

Jan Krönke

Dr. med.

Inhibition der Replikation des Hepatitis-C-Virus durch RNA-Interferenz

Geboren am 05.05.1979 in Mainz

Staatsexamen am 07.06.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. R. Bartenschlager

Weltweit sind 170 Millionen Menschen mit HCV infiziert. Die chronische Infektion mit HCV führt zu Hepatitis, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Die Kombinationstherapie mit Interferon- α und Ribavirin führt nur bei 50% der Patienten zu einer dauerhaften Heilung. In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass *short interfering RNAs* (siRNAs) die Replikation von HCV in Zellkultur inhibieren. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt, die insbesondere die hohe Mutationsrate von HCV berücksichtigen, die es dem Virus erlaubt, durch den Austausch einer einzelnen Base in der Zielsequenz dem Angriff durch siRNAs zu entgehen. Die erste Methode beruht auf der Transfektion von sogenannten Endoribonuklease präparierten siRNAs (esiRNAs) in humane Hepatomzellen mit subgenomischen oder genomischen HCV-Replikons. Diese esiRNAs bestehen nicht nur aus einer einzelnen siRNA, die nur eine Sequenz von 19 Nukleotiden abdeckt, sondern aus vielen unterschiedlichen siRNAs, die insgesamt eine Zielsequenz von bis zu 1000 Nukleotiden abdecken. Die gegen verschiedene Abschnitte, unter anderem der hochkonservierten 5'NTR, eingesetzten esiRNAs zeigten alle einen dosisabhängigen antiviralen Effekt auf subgenomische und genomische HCV-Replikons. Allerdings war der Effekt genotypspezifisch, da gegen HCV-Genotyp 1b gerichtete esiRNAs einen sehr viel schwächeren Effekt auf Genotyp 1a Replikons hatten und umgekehrt.

Die zweite Methode beruht auf der retroviralen Transduktion einer Transkriptionseinheit zur intrazellulären Synthese von sogenannten *small hairpin RNAs* (shRNAs). Diese Methode erlaubte die effiziente Reduktion der Expression des zellulären Proteins p53, das als Marker für die Wirksamkeit des Versuchsansatzes diente, sowie der Replikation der HCV-Replikons. Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Escapemutanten zu minimieren, richteten sich

die meisten der 12 untersuchten HCV-spezifischen shRNAs gegen die bei allen HCV-Genotypen hochkonservierte 5'NTR. Die Transduktion von subgenomische HCV-Replikons enthaltende Huh7-Zellen ergab, dass vor allem gegen die Domäne IV der 5'NTR in der Nähe des Startcodons gerichtete shRNAs in der Lage waren, die HCV-Replikation effektiv zu hemmen. Naive Huh7-Zellen erwiesen sich als resistent gegenüber HCV-Replikons, wenn sie die gleichen shRNAs exprimierten. Diese Ergebnisse zeigen den potenziellen therapeutischen Nutzen von siRNAs bei der Behandlung der chronischen Hepatitis C.