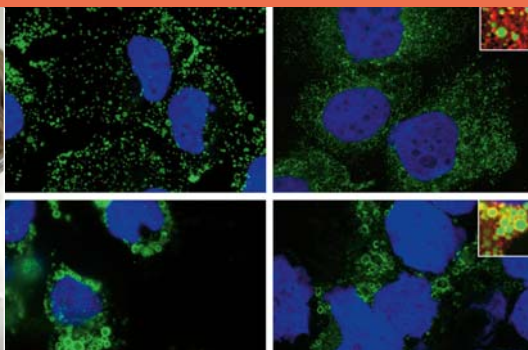


FORSCHUNGSBERICHT 2010/2011

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG



22 Grenzgänger der Hepatitis C Virus-Forschung

Prof. Dr. Thomas Pietschmann



Grenzgänger der Hepatitis C Virus-Forschung

KORRESPONDIERENDER AUTOR | Prof. Dr. Thomas Pietschmann | **Abteilung für Experimentelle Virologie** | TWINCORE | thomas.pietschmann@twincore.de | tpi07@helmholtz-hzi.de

CO-AUTOREN | Dr. Sandra Ciesek | Dr. Eike Steinmann | beide Abteilung für Experimentelle Virologie | TWINCORE

Die Übertragung der Hepatitis C erfolgt durch direkten Blut-Blut-Kontakt: Vor 1990 waren vorwiegend Bluttransfusionen ein Problem, inzwischen spielt die Transmission durch Blutprodukte zumindest in Deutschland aufgrund hochsensibler Tests keine Rolle mehr. Risikofaktoren sind heutzutage der unsterile Umgang mit Injektionsutensilien in nichtindustrialisierten Ländern sowie i.v. Drogenkonsum in industrialisierten Ländern. Auch bei Tätowierungen, Piercings, Akupunktur und bei medizinischen Eingriffen kann die Verwendung von unzureichend sterilisiertem Besteck zur Virusübertragung führen. Eher selten sind HCV-Infektionen auf Sexualverkehr mit Hepatitis-C-positiven Geschlechtspartnern zurückzuführen. Die Übertragung der Infektion von einer HCV-positiven Mutter auf ihr Kind vor oder während der Geburt kommt in bis zu vier Prozent der Fälle vor. Bei etwa einem Drittel der HCV-Patienten ist jedoch nicht mehr nachvollziehbar, wie das Virus übertragen wurde.

Die Hepatitis-C-Virus (HCV) Infektion ist mit weltweit etwa 130 Millionen Virusträgern eine der meist verbreiteten Infektionskrankheiten. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes leben in Deutschland etwa eine halbe Million Virusträger. In den USA und Europa sind schätzungsweise einhalb Prozent der Bevölkerung infiziert, in Ägypten und Zentralafrika ist die Rate mit bis zu 20 Prozent deutlich höher. Das Virus ist hochvariabel und kann deswegen dem Immunsystem immer wieder ausweichen. Anhand von Sequenzanalysen werden die Viren in sieben Genotypen eingeteilt, die mehr als 30% voneinander abweichen und unterschiedlich gut auf Medikamente ansprechen.

Eine Hepatitis-C-Virusinfektion durchläuft zwei Phasen: eine akute und eine chronische. In den ersten sechs Monaten nach der Infektion durchläuft der Patient die akute, meist symptomfreie Phase. Ein Teil der Patienten kontrolliert die Virusvermehrung in dieser akuten Phase und die Infektion heilt spontan aus. Bei der Mehrheit der Patienten (50 bis 90 Prozent) wird das Virus allerdings nicht eliminiert, und es kommt zur chronischen Infektion. Bisweilen treten unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit, Depressionen, Übelkeit, Oberbauchschmerzen und Verdauungsprobleme auf – oft wird die Infektion erst jetzt (viele Jahre nach der Ansteckung) bemerkt und nachgewiesen. Von den chronisch infizierten Patienten entwickeln wiederum bis zu 40 Prozent eine progrediente Lebererkrankung mit Ausbildung einer Leberzirrhose (Abbildung 1). Die HCV-Zirrhose ist außerdem einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Die Folgen einer chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion zählen zu den häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation³. Angesichts der weltweiten Verbreitung der HCV-Infektion, ihrer großen Häufigkeit und Morbidität, kommt diesem Erreger eine wichtige klinische Bedeutung zu.

