Anzahl auf 6 %. Die Häufigkeit der vier neu untersuchten Varianten sinkt von 15 % zu EOT auf 10 % beim Follow-Up.

Bei Patienten mit geringerem HCV RNA Abfall sind die resistenten Varianten nur in 7 % der Klone vom Ende der Therapie vertreten, während die neuen Mutationen in 4 % zu finden sind. Das Vorkommen beider geht bis zum Ende der Verlaufsbeobachtung auf 1 % zurück. Die Verteilung der Mutationen ist in den Abbildungen 16 und 17 graphisch dargestellt. Die Variante A156S, deren Resistenzniveau im oberen mittleren Bereich anzusiedeln ist, zeigte sich ausschließlich bei Patienten mit einem Abfall der HCV RNA Konzentration von  $\geq 2\log_{10}$  IU/ml. Interessanterweise konnte die Variante mit dem höchsten Resistenzniveau, A156T, welche zugleich den niedrigsten Fitnesswert zeigt, in keinem der mit 400 mg Boceprevir (zwei- oder dreimal täglich) behandelten Patienten nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der mittlere Viruslast Abfall in dieser Studie (durchschnittlich 2,1  $\log_{10}$ -Stufen HCV RNA Abfall in der 400 mg TID Gruppe) geringer ist als der in der Phase 1b Monotherapie Studie für verschiedene Dosen von Telaprevir (mittlerer Abfall von 4,4  $\log_{10}$ -Stufen bei 750 mg TVR dreimal täglich) (Reesink et al., 2006; Zeuzem et al., 2005). Vermutlich kommt es daher aufgrund niedriger Boceprevirdosierungen und somit niedriger Konzentrationen in der Leber nicht zu einer Selektion hochresistenter Varianten, die bekanntermaßen zwar in Gegenwart hoher Boceprevirdosen noch replikationsfähig sind, aber eine sehr schlechte Replikationseffektivität aufweisen und somit ausschließlich bei sehr hoher antiviraler Aktivität selektioniert werden. Die geringere antivirale Aktivität des Boceprevir in der vorliegenden Studie mit einer zwei- bis dreimal täglichen Dosierung mit 400 mg führt mit entsprechend niedrigeren Wirkspiegeln daher offensichtlich insgesamt seltener und lediglich zu einer Selektion von Mutationen mit niedrigem bis mittleren Resistenzniveau.

Zur Steigerung der antiviralen Aktivität und damit letztlich auch der Reduktion der Wahrscheinlichkeit für die Selektion von resistenten Varianten, wurde Boceprevir in den anschließenden Phase 2 Studien und der zurzeit laufenden Phase 3 Studie mit 800 mg dreimal täglich in Kombination mit pegyliertem Interferon- $\alpha$ 2b und Ribavirin dosiert. Die Wahrscheinlichkeit der Selektion resistenter Varianten mit

anschließendem viralen Durchbruchs (Breakthrough) wird durch Einsatz der Kombinationstherapie von NS3 Proteaseinhibitoren mit pegyliertem Interferon- $\alpha$ 2b und Ribavirin zusätzlich reduziert. Dies konnte zunächst *in vitro* gezeigt werden, da resistente Varianten im Replikonmodell eine volle Sensitivität gegenüber Interferon- $\alpha$  aufweisen (Lin et al., 2004; Lin et al., 2005). In den durchgeführten klinischen Studien zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion des virologischen Durchbruchs unter einer Kombinationstherapie eines Proteaseinhibitors mit PEG-IFN- $\alpha$  und schließlich eine weitere Reduktion durch eine Dreifachtherapie einschließlich der Gabe des Ribavirins (Forestier et al., 2007; Kieffer et al., 2007; McHutchison et al., 2009; Hezode et al., 2009; Kwo et al., 2009). Eine weitere Strategie zur Reduktion der Selektion resistenter Varianten besteht in dem Vorschalten einer sogenannten „Lead-In“ Phase vor die eigentliche Gabe des Proteaseinhibitors. Dabei bekommen die Patienten über einen Zeitraum von vier Wochen pegyliertes Interferon- $\alpha$  in Kombination mit Ribavirin bevor zur Therapie der NS3 Proteaseinhibitor mit eingeschlossen wird. Im Idealfall werden hierdurch prä-existierende resistente Varianten in der Quasispezies der Patienten vor Gabe der direkt antiviralen Substanz eliminiert sowie zusätzlich die Viruslast insgesamt reduziert. Dadurch wird durch die anschließende Gabe einer Tripletherapie einschließlich des Proteaseinhibitors die Wahrscheinlichkeit einer raschen vollständigen Blockade der Replikation mit Negativierung der HCV RNA im Serum erhöht und somit die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung reduziert. Erste Ergebnisse einer Phase 2b Studie mit einer Tripletherapie mit PEG-Interferon- $\alpha$ -2b, Ribavirin und Boceprevir mit und ohne einer "Lead-in" Phase mit PEG-Interferon- $\alpha$ -2b und Ribavirin allein über 4 Wochen zeigten die höheren SVR Raten in der 48 Wochen Gesamttherapiegruppe mit der "Lead-in" Phase (75 % vs. 67 %) und seltenere Virusdurchbrüche mit Resistenzentwicklungen in derselben Gruppe (5 % vs. 12 %) (Kwo et al., 2009). Weitere Untersuchungen sind notwendig, auch um das Potential der "Lead-in" Phase für die grundsätzliche Auswahl geeigneter Patienten für eine Therapie mit einem Proteaseinhibitor im Hinblick auf die Ansprechwahrscheinlichkeit zu

eruiieren. In den laufenden Phase 3 Studien wurden sowohl für Boceprevir als auch für Telaprevir Gruppen mit "Lead-in" Phase untersucht.

## 7.2 Phänotypische Resistenzanalyse

Um das Resistenzpotential, der *in vivo* gefundenen bekannten Resistenzmutationen *in vitro* zu bestätigen und um die neuen Varianten genauer zu beschreiben, wurden alle Mutationen in das HCV Con-1b Replikon eingebaut und in einem Drei-Tage-Assay die IC<sub>50</sub>-Werte für Boceprevir als auch für Telaprevir zur Erfassung des Kreuzresistenzprofils bestimmt. Die x-fache Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes gegenüber dem Wildtyp IC<sub>50</sub> ist hierbei das Maß für die Resistenz. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 21 und 24 dargestellt. Wie zu erwarten war, verleihen die Austausche an Position 156 die höchste Resistenz gegenüber beiden getesteten Substanzen (A156S: 17,7-fache Erhöhung des IC<sub>50</sub>; A156T: 124,5-facher IC<sub>50</sub>) (Lin et al., 2004; Lin et al., 2005; Tong et al., 2008). Die untersuchten Mutationen an den Positionen V36, T54, V55, R155 und V170 führten zu einem niedrigen bis mittleren Resistenzniveau (Boceprevir: 3,8 – 15,7-facher IC<sub>50</sub> und Telaprevir: 2,6 – 24,8-facher IC<sub>50</sub>). Einige dieser Positionen wurden bereits genauer untersucht, um die Resistenz gegenüber Telaprevir auf molekularer Ebene zu klären (Welsch et al., 2008). A156 und R155 befinden sich in der Bindungstasche der NS3 Protease, wobei A156 direkt mit der Bindung des Inhibitors interferiert. Somit lässt sich das hohe Resistenzniveau von Mutationen an dieser Position gegenüber beiden Inhibitoren leicht durch eine direkte Interferenz mit der Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum der NS3 Protease erklären. V36 und T54 interagieren nicht direkt mit dem Substrat und befinden sich auch nicht innerhalb der Bindungstasche. Es wurde gezeigt, dass Mutationen an diesen beiden Positionen zu Konformationsänderungen führen, welche sowohl die Bindungstasche als auch andere Strukturen indirekt so verändern, dass ein Substrat schlechter binden kann und es somit zur Ausbildung einer klinischen Resistenz kommt. Da V170A bisher klinisch nicht als selektionierte

Variante mit Resistenz gegenüber Telaprevir assoziiert war, wurde diese Position noch nicht näher beschrieben.