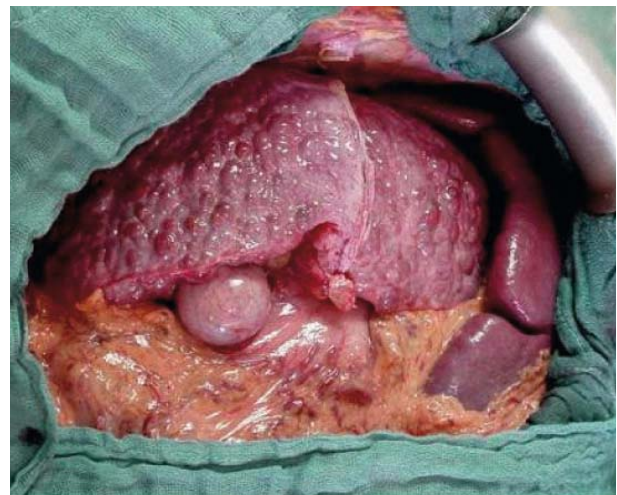


Abb. 1. Vergleich einer zirrhotischen (oben) mit einer gesunden Leber (unten). Foto: Twincore

Gegenwärtig stehen nur unzureichende Optionen für die Behandlung der Hepatitis C zur Verfügung. Seit Anfang der 90er Jahre wird die chronische HCV-Infektion mit Interferon alpha behandelt, einem Botenstoff des angeborenen Immunsystems, der in der Körperzelle Mechanismen zur Kontrolle einer Virusinfektion auslöst. Inzwischen wurde diese Therapie wesentlich optimiert. Der Einsatz von Interferon alpha (IFN-alpha) Derivaten mit längerer Halbwertszeit (pegyliertes Interferon) sowie die Kombination mit Ribavirin, einem Nukleosidanalogen, haben die Ansprechraten erheblich verbessert. Mit dieser Kombination lässt sich ein dauerhaftes virologisches Ansprechen bei 50% der Patienten mit dem HCV-Genotyp 1 erreichen, während bei Patienten mit Genotyp 2 und 3 Viren sogar in über 80% der Fälle ein dauerhafter Therapieerfolg erzielt wird¹². Neue, direkt antiviral wirkende Medikamente werden gegen Ende 2011 die Therapieoptionen verbessern. Allerdings sind diese Wirkstoffe leider nicht für die Behandlung aller viralen Genotypen geeignet. Da das Virus beim Einsatz dieser Verbindungen ohne weitere Medikamente (Monotherapie) sehr schnell resistent wird, ergänzen diese Präparate die Standardtherapie, können die nebenwirkungsreiche IFN-Ribavirin-Behandlung allerdings nicht ersetzen. So besteht weiter Bedarf für die Entwicklung neuer Therapieformen mit möglichst geringen Nebenwirkungen, genotypübergreifender Wirksamkeit und einer hohen Barriere gegen virale Resistenz.

In diesem Spannungsfeld zwischen grundsätzlichen Fragen, die das Virus aufwirft, und den klinischen Therapieanforderungen arbeiten wir am TWINCORE am HCV. Unser Team besteht aus Naturwissenschaftlern und Medizinern. Wir arbeiten eng mit der Abteilung für Chemische Biologie des HZI (Dr. Ronald Frank und Dr. Florenz Sasse) und mit der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie (Prof. Dr. Michael Manns) der MHH zusammen. Durch diese Zusammenarbeit mit HCV-Experten in der Klinik und Naturwissenschaftlern am HZI gelingt die Umsetzung eines translationalen Forschungsprogramms. Hierbei hilft die räumliche Nähe zur Medizinischen Hochschule Hannover, die eine pragmatische Umsetzung des Translationsgedankens erleichtert – etwa wenn junge Assistenzärzte gleichzeitig Forschungsprojekte aus ihrem medizinischen Umfeld am TWINCORE betreuen.

Basis für die gemeinsame Arbeit ist ein von uns entwickeltes Zellkultursystem für HCV. Auf dieser Grundlage können wir die Mechanismen der Virusreplikation in humanen Leberzellen in der Petrischale untersuchen, neue Therapieziele identifizieren und Wirkstoffe suchen, welche die Vermehrung der Viren stören. Wir nutzen dieses Modell aber auch, um HCV Übertragungsrisiken beispielsweise im Klinikumfeld oder im Drogenmilieu besser einzuschätzen zu können und um Desinfektionsmittel und Hygienemaßnahmen zu definieren, die das Virus sicher inaktivieren.

Die Entwicklung von HCV-Zellkulturmodellen Im Gegensatz zu Bakterien oder Pilzen sind Viren obligat intrazelluläre Parasiten. Sie haben keinen eigenen Stoffwechsel und sind deswegen auf geeignete Wirtszellen angewiesen. Die HCV-Replikation kann also nur in Zellkulturen untersucht werden – allerdings gelang es über Jahre hinweg nicht, ein Zellkultursystem für die Vermehrung von HCV zu entwickeln.