Im Gegensatz zu V55A zeigten drei der vier neuen Varianten bei keiner der beiden Substanzen eine Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes (Boceprevir: 0,8 – 1,8-facher IC<sub>50</sub> und Telaprevir: 0,9 – 1,7-facher IC<sub>50</sub>). Bei alleinigem Vorkommen von V48I, T72I und I153V kommt es also nicht zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber einem der beiden untersuchten Proteaseinhibitoren. Es ist allerdings möglich, dass sie im Zusammenhang mit der direkt antiviralen Behandlung andere Funktionen erfüllen. So wäre es beispielsweise denkbar, dass sie die beeinträchtigte Fitness der resistenten Varianten teilweise wiederherstellen und somit als kompensatorische Mutationen fungieren. Für Varianten, die zwei Resistenzmutationen gleichzeitig tragen, wurde eine Erhöhung der Fitness, im Vergleich zu den einzelnen Werten, bereits beschrieben (Sarrazin et al., 2007b). Bei Mutationen, welche selbst kein Resistenzpotenzial besitzen, könnte der Vorteil für die Replikationsfähigkeit sogar noch größer ausfallen als bei doppelten Resistenzmutationen, da die Fitness der Einzelvarianten eventuell gar nicht oder nur sehr wenig beeinträchtigt ist. Der kompensatorische Effekt könnte somit größer sein als bei der Kopplung mehrerer Resistenzmutationen. Die Erhöhung der Replikationsfähigkeit könnte auch ohne das Vorhandensein einer „echten“ Resistenz Sinn machen, um durch eine erhöhte Replikation auch die Zahl der möglichen zufällig generierten Varianten zu erhöhen. Um diesen Aspekt klären zu können, müssen weitere mathematische Modellierungen und *in vitro* Versuche unternommen werden. Die Detektion von unterschiedlichen Mengen an produziertem Virus zwischen verschiedenen Varianten würde das Konzept dieser Theorie unterstützen.

### 7.3 V55A – Eine neu entdeckte Resistenzmutation

Mit V55A wurde in der vorliegenden Arbeit eine bisher noch nicht beschriebene Variante bei Patienten unter einer Monotherapie mit Boceprevir identifiziert. In der phänotypischen Analyse wurde eindeutig

bestätigt, dass V55A das Resistenzniveau gegenüber Boceprevir und interessanterweise auch Telaprevir erhöht. Es besteht also eine Kreuzresistenz, obwohl diese Variante bei keinem der Patienten während der Telaprevir Monotherapie oder der Kombinationstherapie mit PEG-IFN $\alpha$ -2a in klinischen Phase 1 Studien beschrieben wurde (Sarrazin et al., 2007b; Kieffer et al., 2007). Der relativ niedrige IC<sub>50</sub>-Wert für Telaprevir (3,1-fach erhöhter WT IC<sub>50</sub>) im Vergleich zu dem für Boceprevir (6,9-fach erhöhter WT IC<sub>50</sub>) könnte dafür eine Erklärung sein. Die Beobachtung, dass unter der Behandlung mit Telaprevir häufiger höher resistente Varianten selektioniert werden, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Zur genaueren Charakterisierung von V55A wurde am Schering-Plough Research Institute ein Enzymassay durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine Erhöhung der IC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich zum Wildtyp von 4,2-fach für Boceprevir und 2,7-fach für Telaprevir. Der Enzymassay bestätigte somit die Ergebnisse des Replikonassays.

Im Rahmen der erstmaligen Beschreibung dieser Variante wurde am Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken eine *in silico* Analyse des Austausches von Valin gegen Alanin an Position 55 der HCV NS3 Protease durchgeführt, um die der Resistenz zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzudecken. Dabei zeigte sich, dass V55 in unmittelbarer Nähe zur Substratbindungsstelle und nahe der katalytischen Triade mit den Resten H57, D81 und S139 liegt. V55 interagiert nicht direkt mit Boceprevir, aber S139 und R155 interagieren sowohl mit Boceprevir als auch mit V55. S139 ist über van-der-Waals-Bindungen und Wasserstoffbrücken mit Boceprevir verbunden, zusätzlich bindet es auch noch kovalent, während R155 nur über van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Substanz verbunden ist. Sowohl Valin als auch Alanin gehören zur Gruppe der aliphatischen Aminosäuren. Alanin unterscheidet sich von Valin durch das Fehlen zweier Methylgruppen. Diese sind für einige van-der-Waals Interaktionen von V55 mit benachbarten Resten essentiell. Die Bindung zwischen V55

und S139 und R155 geht in der V55A Mutante durch den Verlust der zwei Methylgruppen verloren.

V55 ist innerhalb der NS3 Protease Domäne von HCV hoch konserviert. In Anlehnung an ein einheitliches System der HCV Genotypen Nomenklatur von Simmonds et al. (2005), findet man V55 bei allen klinisch relevanten Genotypen, mit Ausnahme von L55 beim Genotyp 5a. Eine nicht-kovalente Interaktion zwischen V55A und S139 oder R155 könnte also für die entstehende Resistenz verantwortlich sein.

Durch *in vitro* Versuche wurden kürzlich Q41R und F43S als weitere Mutationen identifiziert, welche niedrige bis mittlere Resistenzlevel gegenüber Boceprevir aufweisen (Tong et al., 2008). Eine Kreuzresistenz gegenüber Telaprevir konnte *in vitro* hingegen nicht nachgewiesen werden. Ein signifikantes Auftreten dieser beiden Mutationen *in vivo* bei Patienten der hier beschriebenen Boceprevir Monotherapie Studie konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Lediglich zwei der 2082 untersuchten Klone zeigten den Austausch von Glutamin zu Arginin an Position 41. F43S konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Klon zeigte an dieser Stelle F43C als Mutation. Über eine Kalkulation des Selektionsdrucks von Boceprevir auf jede einzelne Aminosäure der HCV NS3 Protease konnten Qiu et al. (2009) V158I als neue Resistenzmutation beschreiben. Das Resistenzpotential gegenüber Boceprevir wurde *in vitro* bestätigt. Auch bei V158I kommt es zu keiner Ausbildung einer Kreuzresistenz gegenüber Telaprevir. V158I wurde ebenso wie F43S in keinem der ausgewerteten Klone detektiert. Eine einzige Variante wies V158A als Mutation auf.

#### 7.4 Kreuzresistenzen

Für alle gefundenen Varianten mit bereits bestätigtem oder neu entdecktem Resistenzpotential konnte *in vitro* eine Kreuzresistenz sowohl gegen Boceprevir als auch gegen Telaprevir nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte ist in Abbildung 25 dargestellt. Obwohl die Ergebnisse im Replikonassay eindeutig sind, finden sich im Vorkommen dieser Varianten *in vivo* erhebliche Unterschiede. A156T ist

die Mutation, mit der mit Abstand höchsten Resistenz gegenüber Boceprevir (124,5-facher  $IC_{50}$ ) und Telaprevir (136-facher  $IC_{50}$ ). Während man bei Patienten nach zweiwöchiger Monotherapie mit Telaprevir teilweise zu 100 % A156T klonal nachweisen konnte (Sarrazin et al., 2007b), tritt diese Variante nach zwei Wochen Monotherapie mit Boceprevir nicht nachweislich auf. Hier wurden in der vorliegenden Arbeit lediglich A156S (17,7-facher  $IC_{50}$ ) in maximal 7 % der untersuchten Klone bei drei Patienten nachgewiesen. V170A dagegen ist bei Patienten aus der Telaprevir Monotherapie Studie praktisch nicht beschrieben worden, während es eine häufig vorkommende Variante in dieser Studie war. Interessanterweise wurde die V170A als einzige Variante bei der Direktsequenzierung der Proben dieser Studie nachgewiesen (Zeuzem et al., 2005). Das *in vitro* Resistenzprofil weist für die beiden Substanzen nur geringe Unterschiede auf. Es zeigt sich aber eine leicht höhere Resistenz gegenüber Boceprevir (7,2-facher  $IC_{50}$  gegenüber 3,4-fachem  $IC_{50}$  für Telaprevir). Ähnlich verhält es sich mit V55A. Durch Telaprevir wird diese Variante *in vivo* praktisch nicht selektioniert, wohingegen sie unter Therapie mit Boceprevir ein so typisches Auftreten zeigt, dass sie im Rahmen dieser Arbeit als neue Resistenzmutation entdeckt werden konnte. Der Replikon  $IC_{50}$ -Wert liegt auch hier für Boceprevir etwas über dem Wert für Telaprevir (6,9-facher  $IC_{50}$  gegenüber 3,1-fachem  $IC_{50}$ ). Ein weiterer auffälliger Unterschied findet sich bei der Verteilung der Doppelmutationen. Es wurden nur vier gekoppelte Resistenzmutationen gefunden (V36M+T54S, V36A+R155K, T54S/A+R155K und T54S+A156S), wovon jede nur bei einem Patienten vorkam. Die Selektion doppelter Resistenzmutationen mit Telaprevir lag dagegen deutlich höher, was erneut vermutlich durch die höhere antivirale Aktivität des Telaprevirs im Vergleich zu Boceprevir in den beiden Studien erklärt wird (Sarrazin et al., 2007b).