Erst zehn Jahre nach der Entdeckung von HCV konnten Lohmann und Bartenschlager einen wesentlichen Erfolg auf dem Weg zur Etablierung eines für die HCV-Vermehrung geeigneten Zellkulturmodells erzielen¹¹. Sie konstruierten HCV-„Minigenome“, so genannte subgenomische HCV-Replikons. Diese Replikons verfügen über alle viralen Proteine, die für die Vermehrung des Virusgenoms erforderlich sind. Allerdings tragen sie anstelle der Strukturproteine, welche für die Bildung neuer Viruspartikel benötigt werden, ein Resistenzgen. Man braucht dieses Resistenzgen, um Zellen, die Replikons aufnehmen, zu separieren: Nach dem Einschleusen der Replikons in die humane Hepatoma-Zelllinie Huh-7 wird diese Zelllinie mit einem Zellgift behandelt, das durch das Resistenzgen unschädlich gemacht wird. Es überleben nur die Zellen, welche die Replikons aufgenommen haben und diese effektiv vermehren (Abbildung 2). Ein System mit zwei wesentlichen Einschränkungen: Die Bildung und Freisetzung von Viren sowie der Infektionsprozess selber konnten nach wie vor nicht untersucht werden, da den subgenomischen Replikons die Strukturproteine fehlten.

Die Entdeckung, dass Retroviren, denen auf gentechnischem Wege die eigenen Hüllproteine entfernt wurden, die HCV-Hüllproteine E1 und E2 in funktioneller Art und Weise in ihre Virushülle aufnehmen, markierte einen weiteren wichtigen Meilenstein auf dem Weg zur Etablierung eines Zellkultursystems für HCV: So konnten Bartosch und Kollegen im Jahr 2003 zeigen, dass diese Mischviren

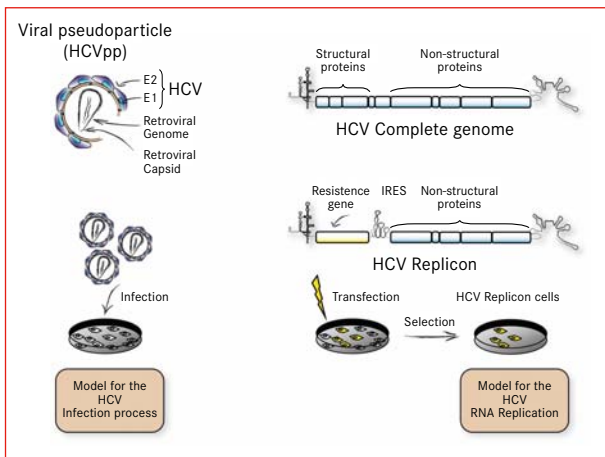


Abb. 2. Wichtige HCV Zellkulturmodellsysteme vor der Entwicklung des JFH1 Infektionssystems. IRES, Interne Ribosomen Eintrittsstelle. Grafik: Twincore

(„HCV-Pseudopartikel“; HCVpp) mit retroviralem Kern und einer HCV-typischen Virushülle präferenziell Leberzellen infizieren¹. Da die frühen Schritte der Infektion im Wesentlichen durch die Proteine in der Virushülle (im Fall der HCVpp die HCV E1- und E2-Proteine) vermittelt werden, stand erstmals ein System zur Verfügung, um den HCV-Infektionsprozess mit molekularbiologischer Technologie zu analysieren (Abbildung 2).

Die Entwicklungen der Jahre 2005 und 2006 schließlich waren es, die das HCV endlich den Methoden und Ansätzen der klassischen Virologie zugänglich machten. Gemeinsam mit Wakita und anderen Kollegen konnten wir zeigen, dass ein neues HCV-Isolat aus einem japanischen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis („Japanese Fulminant Hepatitis 1“; JFH1) in Huh-7 Zellen nicht nur effizient replizierte, sondern auch Viruspartikel in das Kulturmedium abgab¹⁵. Außerdem gelang uns der wichtige Beweis, dass diese Partikel („Cell culture grown HCV“; HCVcc) nicht nur in Zellkultur, sondern auch *in vivo* infektiös sind. Durch die Konstruktion von JFH1-Varianten mit Strukturproteinen anderer Virusisolate konnten wir die Effizienz des Infektionssystems noch wesentlich steigern¹³. Inzwischen sind von uns und auch anderen Arbeitsgruppen weitere HCV-Chimäre konstruiert worden. Auf diese Weise sind nun auch vergleichende Untersuchungen zwischen unterschiedlichen Isolaten hinsichtlich der Mechanismen der Virusbildung und -freisetzung sowie des Infektionsweges möglich.