Die genetische Barriere zur Selektion von Resistenzmutationen im Allgemeinen und von hochresistenten Mutationen im Speziellen, ist bei einer Behandlung mit Boceprevir offensichtlich deutlich verschieden im Vergleich zu Telaprevir. Eine mögliche Ursache dafür könnte die geringere

antivirale Potenz von Boceprevir und der damit einhergehende geringere initiale HCV RNA Abfall sein, so dass eigentlich nicht von einer höheren genetischen Resistenzbarriere gesprochen werden kann. Beide Substanzen sind peptidomimetische Proteaseinhibitoren mit einer tetrapeptidischen Struktur, die jeweils ein Ketoamid enthält und gehören somit zur gleichen Molekülklasse. Durch die geringen Unterschiede im Aufbau der Moleküle, wie zum Beispiel das Fehlen einer Cyclopropylgruppe bei Boceprevir, kommt es aber zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Affinität von Substanz und aktivem Zentrum der NS3 Protease. Bindet der Inhibitor weniger stark, wie es bei Boceprevir vermutlich der Fall ist, so kann das eigentliche Substrat leichter um die Bindung konkurrieren und letztendlich doch prozessiert werden. Außerdem ist es möglich, dass die beiden Substanzen unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen. So wäre es denkbar, dass Boceprevir nur geringere Wirkspiegel aufbauen kann als Telaprevir oder es könnte schneller dissoziieren und abgebaut werden. Diese geringere Affinität und/oder Verstoffwechslung würde ebenfalls mit einem niedrigeren Selektionsdruck einhergehen, unter dem weniger viele und weniger starke Resistenzen gebildet werden.

Um noch tiefere Einblicke in die Resistenzmechanismen des Hepatitis C Virus gegenüber NS3 Proteaseinhibitoren zu erlangen, sind eine Reihe weiterer Versuche notwendig. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das NS3 Protease Gen sequenziert. Es ist daher nicht klar in welchem Ausmaß sich Mutationen auch im Bereich der NS3 Helikase befinden. Ebenso könnten Veränderungen im NS4A Kofaktor und/oder an den NS3/4A Protease Schnittstellen im Bereich des HCV Polyproteins dazu beitragen, eine Resistenz zu entwickeln oder eine beeinträchtigte Funktion der NS3/4A Protease zu kompensieren. In einer kürzlich durchgeführten Studie mit Telaprevir in Kombination mit pegyliertem Interferon- $\alpha$ 2a und Ribavirin wurden an den Schnittstellen der Protease allerdings keine Mutationen entdeckt (Zhang et al., 2008). Ebenfalls wären vergleichende Unterschiede mit anderen NS3 Proteaseinhibitoren der gleichen und unterschiedlicher Substanzklassen (makrozyklische Inhibitoren)

notwendig, von denen einige in der klinischen Entwicklung sind. Hier haben erste Untersuchungen unterschiedliche Resistenzprofile mit partiell fehlender Kreuzresistenz nachgewiesen (Seiwert et al., 2008; Lawitz et al., 2008b; Manns et al., 2008a; Manns et al., 2008b).

Zum vollständigeren Verständnis der klinischen Bedeutung von V55A und möglicher weiterer bisher nicht bekannter Resistenzmutationen, wäre es gut eine größere Patientenpopulation, die mit Boceprevir oder Telaprevir behandelt wurde, zu untersuchen. Vor allem sollten hier Patientenseren aus den Kombinationsstudien mit pegyliertem Interferon und Ribavirin analysiert werden, um die Bedeutung für die voraussichtlich im Jahr 2010/11 zugelassene Standardtherapie zu evaluieren. Für einige Resistenzen wurde gezeigt, dass sie schon vor Beginn der Therapie mit Boceprevir in geringer Anzahl in der Wildtyp Quasispezies nachzuweisen sind (Curry et al., 2008). In einer klonalen Analyse der Quasispezies eines mit HCV infizierten Patienten, der noch nie mit einem Proteaseinhibitor behandelt wurde, konnte sogar die hochresistente Variante A156T detektiert werden (Cubero et al., 2008). In weiteren Untersuchungen von unbehandelten HCV infizierten Patienten wurde das natürliche Auftreten von diversen Mutationen, die mit Resistenz gegenüber verschiedensten Proteaseinhibitoren assoziiert sind (V36M/L, T54S, R155K, V170A), durch Direktsequenzierung nachgewiesen (Gaudieri et al., 2009; Kuntzen et al., 2008). Teilweise traten diese resistenten Varianten sogar mit einer Frequenz von bis zu 100 % auf (Bartels et al., 2008).

Inwieweit die Präexistenz von V55A zu Baseline eine Rolle spielt, wird vermutlich mit klonalen Analysen schwierig zu erfassen sein, da eine niedrige Frequenz der Variante (< 1 %) in der Quasispezies wahrscheinlich ist und somit eine sehr hohe Zahl an Klonen pro Patient sequenziert werden müsste, um Varianten zu detektieren. Sensitivere Methoden zur Detektion von Mutationen, wie zum Beispiel TaqMAMA (TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay) oder Next Generation Sequencing (Pyrosequenzing etc.) könnten in der Zukunft eine Alternative zur klonalen Analyse darstellen. Mit diesen Verfahren gehen allerdings wichtige Informationen darüber verloren, wie die Mutationen auf den einzelnen

RNA-Molekülen angeordnet sind. Doppelte Resistenzmutationen oder Kopplungen mit eventuell kompensatorischen Mutationen können nur durch klonale Analysen aufgezeigt werden.

Ein wichtiger Aspekt bei der Selektion von resistenten Varianten stellt die eventuelle Möglichkeit einer Langzeitpersistenz dar, wie sie für die HIV Infektion beschrieben wurde. Dies hat vermutlich erhebliche Auswirkungen für den Einsatz weiterer direkt antiviraler Substanzen bei Versagen der initialen Therapie. Hierzu liegen bislang nur wenige Daten vor. Sowohl für Patienten nach einer Behandlung mit Boceprevir als auch mit Telaprevir wurden bis zu fünf Jahre nach Therapieende bei einzelnen Fällen noch resistente Varianten nachgewiesen (Susser et al., 2009; Forestier et al., 2008).

## Literaturverzeichnis

1. Adams,N.J., Chamberlain,R.W., Taylor,L.A., Davidson,F., Lin,C.K., Elliott,R.M., Simmonds,P. (1997). Complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 6a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 393-396.
2. Alter,M.J., Margolis,H.S., Krawczynski,K., Judson,F.N., Mares,A., Alexander,W.J., Hu,P.Y., Miller,J.K., Gerber,M.A., Sampliner,R.E. (1992). The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N. Engl. J. Med.* 327, 1899-1905.
3. Appel,N., Zayas,M., Miller,S., Krijnse-Locker,J., Schaller,T., Friebe,P., Kallis,S., Engel,U., Bartenschlager,R. (2008). Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS. Pathog.* 4, e1000035.
4. Bartels,D.J., Zhou,Y., Zhang,E.Z., Marcial,M., Byrn,R.A., Pfeiffer,T., Tigges,A.M., Adiwijaya,B.S., Lin,C., Kwong,A.D., Kieffer,T.L. (2008). Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3-4A protease inhibitors in treatment-naive subjects. *J. Infect. Dis.* 198, 800-807.
5. Bartenschlager,R., Lohmann,V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 14, 241-254.
6. Bartosch,B., Dubuisson,J., Cosset,F.L. (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* 197, 633-642.

7. 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.
8. Billerbeck,E., Thimme,R. (2008). CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. *Hum. Immunol.* 69, 771-775.
9. Borowski,P., Oehlmann,K., Heiland,M., Laufs,R. (1997). Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Virol.* 71, 2838-2843.
10. Bowden,S. (2001). New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 124-131.
11. Bowen,D.G., Walker,C.M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436, 946-952.
12. Bradley,D.W. (2000). Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242, 1-23.
13. Bukh,J., Apgar,C.L., Engle,R., Govindarajan,S., Hegerich,P.A., Tellier,R., Wong,D.C., Elkins,R., Kew,M.C. (1998). Experimental infection of chimpanzees with hepatitis C virus of genotype 5a: genetic analysis of the virus and generation of a standardized challenge pool. *J. Infect. Dis.* 178, 1193-1197.
14. Burlone,M.E., Budkowska,A. (2009). Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* 90, 1055-1070.