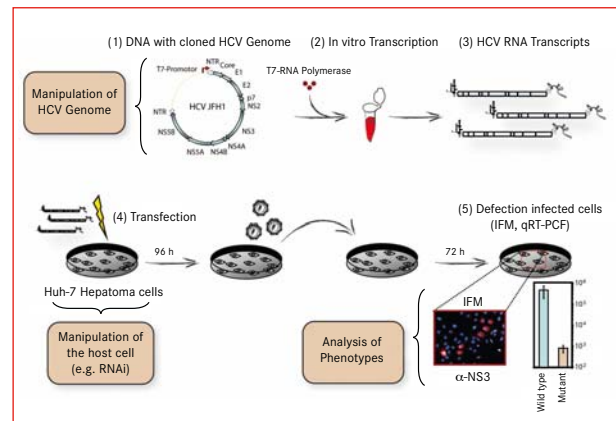


Abb. 3. Experimentelles Vorgehen zur Untersuchung der HCV Replikation mit Hilfe des JFH1 Infektionssystems. IFM, Immunfluoreszenz; qRT-PCR, quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion; RNAi, RNA-Interferenz. Grafik: Twincore

Mit Hilfe der Molekularbiologie können wir nun gezielt das Virusgenom oder die Wirtszelle manipulieren und anschließend den Einfluss dieser Veränderungen auf die Virusvermehrung charakterisieren (Abbildung 3). So gewinnen wir wichtige Erkenntnisse über essenzielle Interaktionen des Virus mit der Wirtszelle, seinen Fortpflanzungsweg in der Zelle, und wir können neue Ziele für die Entwicklung einer direkt antiviralen Therapie identifizieren. Darüber hinaus können neue Therapieverfahren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit geprüft werden. Damit ist unser HCV-Zellkulturmodell der zentrale Zugang, um klinisch relevante Fragen zu lösen, die in der HCV-Forschung derzeit aktuell sind.

Der Weg des Virus durch die Klinik Ein wichtiger Aspekt im Spannungsfeld HCV ist die Prävention, denn der Übertragungsweg von Blut zu Blut sollte mit geeigneten Hygienemaßnahmen beherrschbar sein. Besonders Übertragungen im Krankenhausumfeld und die Stabilität und Sensitivität von HCV gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln stehen im Fokus unserer Arbeit. Bisherige Untersuchungen und Erfahrungen beruhen aufgrund fehlender HCV-*in-vitro*-Modelle fast ausschließlich auf Studien mit dem bovinen Diarrhö-Virus (BVDV), das ein Verwandter des HCV ist und bereits seit geraumer Zeit kultiviert werden kann. Allerdings erlauben diese Studien mit dem Surrogatvirus für HCV nur bedingt zuverlässige Einschätzung über die Infektiosität des HCV.

Mit Hilfe unseres HCV-Infektionsmodells konnten wir zeigen, dass HCV bei Raumtemperatur nach 28 Tagen und bei 4°C sogar nach 150 Tagen noch infektiös ist⁵. Da HCV *in vivo* mit humanem Serum assoziiert ist, wurde der Einfluss von menschlichem Serum gesunder Patienten auf die Stabilität von HCV analysiert. Allerdings hatte die Anwesenheit von Serum keinen Einfluss auf die HCV Überlebensdauer. Auch die Inkubation von HCV auf verschiedenen Oberflächen wie Plastik, Stahl und Handschuhen zeigte eine vergleichbare Überlebensdauer des Virus.

Limitierender Faktor dieser Studie ist, dass bisher unbekannt ist, ob Zellkulturviren und natürlich vorkommende Viren wirklich genau die gleichen Eigenschaften besitzen. Allerdings stellen Zellkulturviren nach heutigem Stand der Forschung das beste Modell dar, weil *in vivo* Studien mit Schimpansen aus ethischen Gründen aber auch aus Kostengründen sehr umstritten sind.

Überraschenderweise konnte in dieser Studie auch nachgewiesen werden, dass die Detektion von HCV-RNA nicht mit der viralen Infektiosität von HCV korreliert. Verschiedene veröffentlichte Studien basieren jedoch auf dem Nachweis von HCV-RNA durch eine PCR. Das Wissen über die fehlende Korrelation zwischen der Detektion von HCV-RNA und der Infektiosität muss bei der Interpretation solcher Studien deshalb beachtet werden. Des Weiteren wurden zur Untersuchung der HCV-Inaktivierung unterschiedliche Alkohole und sieben kommerzielle Desinfektionsmittel auf ihre viruziden Eigenschaften getestet. Dabei konnten wir zeigen, dass bestimmte Desinfektionsmittel nur in unverdünnter Anwendung zu einer vollständigen Virus-Inaktivierung führten¹⁴. Zusammenfassend sind diese Daten für den klinischen Alltag und den sicheren Umgang mit HCV positivem Material von großer Relevanz.

Derzeit arbeiten wir an weiteren Studien, die sich mit der Stabilität von HCV in Körperflüssigkeiten wie Muttermilch oder Sperma beschäftigen, da auch diese potenziell viruzide Substanzen oder Viren enthalten könnten. Außerdem ist geplant, durch spezielle Carrierversuche das Verhalten und die Stabilität von HCV nach Antrocknung auf verschiedenen Oberflächen zu untersuchen. Dieses Wissen wird uns helfen, Übertragungsrisiken besser einschätzen und damit neue HCV Infektionen vermeiden zu können.

Der Einfluss von Immunsuppressiva auf HCV Kommt es zu einer Ansteckung mit HCV, durchläuft der Infektionsprozess in vielen Fällen die oben geschilderten Stadien, an deren Ende das Hepatitis C-assoziierte chronische Leberversagen stehen kann. Es zählt weltweit zu den häufigsten Gründen für eine Lebertransplantation³. Da in der Praxis weder neutralisierende Antikörper noch potente Medikamente zur Verfügung stehen, die den Wiedereintritt des Virus in die Leber vermeiden, lässt sich eine Reinfektion der transplantierten Leber derzeit nicht verhindern. Bei mehr als 95% der Patienten kommt es nach dem Eingriff zu einer Reinfektion des Transplantats mit dem Risiko der Entwicklung einer erneuten Leberzirrhose. Die Zeit zwischen Transplantation und der Entwicklung einer Leberzirrhose ist dabei in den letzten zehn Jahren immer kürzer geworden². So dauerte es bei Patienten, die im Jahre 1988/89 transplantiert wurden, im Mittel ungefähr 5 Jahre, bis sich der Zustand der Leber um eine Fibrosestufe verschlechtert hatte. Bei Patienten, die 1996 transplantiert wurden, betrug diese Zeitspanne nur noch ein Jahr. Mehrere mögliche Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen, wurden zwischenzeitlich identifiziert^{2,8,9}. Hinzu kommt, dass Patienten mit einer chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion nach Lebertransplantation einen schlechteren Verlauf zeigen als Patienten mit anderen Lebererkrankungen. Sie haben im Vergleich zu Patienten mit einer Alkohol- oder Hepatitis B-assoziierten Leberzirrhose, einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC; eine Lebererkrankung, bei der die Gallengänge zerstört werden) oder einer Autoimmunhepatitis eine schlechtere Prognose. Hierbei spielt die Art der nach der Transplantation eingesetzten Immunsuppressiva eine Rolle. Eine HCV-spezifisch optimierte Immunsuppression könnte zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufes bei diesen Patienten beitragen. Ein Ziel unserer Arbeit war, alle derzeit routinemäßig eingesetzten Immunsuppressiva systematisch auf ihren Einfluss auf den gesamten Lebenszyklus von HCV zu untersuchen. Also haben wir den Viruseintritt, die RNA-Replikation und die Freisetzung mit unserem neuen HCV *in-vitro*-System untersucht⁶.

In Bezug auf die Replikation wirken sowohl Cyclosporin A als auch Mycophenolsäure und FTY720 hemmend im Infektionsmodell^{6,7}. Andere häufig verwendete Immunsuppressiva wie Tacrolimus, Everolimus, Basiliximab und Prednisolon hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die HCV RNA-Replikation. Bei den Untersuchungen zum gesamten Lebenszyklus entdeckten wir wichtige Zusammenhänge: Es zeigte sich, dass die Inkubation mit höheren

Dosen von Prednisolon und anderen Steroiden während der Infektion zu einer vermehrten Infektiosität von HCV führte. Durch Zeitkinetikexperimente konnten wir nachweisen, dass HCV unter Steroidbehandlung schneller in die Leberzelle eindringen kann. Mithilfe retroviraler Pseudotypen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Steigerung der Infektiosität spezifisch für HCV, jedoch unabhängig vom Genotyp war. Zur weiteren Charakterisierung wurde dann der Einfluss von Prednisolon auf die für HCV bekannten Rezeptoren untersucht. Hier zeigte sich eine Steigerung der mRNA und der Proteinexpression von SR-BI und Occludin, zwei Proteinen, die essenzielle Komponenten des HCV-Rezeptorkomplexes sind.

Dieser Steroideffekt konnte durch den Glucocorticoidrezeptor-Inhibitor RU-486 aufgehoben werden. Dies belegt, dass diese Signalkaskade für den Einfluss auf die Rezeptorexpression und den HCV-Zelleintritt verantwortlich ist. Schließlich konnten wir in weiteren Untersuchungen zeigen, dass die Förderung der HCV-Infektion nicht nur auf die Hepatoma-Zelllinie Huh7.5 begrenzt ist: so führte die Inkubation von Prednisolon auch zu einer gesteigerten Infektion von DMSO-differenzierten Leberzellen und primären humanen Hepatozyten. Dieses Ergebnis korreliert somit mit der klinischen Erfahrung im Patienten: denn in verschiedenen klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass die Gabe von hohen Dosen von Steroiden, beispielsweise im Rahmen einer Abstoßungsbehandlung, mit einem Anstieg der HCV-Viruslast und einer Zunahme der Hepatitis assoziiert ist⁸. Dementsprechend könnte die Vermeidung von hoch dosierten Steroiden dazu beitragen, den klinischen Verlauf nach der HCV-induzierten Lebertransplantation zu verbessern.