15. Chamberlain,R.W., Adams,N., Saeed,A.A., Simmonds,P., Elliott,R.M. (1997a). Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J. Gen. Virol.* 78, 1341-1347.
16. Chamberlain,R.W., Adams,N.J., Taylor,L.A., Simmonds,P., Elliott,R.M. (1997b). The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 44-49.
17. Chang,J., Yang,S.H., Cho,Y.G., Hwang,S.B., Hahn,Y.S., Sung,Y.C. (1998). Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J. Virol.* 72, 3060-3065.
18. Chayama,K., Tsubota,A., Koida,I., Arase,Y., Saitoh,S., Ikeda,K., Kumada,H. (1994). Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. *J. Gen. Virol.* 75, 3623-3628.
19. Chen,C.M., You,L.R., Hwang,L.H., Lee,Y.H. (1997). Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J. Virol.* 71, 9417-9426.
20. Choo,Q.L., Kuo,G., Weiner,A.J., Overby,L.R., Bradley,D.W., Houghton,M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.

21. Choo,Q.L., Richman,K.H., Han,J.H., Berger,K., Lee,C., Dong,C., Gallegos,C., Coit,D., Medina-Selby,A., Barr,P.J., Weiner,A.J., Bradley,D.W. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2451-2455.
22. Cubero,M., Esteban,J.I., Otero,T., Sauleda,S., Bes,M., Esteban,R., Guardia,J., Quer,J. (2008). Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* **370**, 237-245.
23. Curry,S., Qiu,P., Tong,X. (2008). Analysis of HCV resistance mutations during combination therapy with protease inhibitor boceprevir and PEG-IFN alpha-2b using TaqMan mismatch amplification mutation assay. *J Virol. Methods* **153**, 156-162.
24. Deka,N., Sharma,M.D., Mukerjee,R. (1994). Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J. Virol.* **68**, 7810-7815.
25. 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.
26. Egger,D., Wolk,B., Gosert,R., Bianchi,L., Blum,H.E., Moradpour,D., Bienz,K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology* **76**, 5974-5984.
27. Esteban,J.I., Sauleda,S., Quer,J. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* **48**, 148-162.

28. 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.
29. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (2005). *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA.
30. 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.
31. 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.
32. Forestier,N., Susser,S., Welker,M.W., Karey,U., Zeuzem,S., Sarrazin,C. (2008). Long Term Follow Up of Patients Previously Treated with Telaprevir. *Hepatology* 48(Suppl. 4), 1011A.
33. Friebe,P., Boudet,J., Simorre,J.P., Bartenschlager,R. (2005). Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J. Virol.* 79, 380-392.
34. Gale,M., Jr., Foy,E.M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436, 939-945.

35. Gaudieri,S., Rauch,A., Pfafferott,K., Barnes,E., Cheng,W., McCaughan,G., Shackel,N., Jeffrey,G.P., Mollison,L., Baker,R., Furrer,H., Gunthard,H.F., Freitas,E., Humphreys,I., Klenerman,P., Mallal,S., James,I., Roberts,S., Nolan,D., Lucas,M. (2009). Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 49, 1069-1082.
36. Gottwein,J.M., Scheel,T.K., Hoegh,A.M., Lademann,J.B., Eugen-Olsen,J., Lisby,G., Bukh,J. (2007). Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses. *Gastroenterology* 133, 1614-1626.
37. Gouttenoire,J., Montserret,R., Kennel,A., Penin,F., Moradpour,D. (2009). An Amphipathic  $\alpha$ -Helix at the C Terminus of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B Mediates Membrane Association. *J. Virol.* [*Epub ahead of print*].
38. 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.
39. Gurtler,L. (2002). [Hepatitis C in Germany. More than 5000 new infections annually]. *MMW. Fortschr. Med.* 144, 26-28.
40. Herrine,S.K. (2002). Approach to the patient with chronic hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 136, 747-757.

41. Hezode,C., Forestier,N., Dusheiko,G., Ferenci,P., Pol,S., Goeser,T., Bronowicki,J.P., Bourliere,M., Gharakhanian,S., Bengtsson,L., McNair,L., George,S., Kieffer,T., Kwong,A., Kauffman,R.S., Alam,J., Pawlotsky,J.M., Zeuzem,S. (2009). Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 360, 1839-1850.
42. Hiroishi,K., Ito,T., Imawari,M. (2008). Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 1473-1482.
43. Hofmann,W.P., Polta,A., Herrmann,E., Mihm,U., Kronenberger,B., Sonntag,T., Lohmann,V., Schonberger,B., Zeuzem,S., Sarrazin,C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132, 921-930.
44. Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., Gelfand,D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276-7280.
45. Hong,J., Qin,X.L., Lim,S., Blatt,L.M., Seiwert,S. (2008). A High Throughput System for Phenotypic Analysis of NS3 Sequences. *Hepatology* 48(Suppl. 4), 756A.
46. Inchauspe,G., Zebedee,S., Lee,D.H., Sugitani,M., Nasoff,M., Prince,A.M. (1991). Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10292-10296.

47. Kato,N., Hijikata,M., Ootsuma,Y., Nakagawa,M., Ohkoshi,S., Sugimura,T., Shimotohno,K. (1990). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9524-9528.
48. Kato,T., Furusaka,A., Miyamoto,M., Date,T., Yasui,K., Hiramoto,J., Nagayama,K., Tanaka,T., Wakita,T. (2001). Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* 64, 334-339.
49. 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.
50. 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 [published erratum appears in *Cell* 1997 Apr 4;89(1):159]. *Cell* 87, 343-355.
51. Kimura,T., Imamura,M., Hiraga,N., Hatakeyama,T., Miki,D., Noguchi,C., Mori,N., Tsuge,M., Takahashi,S., Fujimoto,Y., Iwao,E., Ochi,H., Abe,H., Maekawa,T., Arataki,K., Tateno,C., Yoshizato,K., Wakita,T., Okamoto,T., Matsuura,Y., Chayama,K. (2008). Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J. Gen. Virol.* 89, 2108-2113.

52. Kolykhalov,A.A., Mihalik,K., Feinstone,S.M., Rice,C.M. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.* 74, 2046-2051.
53. Krieger,N., Lohmann,V., Bartenschlager,R. (2001). Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* 75, 4614-4624.
54. Kuntzen,T., Timm,J., Berical,A., Lennon,N., Berlin,A.M., Young,S.K., Lee,B., Heckerman,D., Carlson,J., Reyor,L.L., Kleyman,M., McMahon,C.M., Birch,C., Schulze Zur,W.J., Ledlie,T., Koehrsen,M., Kodira,C., Roberts,A.D., Lauer,G.M., Rosen,H.R., Bihl,F., Cerny,A., Spengler,U., Liu,Z., Kim,A.Y., Xing,Y., Schneidewind,A., Madey,M.A., Fleckenstein,J.F., Park,V.M., Galagan,J.E., Nusbaum,C., Walker,B.D., Lake-Bakaar,G.V., Daar,E.S., Jacobson,I.M., Gomperts,E.D., Edlin,B.R., Donfield,S.M., Chung,R.T., Talal,A.H., Marion,T., Birren,B.W., Henn,M.R., Allen,T.M. (2008). Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology* 48, 1769-1778.
55. Kwo,P., Lawitz,E., McCone,J., Schiff,E., Vierling,J., Pound,D., Davis,M., Galati,J., Gordon,S., Ravendhran,N., Rossaro,L., Anderson,F., Jacobson,I., Rubin,R., Koury,K., Brass,C., Chaudhri,E., Albrecht,J. (2009). HCV SPRINT-1 final results: SVR 24 from a phase 2 study of boceprevir plus PegIntron™ (peginterferon alfa-2b)/ribavirin in treatment-naive subjects with genotype-1 chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 50(Suppl. 1), S4.