Hepatitis C – nicht nur in der Leber? Bislang hat sich die Forschung an HCV vorwiegend auf die Leber konzentriert – eine naheliegende Fokussierung, da sich die Symptome vorwiegend auf die Schädigung dieses Organs zurückführen lassen. Bei genauerer Betrachtung löst eine Infektion mit HCV jedoch auch noch eine Reihe andere Symptome aus, die nicht unbedingt in einem direkten Zusammenhang mit der Leberentzündung stehen. Patienten mit einer chronischen HCV-Infektion zeigen vielfach zusätzlich unterschiedliche Störungen des Nervensystems. Häufig treten das Chronische Müdigkeits-Syndrom, Depressionen und kognitive Störungen auf. Allerdings ist unklar, ob diese Symptome auf eine direkte HCV-Replikation im Gehirn und den peripheren neuronalen Zellen zurück zu führen ist, oder auf indirekte Effekte am zentralen und peripheren

Nervensystem. Deswegen haben wir untersucht, ob Wirtszellen aus diesen Geweben – darunter menschliche Neuroblastoma- und Glioblastoma-Zelllinien und Mikroglia Zellen – HCV-Partikel aufnehmen und das Virus vermehren können⁴. In diesem Zusammenhang sind wir auf die humane periphere Neuroblastoma-Zelllinie SKNMC gestoßen, die sämtliche HCV-Eintrittsfaktoren präsentiert und effizient von unseren HCV Pseudopartikeln (HCVpp) infiziert wurde. Allerdings haben unsere Untersuchungen ebenfalls gezeigt, dass sich das Virus in diesen Zellen nicht vermehren kann. Dennoch deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass HCV durchaus in verschiedene nichthepatische Zelltypen eindringen und mit diesen Reservoirs den Krankheitsverlauf beeinflussen kann.

Kleine Moleküle gegen ein ungelöstes Problem Die Therapieoptionen gegen HCV sind derzeit noch unbefriedigend. Zwar befinden sich eine Reihe direkter antiviraler Substanzen in der klinischen Entwicklung, aber unerwünschte Arzneimittelwirkungen, Resistenzbildung und genotypspezifische antivirale Aktivität führen nach wie vor zu Einschränkungen. Aus diesem Grund wird weiter nach neuen Therapiewegen gesucht. Im Fokus stehen Kombinationen gut verträglicher Wirkstoffe, die an unterschiedlichen Stellen des HCV-Replikationszyklus ansetzen. So soll eine rasche Resistenzbildung vermieden werden.

Um niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die unterschiedliche Schritte des HCV-Replikationszyklus stören, haben wir einen neuen Dual-Reporter-Gen-Assay entwickelt und gemeinsam mit Wissenschaftlern am HZI für Hochdurchsatz-Screening-Verfahren angepasst (Abbildung 4). Es bildet den gesamten HCV-Lebenszyklus ab und ermöglicht deswegen prinzipiell die Identifizierung von Hemmstoffen gegen jeden einzelnen Schritt der viralen Vermehrung¹⁰. Das System basiert auf einem HCV-Reporter-virus, das das Gen für ein Luziferase-Enzym des Leuchtkäfers trägt (F-Luc; *firefly luciferase*). Die Wirtszellen, die für die Vermehrung von HCV verwendet werden, haben wir ebenfalls mit einem Luziferase-Gen – das des Tiefseekrebses *Gaussia* (G-Luc; *gaussia luciferase*) – ausgestattet. Da die beiden Luziferasen unterschiedliche Substrate nutzen und sich nicht gegenseitig beeinflussen, werden in einem Arbeitsgang gleichzeitig die Vermehrung des HCV und die Vitalität der Zellen bestimmt. Auf diese Weise können wir antiviral wirkende Verbindungen von Hemmstoffen des Zellwachstums und zytotoxischen Molekülen unterscheiden – also die Spreu vom Weizen trennen. Zunächst haben wir das System anhand bekannter HCV-Inhibitoren für den Zelleintritt, die Replikation und den Austritt validiert.

Anschließend haben wir aus der Substanzbibliothek des HZI niedermolekulare Verbindungen aus Myxobakterien getestet. Aus diesem Screening sind eine Reihe von Verbindungen hervorgegangen, die entweder den Zelleintritt des Virus in die Leberzellen verhindern oder deren Vermehrung beziehungsweise Wiederaustritt aus der Zelle. Aus diesen Molekülen hoffen wir, gemeinsam mit unseren Partnern am HZI und den Myxobakteriologen um Rolf Müller am HIPS, Leitstrukturen für neue HCV-Inhibitoren entwickeln zu können. Parallel wollen wir diese Substanzen nutzen, um besser zu verstehen, wie sich HCV in Leberzellen vermehrt (Abbildung 5). In dieser Hinsicht bieten uns die myxobakteriellen Naturstoffe einen einmaligen Zugang, zellbiologische Prozesse zu manipulieren und zu beobachten, wie HCV davon beeinflusst wird. Für diese Zwecke sind durchaus auch die Verbindungen interessant, welche die Vermehrung von HCV steigern. Verstehen wir erst, welche Prozesse in der Zelle dafür verantwortlich sind, können wir in Zukunft Wege finden, dieses Zusammenspiel des Virus mit der Zelle für therapeutische Zwecke zu nutzen.

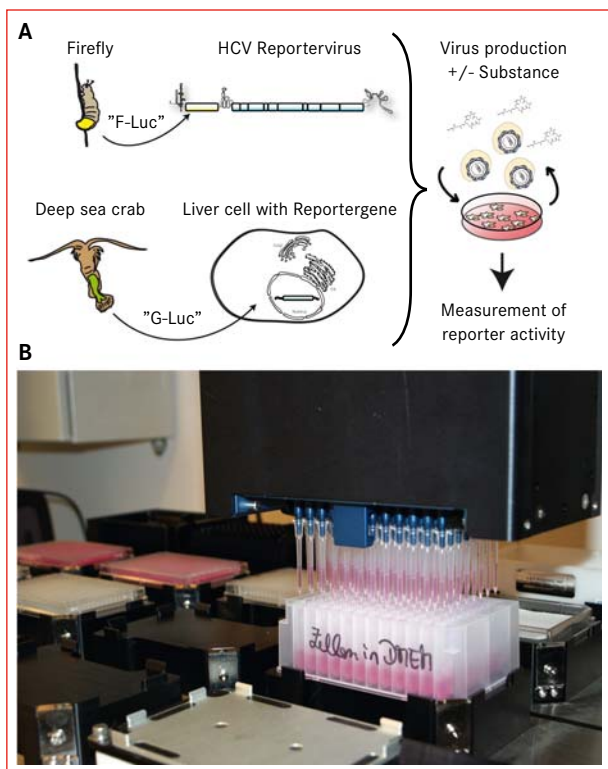


Abb. 4. HZI Pipettierroboter im S3* Sicherheitslabor zur Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings. Grafik & Foto: Twincore

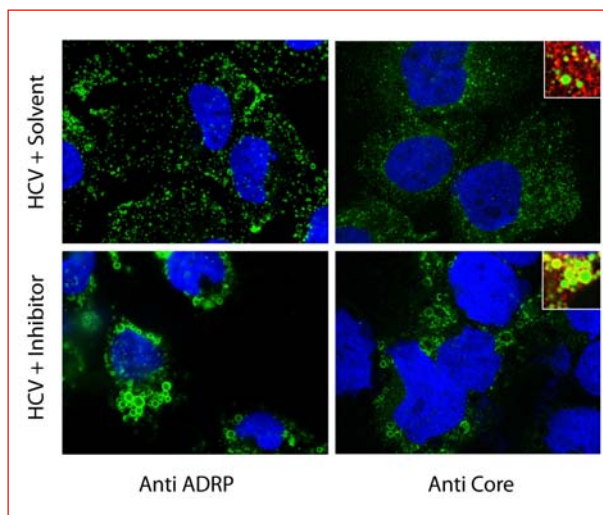


Abb. 5. Einfluss kleiner Moleküle mit antiviraler Wirkung gegen HCV auf die Bildung von lipid droplets in Leberzellen. HCV-infizierte Zellen wurden mit Solvens oder einem Inhibitor inkubiert. Lipid droplets wurden mit einem anti-ADRP Antikörper (links) oder einem Lipidfarbstoff grün gefärbt (kleines Bild). HCV-Core wurde mit einem core-spezifischen Antikörper nachgewiesen (rechts und rote Markierung im kleinen Bild). Inkubation mit dem Inhibitor führt zur Vergrößerung und Aggregation von lipid droplets sowie zur Anreicherung von HCV Core an deren Oberfläche.

Grafik: Twincore



Prof. Pietschmann und seine Arbeitsgruppe. Foto: Twincore/HZI



Thomas Pietschmann geboren 1971 in Würzburg, studierte Biologie mit Schwerpunkten in Biochemie, Tierphysiologie, Virologie und Immunbiologie an der Universität Würzburg und der Duke University (Durham, NC, USA). Nach Abschluss des Studiums 1996 erwarb er den Grad des Dr. rer. nat. in Biologie am Institut für Virologie der Universität Würzburg und arbeitete als Postdoc am Institut für Virologie in Mainz und in der Abteilung für Molekulare Virologie der Universitätsklinik Heidelberg. Dort etablierte Thomas Pietschmann eine unabhängige Forschergruppe, die sich mit der Morphogenese und dem Eintrittsmechanismus des Hepatitis-C-Virus beschäftigte. Ab 2006 wurde seine Gruppe durch ein Emmy Noether-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Im Frühjahr 2007 wurde er mit seiner Arbeitsgruppe an das TWINCORE berufen. Dort leitet er die Abteilung Experimentelle Virologie.