56. Lawitz,E., Rodriguez-Torres,M., Muir,A.J., Kieffer,T.L., McNair,L., Khunvichai,A., McHutchison,J.G. (2008a). Antiviral effects and safety of telaprevir, peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in hepatitis C patients. *J. Hepatol.* 49, 163-169.
57. Lawitz,E.J., Sulkowski,M.S., Jacobson,I.M., Faruqui,S., Kraft,W.K., Maliakkal,B., Al-Ibrahim,M., Ghalib,R.H., Gordon,S.C., Kwo,P., Rockstroh,J., Miller,M., Hwang,P., Gress,J., Quirk,E. (2008b). Safety, Tolerability and Antiviral Activity of MK-7009, a Novel Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease, in Patients with Chronic HCV Genotype 1 Infection. *Hepatology* 48(Suppl. 4), 403A-404A.
58. Lee,L.G., Connell,C.R., Bloch,W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 3761-3766.
59. Leruez-Ville,M., Kunstmann,J.M., De,A.M., Rouzioux,C., Chaix,M.L. (2000). Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* 356, 42-43.
60. 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.

61. 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.
  
62. Lindenbach,B.D., Evans,M.J., Syder,A.J., Wolk,B., Tellinghuisen,T.L., Liu,C.C., Maruyama,T., Hynes,R.O., Burton,D.R., McKeating,J.A., Rice,C.M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626.
  
63. Liu,S., Yang,W., Shen,L., Turner,J.R., Coyne,C.B., Wang,T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* 83, 2011-2014.
  
64. Lohmann,V., Körner,F., Koch,J.O., Herian,U., Theilmann,L., Bartenschlager,R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
  
65. Lohmann,V., Korner,F., Dobierzewska,A., Bartenschlager,R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J. Virol.* 75, 1437-1449.
  
66. Lundin,M., Monne,M., Widell,A., Von Heijne,G., Persson,M.A. (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* 77, 5428-5438.
  
67. Major,M.E., Feinstone,S.M. (2000). Characterization of hepatitis C virus infectious clones in chimpanzees: long-term studies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242, 279-298.

68. Manns,M.P., Reesink,H.W., Moreno,C., Berg,T., Benhamou,Y., Horsmans,Y.J., Dusheiko,G.M., Flisiak,R., Meyvisch,P., Lenz,O., Simmen,K., Verloes,R. (2008a). Safety and Antiviral Activity of TMC435350 in Treatment-Name Genotype 1 HCV-Infected Patients. *Hepatology* 48(Suppl. S), 1023A.
69. Manns,M.P., Bourliere,M., Benhamou,Y., Pol,S., Bonacini,M., Berg,T., Trepo,C., Wright,D., Steinmann,G., Huang,DB., Mikl,J., Kukolj,G., Stern,JO. (2008b). Safety and antiviral activity of BI201335, a new HCV NS3 protease inhibitor, in treatment-naive patients with chronic hepatitis C genotype-1 infection given as monotherapy and in combination with peginterferon alfa 2a and ribavirin. *Hepatology* 48(Suppl. S), 1133A.
70. Manns,M.P., Muir,A., Adda,N., Jacobson,I., Afdhal,N., Heathcote,J., Zeuzem,S., Reesink,H., Terrault,N., Bsharat,M., George,S., McHutchison,J., Di Bisceglie,A.M. (2009). Telaprevir in hepatitis C genotype-1-infected patients with prior non-response, viral breakthrough or relapse to peginterferon-alfa-2a/b and ribavirin therapy: SVR results of the PROVE3 study. *J. Hepatol.* 50(Suppl. 1), S379.
71. Matsumoto,M., Hsieh,T.Y., Zhu,N., VanArsdale,T., Hwang,S.B., Jeng,K.S., Gorbalenya,A.E., Lo,S.Y., Ou,J.H., Ware,C.F., Lai,M.M. (1997). Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J. Virol.* 71, 1301-1309.
72. McHutchison,J.G., Everson,G.T., Gordon,S.C., Jacobson,I.M., Sulkowski,M., Kauffman,R., McNair,L., Alam,J., Muir,A.J. (2009). Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 360, 1827-1838.

73. Moradpour,D., Penin,F., Rice,C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 453-463.
74. Moriya,K., Fujie,H., Shintani,Y., Yotsuyanagi,H., Tsutsumi,T., Ishibashi,K., Matsuura,Y., Kimura,S., Miyamura,T., Koike,K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat. Med.* 4, 1065-1067.
75. Murakami,K., Abe,M., Kageyama,T., Kamoshita,N., Nomoto,A. (2001). Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch. Virol.* 146, 729-741.
76. Murao,K., Imachi,H., Yu,X., Cao,W.M., Nishiuchi,T., Chen,K., Li,J., Ahmed,R.A., Wong,N.C., Ishida,T. (2008). Interferon alpha decreases expression of human scavenger receptor class BI, a possible HCV receptor in hepatocytes. *Gut* 57, 664-671.
77. Nakao,H., Okamoto,H., Tokita,H., Inoue,T., Iizuka,H., Pozzato,G., Mishiro,S. (1996). Full-length genomic sequence of a hepatitis C virus genotype 2c isolate (BEBE1) and the 2c-specific PCR primers. *Arch. Virol.* 141, 701-704.
78. Niederau,C., Kapagiannidis,C. (2006). [Epidemiology of hepatitis C in Germany]. *Med. Klin.* 101, 448-457.
79. 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.

80. Okamoto,H., Okada,S., Sugiyama,Y., Kurai,K., Iizuka,H., Machida,A., Miyakawa,Y., Mayumi,M. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.* 72, 2697-2704.
  
81. Okamoto,H., Kurai,K., Okada,S., Yamamoto,K., Iizuka,H., Tanaka,T., Fukuda,S., Tsuda,F., Mishiro,S. (1992). Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188, 331-341.
  
82. Okamoto,H., Kojima,M., Sakamoto,M., Iizuka,H., Hadiwandowo,S., Suwignyo,S., Miyakawa,Y., Mayumi,M. (1994). The entire nucleotide sequence and classification of a hepatitis C virus isolate of a novel genotype from an Indonesian patient with chronic liver disease. *J. Gen. Virol.* 75, 629-635.
  
83. Pietschmann,T. (2009a). *Virology: Final entry key for hepatitis C.* *Nature* 457, 797-798.
  
84. Pietschmann,T. (2009b). Full-length infectious HCV chimeras. *Methods Mol. Biol.* 510, 347-359.
  
85. 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.

86. Ploss,A., Evans,M.J., Gaysinskaya,V.A., Panis,M., You,H., de Jong,Y.P., Rice,C.M. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882-886.
87. Post,J., Ratnarajah,S., Lloyd,A.R. (2009). Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 733-756.
88. Purcell,R.H. (1993). The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 104, 955-963.
89. Qiu,P., Sanfiorenzo,V., Curry,S., Guo,Z., Liu,S., Skelton,A., Xia,E., Cullen,C., Ralston,R., Greene,J., Tong,X. (2009). Identification of HCV protease inhibitor resistance mutations by selection pressure-based method. *Nucleic Acids Res.* 37, e74.
90. Reesink,H.W., Zeuzem,S., Weegink,C.J., Forestier,N., van Vliet,A., van de Wetering de Rooij, 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.
91. Robertson,B., Myers,G., Howard,C., Brettin,T., Bukh,J., Gaschen,B., Gojobori,T., Maertens,G., Mizokami,M., Nainan,O., Netesov,S., Nishioka,K., Shin i,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.

92. Ruggieri,A., Harada,T., Matsuura,Y., Miyamura,T. (1997). Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology* 229, 68-76.
93. Saito,I., Miyamura,T., Ohbayashi,A., Harada,H., Katayama,T., Kikuchi,S., Watanabe,Y., Koi,S., Onji,M., Ohta,Y., Choo,Q.L., Houghton,M., Kuo,G. (1990). Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 6547-6549.
94. Sakamoto,M., Akahane,Y., Tsuda,F., Tanaka,T., Woodfield,D.G., Okamoto,H. (1994). Entire nucleotide sequence and characterization of a hepatitis C virus of genotype V/3a. *J. Gen. Virol.* 75, 1761-1768.
95. Samokhvalov,E.I., Hijikata,M., Gylka,R.I., Lvov,D.K., Mishiro,S. (2000). Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis C virus variant (isolate name VAT96) representing a new subtype within the genotype 2 (arbitrarily 2k). *Virus Genes* 20, 183-187.
96. Sarrazin,C., Rouzier,R., Wagner,F., Forestier,N., Larrey,D., Gupta,S.K., Hussain,M., Shah,A., Cutler,D., Zhang,J., Zeuzem,S. (2007a). SCH 503034, a novel hepatitis C virus protease inhibitor, plus pegylated interferon alpha-2b for genotype 1 nonresponders. *Gastroenterology* 132, 1270-1278.
97. Sarrazin,C., Kieffer,T.L., Bartels,D., Hanzelka,B., Muh,U., Welker,M., Wincheringer,D., Zhou,Y., Chu,H.M., Lin,C., Weegink,C., Reesink,H., Zeuzem,S., Kwong,A.D. (2007b). Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology* 132, 1767-1777.

98. Sarrazin,C., Hong,J., Lim,S., Qin,X., Susser,S., Bradford,B., Porter,S., Zeuzem,S., Seiwert,S. (2009a). Incidence of Virologic Escape Observed During ITMN-191 (R7227) Monotherapy is Genotype Dependent, Associated with a Specific NS3 Substitution, and Suppressed upon Combination with Peginterferon alfa-2a/Ribavirin. *J. Hepatol.* 50(Suppl. 1), S350.
99. Sarrazin,C., Berg,T., Ross,R.S., Schirmacher,P., Wedemeyer,H., Neumann,U., Schmidt,H.H.J., Spengler,U., Wirth,S., Kessler,H.H., Peck-Radosavljevic,M., Ferenci,P., Vogel,W., Moradpour,D., Heim,M., Cornberg,M., Protzer,U., Manns,M.P., Fleig,W.E., Dollinger,M.M., Zeuzem,S. (2009b). Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion. *Z. Gastroenterol.* *in press.*
100. Scarselli,E., Ansuini,H., Cerino,R., Roccasecca,R.M., Acali,S., Filocamo,G., Traboni,C., Nicosia,A., Cortese,R., Vitelli,A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017-5025.
101. Seeff,L.B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36, 35-46.
102. Seiwert,S.D., Andrews,S.W., Jiang,Y., Serebryany,V., Tan,H., Kossen,K., Rajagopalan,P.T.R., Misialek,S., Stevens,S.K., Stoycheva,A., Hong,J., Lim,S.R., Qin,X., Rieger,R., Condroski,K.R., Zhang,H., Do,M.G., Lemieux,C., Hingorani,G.P., Hartley,D.P., Josey,J.A., Pan,L., Beigelman,L., Blatt,L.M. (2008). Preclinical Characteristics of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitor ITMN-191 (R7227). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 4432-4441.

103. Sentandreu,V., Jimenez-Hernandez,N., Torres-Puente,M., Bracho,M.A., Valero,A., Gosalbes,M.J., Ortega,E., Moya,A., Gonzalez-Candelas,F. (2008). Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS. ONE.* 3, e3239.
104. 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.
105. Simmonds,P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J. Gen. Virol.* 85, 3173-3188.
106. 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., 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.
107. Steinmann,E., Penin,F., Kallis,S., Patel,A.H., Bartenschlager,R., Pietschmann,T. (2007). Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS. Pathog.* 3, e103.
108. Stramer,S.L. (2007). Current risks of transfusion-transmitted agents: a review. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131, 702-707.

109. Susser,S., Forestier,N., Welker,M.W., Vermehren,J., Karey,U., Zeuzem,S., Sarrazin,C. (2009). Detection of resistant variants in the hepatitis C virus NS3 protease gene by clonal sequencing at long-term follow-up in patients treated with boceprevir. *J. Hepatol.* *50(Suppl. 1)*, S7.
110. Suzuki,T., Ishii,K., Aizaki,H., Wakita,T. (2007). Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *59*, 1200-1212.
111. Takamizawa,A., Mori,C., Fuke,I., Manabe,S., Murakami,S., Fujita,J., Onishi,E., Andoh,T., Yoshida,I., Okayama,H. (1991). Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* *65*, 1105-1113.
112. 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.
113. Taniguchi,H., Kato,N., Otsuka,M., Goto,T., Yoshida,H., Shiratori,Y., Omata,M. (2004). Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *J. Med. Virol.* *72*, 52-59.
114. Taylor,D.R., Shi,S.T., Romano,P.R., Barber,G.N., Lai,M.M.C. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* *285*, 107-110.
115. 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.

116. Tellinghuisen,T.L., Foss,K.L., Treadaway,J.C., Rice,C.M. (2008). Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J. Virol.* 82, 1073-1083.
117. Theodore,D., Fried,M.W. (2000). Natural history and disease manifestations of hepatitis C infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242, 43-54.
118. Thierfelder,W., Hellenbrand,W., Meisel,H., Schreier,E., Dortschy,R. (2001). Prevalence of markers for hepatitis A, B and C in the German population. Results of the German National Health Interview and Examination Survey 1998. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 429-435.
119. 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.
120. Tokita,H., Okamoto,H., Iizuka,H., Kishimoto,J., Tsuda,F., Miyakawa,Y., Mayumi,M. (1998). The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *J. Gen. Virol.* 79, 1847-1857.
121. 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.

122. Tong,X., Bogen,S., Chase,R., Girijavallabhan,V., Guo,Z., Njoroge,R.G., Prongay,A., Saksena,A., Skelton,A., Xia,E., Ralston,R. (2008). Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. *Antiviral Research* 77, 177-185.
123. Tsukiyama-Kohara,K., Iizuka,N., Kohara,M., Nomoto,A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 66, 1476-1483.
124. Vassilaki,N., Friebe,P., Meuleman,P., Kallis,S., Kaul,A., Paranhos-Baccala,G., Leroux-Roels,G., Mavromara,P., Bartenschlager,R. (2008). Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *J. Virol.* 82, 11503-11515.
125. von Hahn,T., Rice,C.M. (2008). Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* 283, 3689-3693.
126. Wakita,T., Pietschmann,T., Kato,T., Date,T., Miyamoto,M., Zhao,Z., Murthy,K., Habermann,A., Krausslich,H.G., Mizokami,M., Bartenschlager,R., Liang,T.J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791-796.
127. 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.
128. Wang,C., Sarnow,P., Siddiqui,A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* 67, 3338-3344.

129. 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., Brunetto,M., Barr,P.J., Miyamura,T., McHutchison,J.G., Houghton,M. (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.
130. Welker,M.W., Welsch,C., Meyer,A.K., Forestier,N., Kronenberger,B., Lengauer,T., Piiper,A., Zeuzem,S., Sarrazin,C. (2009). Homodimerization of the Hepatitis C Virus Non-Structural 4B Protein Requires An Intact Basic Leucine Zipper. *J. Hepatol.* 50, S133-S134.
131. Welsch,C., Domingues,F.S., Susser,S., Antes,I., Hartmann,C., Mayr,G., Schlicker,A., Sarrazin,C., Albrecht,M., Zeuzem,S., Lengauer,T. (2008). Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol.* 9, R16.
132. WHO (2009). World Health Organisation. Hepatitis C. Initiative For Vaccine Research. <[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/viral\\_cancers/en/index2.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html)> [accessed January 21, 2009].
133. 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.

134. Yamada,N., Tanihara,K., Mizokami,M., Ohba,K., Takada,A., Tsutsumi,M., Date,T. (1994). Full-length sequence of the genome of hepatitis C virus type 3a: comparative study with different genotypes. *J. Gen. Virol.* 75, 3279-3284.
135. 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.
136. Yasui,K., Wakita,T., Tsukiyama-Kohara,K., Funahashi,S.I., Ichikawa,M., Kajita,T., Moradpour,D., Wands,J.R., Kohara,M. (1998). The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72, 6048-6055.
137. Zanetti,A.R., Tanzi,E., Newell,M.L. (1999). Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 31(Suppl. 1), S96-S100.
138. Zein,N.N., Li,H., Persing,D.H. (1999). Humoral immunity in acute and chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 117, 510.
139. Zeuzem,S., Teuber,G., Lee,J.H., Rüster,B., Roth,W.K. (1996). Risk factors for the transmission of hepatitis C. *J. Hepatol.* 24(Suppl. 2), S3-S10.
140. Zeuzem,S., Sarrazin,C., Rouzier,R., Tarral,A., Brion,N., Gupta,S., Deckman,D., Fellows,K., Hussain,M., Cutler,D.L., Zhang,J. (2005). Anti-viral activity of SCH 503034, a HCV protease inhibitor, administered as monotherapy in hepatitis C genotype-1 (HCV-1) patients refractory to pegylated interferon (PEG-IFN-alpha). *Hepatology* 42(Suppl. 4), 233A-234A.