Sandra Ciesek geboren 1978 in Goslar, studierte in Göttingen und Hannover Medizin und promovierte mit Auszeichnung bei Prof. M. P. Manns und Dr. H. Wedemeyer in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der MHH. Für ihre Promotion erhielt Sandra Ciesek diverse Preise und arbeitet seitdem sowohl als Assistenzärztin in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, als auch als stipendiengeförderte Wissenschaftlerin am TWINCORE bei Prof. Thomas Pietschmann. Mit einer über einen DFG-Einzelantrag geförderten Stelle erforscht sie am TWINCORE den Einfluss von Cyclosporin A auf das Hepatitis-C-Nichtstrukturprotein NS2.



Eike Steinmann geboren 1978 in Bremen, studierte Biologie an der Leibniz Universität Hannover – mit dem Fokus auf Virologie, Mikrobiologie und Molekularbiologie. Nach einem DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst)-Stipendium für einen Aufenthalt an der Northeastern University in Boston fertigte er seine Diplomarbeit bei Prof. Herrler am Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover an. Für die Arbeiten zum PhD wechselte Eike Steinmann in die Abteilung für Molekulare Virologie der Universitätsklinik Heidelberg und forschte in der Gruppe von Prof. Bartenschlager an der Funktion des p7-Proteins im HCV-Replikationszyklus. Mit seinem Betreuer Prof. Thomas Pietschmann wechselte er dann an das TWINCORE. Seine Forschung konzentriert sich auf verschiedene Aspekte des HCV-Zusammenbaus und seiner Freisetzung, sowie die Suche nach neuen antiviralen Targets. Weiterhin untersucht er die Umweltstabilität und Empfänglichkeit des HCV für Desinfektionsmittel.

Literatur

1. Bartosch, B., Dubuisson, J., & Cosset, F. L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 633-642.
2. Berenguer, M., Prieto, M., San Juan, F., Rayon, J. M., Martinez, F., Carrasco, D., Moya, A., Orbis, F., Mir, J., & Berenguer, J. (2002) Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* **36**, 202-210.
3. Brown, R. S. (2005) Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* **436**, 973-978.
4. Bürgel B, Friesland M, Koch A, Manns MP, Wedemeyer H, Weissenborn K, Schulz-Schaeffer WJ, Pietschmann T, Steinmann E & Ciesek S (2010) Hepatitis C virus enters human peripheral neuroblastoma cells - evidence for extra-hepatic cells sustaining hepatitis C virus penetration. *Journal of Viral Hepatology* Jun 23 [Epub ahead of print].
5. Ciesek, S., Friesland, M., Steinmann, J., Becker, B., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Steinmann, J., Pietschmann, T., & Steinmann, E. (2010) How stable is the hepatitis C virus (HCV)? Environmental stability of HCV and its susceptibility to chemical biocides. *Journal of Infectious Diseases* **201**, 1859-1866.
6. Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F. A., Wappler, I., Manns, M. P., Wedemeyer, H., & Pietschmann, T. (2010) Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* **138**, 1875-1884.
7. Ciesek, S., Steinmann, E., Wedemeyer, H., Manns, M. P., Neyts, J., Tautz, N., Madan, V., Bartenschlager, R., von Hahn, T., & Pietschmann, T. (2009) Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A. *Hepatology* **50**, 1638-1645.
8. Forman, L. M., Lewis, J. D., Berlin, J. A., Feldman, H. I., & Lucey, M. R. (2002) The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* **122**, 889-896.
9. Gane, E. J., B. C. Portmann, N. V. Naoumov, H. M. Smith, J. A. Underhill, P. T. Donaldson, G. Maertens, and R. Williams. 1996. Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *New England Journal of Medicine* **334**:815-820.
10. Gentsch, J., Hinkelmann, B., Kaderali, L., Irschik, H., Jansen, R., Sasse, F., Frank, R., & Pietschmann, T. (2011). Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity. *Antiviral Research* **89**(2), 136-148.
11. Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999) Replication of sub-genomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**,110-113.
12. Manns, M. P., Wedemeyer, H., & Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* **55**, 1350-1359.
13. Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., & Bartenschlager, R. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 7408-7413.
14. Steinmann, J., Becker, B., Bischoff, B., Paulmann, D., Friesland, M., Pietschmann, T., Steinmann, J., & Steinmann, E. (2010) Virucidal activity of 2 alcohol-based formulations proposed as hand rubs by the World Health Organization. *American Journal of Infection Control* **38**, 66-68.
15. 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. *Nature Medicine* **11**, 791-796.