141. Zeuzem,S., Berg,T., Moeller,B., Hinrichsen,H., Mauss,S., Wedemeyer,H., Sarrazin,C., Hueppe,D., Zehnter,E., Manns,M.P. (2009). Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* *16*, 75-90.
142. Zhang,E., Bartels,D., Sullivan,J., Marcial,M., Dorrian,J., Tigges,A., Kwong,A., Kieffer,T. (2008). No compensatory fitness mutations selected in NS3/4A protease cleavage sites during treatment with telaprevir, PEG-IFN-alfa-2a, and ribavirin in phase II studies of treatment naive HCV genotype 1-infected patients. *Hepatology* *48(Suppl. 4)*, 1138A.
143. Zheng,A., Yuan,F., Li,Y., Zhu,F., Hou,P., Li,J., Song,X., Ding,M., Deng,H. (2007). Claudin-6 and Claudin-9 Function as Additional co-Receptors for Hepatitis C Virus. *J. Virol.* *81*, 12465-12471.

## Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt publiziert:

**Susser S**, Welsch C, Wang Y, Zettler M, Domingues FS, Karey U, Hughes E, Ralston R, Tong X, Herrmann E, Zeuzem S, Sarrazin C.

Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus infected patients. *Hepatology* in press.

Welsch C, Domingues FS, **Susser S**, Antes I, Hartmann C, Mayr G, Schlicker A, Sarrazin C, Albrecht M, Zeuzem S, Lengauer T.

Molecular basis of telaprevir resistance due to V36 and T54 mutations in the NS3-4A protease of the hepatitis C virus. *Genome Biol* 2008;9:R16.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

### **Amerikanischer Leberkongress (AASLD), Boston, 2007:**

*Vortrag*

Nicole Forestier, **Simone Susser**, Martin W. Welker, Christine J. Weegink, Hendrik W. Reesink, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin

Telaprevir resistance mutations in patients with hepatitis C who relapsed after sequential therapy with telaprevir, peg-interferon alfa 2a and ribavirin

### **Internationales Symposium zu "Viral Kinetic Modeling", Frankfurt, 2008:**

*Vortrag*

**Simone Susser**, M. Zettler, **Christoph Welsch**, **Yalan Wang**, F.S. Domingues, I. Antes, T. Lengauer, E. Herrmann, S. Zeuzem, C. Sarrazin

HCV Resistance to Treatment with Peptidomimetic Protease Inhibitors: *In Vitro*, *In Silico* and Mathematical Models

**Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Berlin, 2008:***Vortrag***Simone Susser**, Markus Zettler, Anette Dragan, Eric Hughes, Robert Ralston, Xiao Tong, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin

Klonale Analyse von Mutationen der HCV NS3 Protease bei Genotyp 1 Non-Respondern, die mit Boceprevir (SCH503034) behandelt wurden

**Amerikanischer Leberkongress (AASLD), San Francisco, 2008:***Posterpräsentation*Forestier N, **Susser S**, Welker MW, Zeuzem S, Sarrazin C (2008)

Long-term follow-up of patients previously treated with telaprevir

**Europäischer Leberkongress (EASL Monothematic Conference), Paris, 2008:***Posterpräsentation***Simone Susser**, Martin W. Welker, Markus Zettler, Anette Wohnsland, Eric Hughes, Robert Ralston, Xiao Tong, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin.

Genotypic and phenotypic characterization of mutations within the HCV NS3 protease in HCV genotype 1 infected patients treated with the protease inhibitor boceprevir (SCH503034)

**Europäischer Leberkongress (EASL), Mailand, 2008:***Vortrag + Full Bursary***Simone Susser**, Markus Zettler, Christoph Welsch, Martin W. Welker, Anette Wohnsland, Eric Hughes, Robert Ralston, Xiao Tong, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin.

Genotypic and Phenotypic Characterization of Mutations within the HCV NS3 Protease in HCV Genotype 1 Infected Patients Treated with the Protease Inhibitor Boceprevir

**Europäischer Leberkongress (EASL), Kopenhagen, 2009:***Posterpräsentation*

**C. Welsch**, F.S. Domingues, **S. Susser**, T. Lengauer, S. Zeuzem, C. Sarrazin.

Molecular mechanisms of cross-resistance in peptidomimetic protease inhibitors for STAT-C

*Vortrag + Full Bursary*

**Susser S**, Forestier N, Welker MW, Vermehren J, Karey U, Zeuzem S, Sarrazin C.

Detection of resistant variants in the hepatitis C virus NS3 protease gene by clonal sequencing at long-term follow-up in patients treated with boceprevir

**Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hamburg, 2009:***Präsidentenposter*

**Simone Susser**, Nicole Forestier, Johannes Vermehren, Martin W. Welker, Ursula Karey, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin

Detektion resistenter Varianten im Hepatitis C Virus (HCV) NS3 Protease Gen durch klonale Sequenzanalysen im Langzeitverlauf von Patienten, die mit Boceprevir behandelt wurden

**16<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nizza, 2009:***Posterpräsentation*

Johannes Vermehren, **Simone Susser**, Ursula Karey, Nicole Forestier, Christian Lange, Eric Hughes, Robert Ralston, Xiao Tong, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin

Hepatitis C Virus (HCV) Genotype 1 non-responders sequentially treated with boceprevir (SCH503034) and/or pegylated interferon alfa-2b (PEG-IFN $\alpha$ -2b) – a clonal analysis of mutations selected in the HCV NS3 protease domain

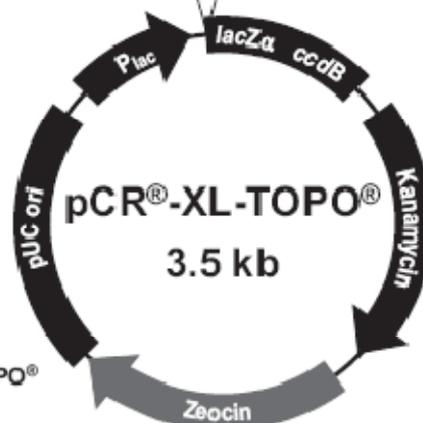
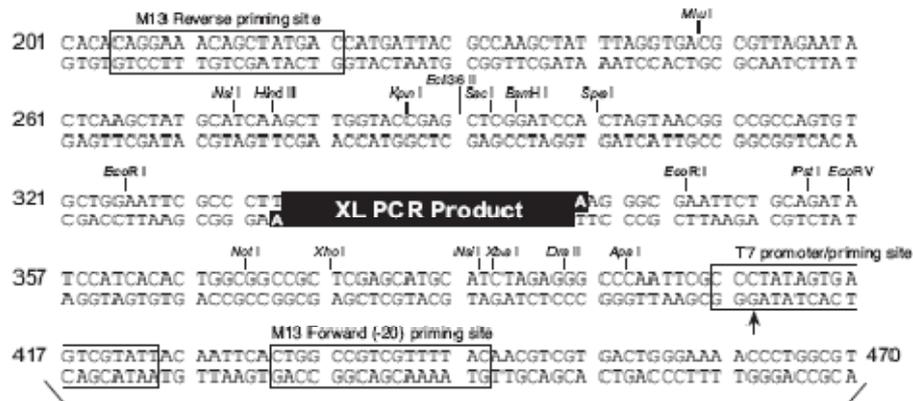
**Amerikanischer Leberkongress (AASLD), Boston, 2009:***Posterpräsentation*

Johannes Vermehren, **Simone Susser**, Ursula Karey, Nicole Forestier, Christian Lange, Eric Hughes, Robert Ralston, Xiao Tong, Stefan Zeuzem, Christoph Sarrazin.

Clonal analysis of mutations selected in the HCV NS3 protease domain of genotype 1 non-responders sequentially treated with boceprevir (SCH503034) and/or pegylated interferon alfa-2b (PEG-IFN  $\alpha$ -2b)

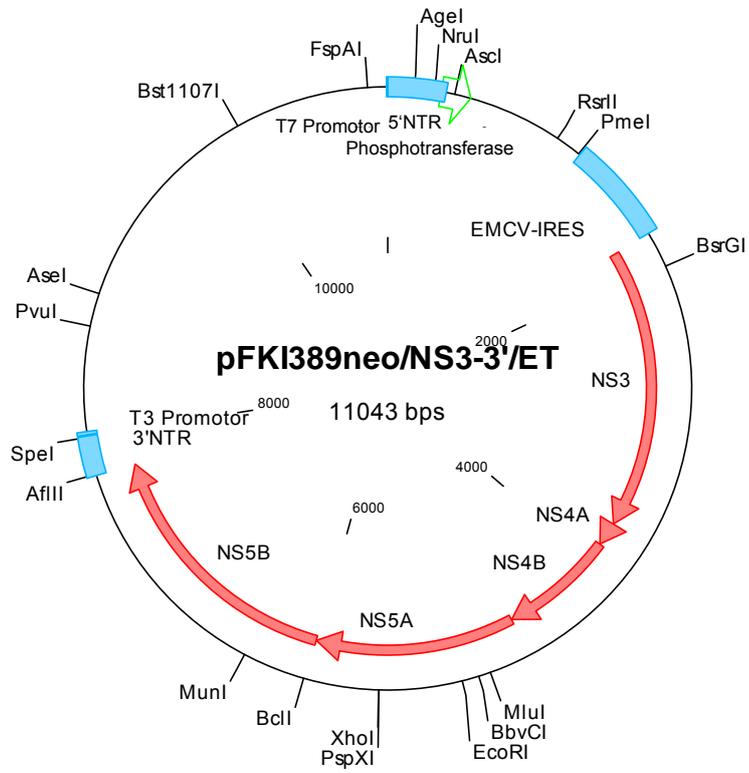
## Anhang

## Vektorkarte pCR®-XL-TOPO® Klonierungsvektor



**Comments for pCR®-XL-TOPO®**  
3519 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216  
 M13 Reverse priming site: bases 205-221  
 Lac Za ORF: bases 217-576  
 Multiple Cloning Site: bases 248-399  
 TOPO® Cloning site: bases 336-337  
 T7 promoter priming site: bases 406-425  
 M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448  
 Fusion joint: bases 577-585  
 ccdB lethal gene ORF: bases 586-888  
 Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031  
 Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612  
 pUC origin: bases 2680-3393

Vektorkarte pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/ET















```

7690      7700      7710      7720      7730      7740      7750      7760
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgtgccccgacccccgctggttcatgtggtgcctactcctactttctgtaggggtaggcatctatctactccccaaacgatg
R A R P R W F M W C L L L L S V G V G I Y L L P N R *

7770      7780      7790      7800      7810      7820      7830      7840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
aacggggagctaaacactccaggccaataggccaatcctgtttttttccctttttttttcttttttttttttttttttt

7850      7860      7870      7880      7890      7900      7910      7920
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ttttttttttttttttttctccctttttttttctctttttttctttttctttcctttggggctccatccttagccctagtcac

7930      7940      7950      7960      7970      7980      7990      8000
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ggctagctgtgaaaggctccgtgagccgcttgactgcagagagtgctgatactggcctctctgcagatcaagtaactactag

8010      8020      8030      8040      8050      8060      8070      8080
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tcccttttagtgagggtaattcaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttatagggttaatgcatga

8090      8100      8110      8120      8130      8140      8150      8160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
taataatggtttcttagacgtcagggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaaccctatttgttatttttctaaata

8170      8180      8190      8200      8210      8220      8230      8240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cattcaaatatgatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtat

8250      8260      8270      8280      8290      8300      8310      8320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tcaacatttccgtgtcgccttattcccttttttggggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgga

8330      8340      8350      8360      8370      8380      8390      8400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacctcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgag

8410      8420      8430      8440      8450      8460      8470      8480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
agttttcgcgccgaagaacgtttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccggtgttgga

8490      8500      8510      8520      8530      8540      8550      8560
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgccgggcaagagcaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagc

8570      8580      8590      8600      8610      8620      8630      8640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atcttacgatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtgataaactggcgccaacttactt

8650      8660      8670      8680      8690      8700      8710      8720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttg

8730      8740      8750      8760      8770      8780      8790      8800
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatggcaacaacgttgcgca

8810      8820      8830      8840      8850      8860      8870      8880
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
aactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgtcgagga

8890      8900      8910      8920      8930      8940      8950      8960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgggtat

8970      8980      8990      9000      9010      9020      9030      9040
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cattgcagcactggggccagatggtaagccctccgctatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatg

```





## Aminosäuresequenz Replikon

NS3 **Protease**/ **Helikase** – NS4A – **NS4B** – **NS5A** – NS5B

1 APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDRNQVEGEVQVVSTATQSFLATCVNGVCWTVYHGAG  
61 SKTLGAPKGPITQMYTNVDQDLVGWQAPPGARSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG  
121 DSRGSLSPRPVSYLKGSSGGPLLCPSGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFVPVESMETTMR  
181 SPVFTDNSSPPAVPQTFQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAYAAQGYKVLVLPNSVAATLGFGA  
241 YMSKAHGIDPNIRIGVRTITTTGAPITYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDSTTI  
301 LGIGTVLDQAE TAGARLVV LATA TP PGSVTV PHPNIEEVALSSTGEIPFYGKAIP IETIK  
361 GGRHLIFCHSKKKCDELA AKLSGLGLNAVAYYRGLDVSVIPTSGDVI VVATDALMTGFTG  
421 DFDSVIDCNTCVTQTVD FSLDPTFTIETTTPQDAVSR SQRRGRTGRGRMGIYRFVTPGE  
481 RPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETS VRLRAYLNTPGLPVCQDHLEFWESVFTGLT  
541 HIDA HFLSQT KQAGDNFPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKP TLHGPTPLLY  
601 RLGAVQNEVTTTHPITKYIMACMSADLEVV TSTWV LVGGVLAALAAAYCLTTGSSVIVGRI  
661 ILSGKPAIIPDREVL YREFDEMEECASHLPYIEQGMQLAEQFKQKAI GLLQTATKQAEAA  
721 APVVESKWR TLEAFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAIASLMAFTASITSP LTTQHT  
781 LLFNILGGWVAAQLAPPSAASAFV GAGIAGA AVGSI GLGTVLVDILAGY GAGVAGALVAF  
841 KVMSGEMPSTEDLVNLLPAILSPGALVVG VVCAAILRRHVGPGE GAVQWMNRLIAFASRG  
901 NHVSP THYVPESDAAARVTQILSSLTITQLLKR LHQWINE DCSTPCSGS WLRDVWDWICT  
961 VLTDFKTWLQSKLLPRLPGV PFFSCQRGYKGVWRGDGIMQTTCP CGAQITGHVKNGSMRI  
1021 VGPRTCSNTWHGTFPINAYTTGPCTPSPAPNYSRALWRVAEEYVEVTRV GDFHYVTGMT  
1081 TDNVK CPCQVPAP EFFEVDG VRLHRYAPACKPLLREEV TFLVGLNQYL VGSQ L PCEPEP  
1141 DVAVLTSMLTDP SHITAETA KRRLARGSPPSLASSASQLSAPSLKATCTTRHDS PDADL  
1201 IEANLLWRQEMGGNITRVESENKV VILDSFEPLQAEEDEREVS VPAEILRRSRKFPRAMP  
1261 IWARPDYNP LLESWKDPDYVPPV VHGCP LPPAKAPPIPPRRKRTVVLSESTVSSALAE  
1321 LATKTFGSSESSAVDSGTATASPDQPSDDGDAGSDVESYSSMPPELEGE PGDPDLSDGSWS  
1381 TVSEEASEDVVCCSMSYTW TGALITPCAAEETKLPINALSN SLLRHHNLVYATTSRSASL  
1441 RQKKVTFDRLQVLDDHYRDVLKEMKAKASTVKAKLLSVEEACKLTPPHSARSKFY GYKAKD  
1501 VRNLSSKAVNHIRSVWKD LLEDTETPIDTTIMAKNEVF CVQPEKGGRKPARLIVFPDLGV  
1561 RVCEKMALYDVVSTLPQAVMGSSYGFQYSPGQRVEFLVNAWKAKKCPMGFAYDTRCFDST  
1621 VTENDIRVEESIYQCCDLAPEARQAIRSLTERLYIGGPLTNSKGQNCGYRRCRASGV LTT  
1681 SCGNTLT CYLKAAAACRAAKLQDCTMLVCGDDL VVICESAGTQEDEASLRAFTEAMTRYS  
1741 APPGDPPKPEYDLELITSCSSNVSVAHDASGKR VYYLTRDPTT PLARA AWETARHTPVNS  
1801 WLGNIIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAQE QLEKALDCQIYGACYSIEPLDL PQIIQRLH  
1861 GLSAFSLHSYSPGEINRVASCLRKLGV PPLRVWRHRARSVRARLLSQGGR AATCGKYLFN  
1921 WAVRTK LKLTPIPAASQLDLSSWFVAGYSGGDIYHSLSRARPRWFMWCLLLL SVGVGIYL  
1981 LPNR