

Noemi Schäfer

Dr. med.

Establishment of a replication assay for Hepatitis C virus wild type isolates in cell culture

Fach/Einrichtung: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. Volker Lohmann

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein umhülltes Positivstrang-RNA-Virus aus der Familie der Flaviviridae. Weltweit sind rund 58 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert, was zu circa 300 000 Todesfällen im Jahr führt. Mit der Einführung sogenannter „direct-acting antivirals“ (DAAs) ab 2011 verbesserte sich die HCV Behandlung drastisch, sodass aktuell über 90% der Patienten ein anhaltendes virologisches Ansprechen („sustained virological response“, SVR) zeigen. Es existieren jedoch immer noch Patienten, welche schlecht auf die Behandlung ansprechen oder einen Rückfall erleiden, teilweise aufgrund des Auftretens resistenter Virusvarianten. Außerdem ist bis heute keine protektive Impfung gegen das Virus verfügbar. HCV repliziert schlecht in Zellkulturen, was die Möglichkeiten der Forschung zur Untersuchung von Wildtyp (WT) HCV Isolaten unter kontrollierten Bedingungen einschränkt. Ziel meines Projekts war es daher, eine Methode zur Kultivierung von WT HCV in Zellkultur aus dem Serum infizierter Patienten zu entwickeln und einen Workflow zu etablieren, welcher Resistenz-/Sensitivitätstests mit alternativen Therapeutika ermöglichte.

Im ersten Schritt wurden die Bedingungen für die WT HCV Replikation in der Hepatomzelllinie Huh7 optimiert. Dies gelang durch die Kombination zweier bereits publizierter Strategien: Der Hemmung der Phosphatidylinositol-4-Kinase III alpha (PI4KA) / Casein-Kinase I alpha (CKIa) und der Überexpression von SEC14L2. PI4KA ist eine zelluläre Lipidkinase, welche essenziell für die Replikation von HCV ist, in Huh7 Zellen jedoch in zu hohen Mengen vorliegt. Die CKIa Hemmung vermindert die Hyperphosphorylierung eines HCV-Proteins und fördert hierdurch die virale Replikation. SEC14L2 ist ein lipidbindendes Protein, welches zwar in gesunden Hepatozyten, jedoch nicht in Huh7 Zellen exprimiert wird. Dessen Überexpression in Huh7 Zellen verstärkt ebenfalls nachweislich die WT HCV Replikation. Anschließend etablierte ich einen Workflow, welcher sich für Serum-Infektionstests einschließlich Resistenz- und Sensitivitätstests mit den beiden alternativen

Therapeutika Alisporivir und Legalon SIL eignete. Als negative Kontrolle diente die Behandlung mit Daclatasvir, einem NS5A-Inhibitor aus der HCV Therapie. Die Bestimmung der viralen Replikation erfolgte mittels zweier Methoden: Zum einen wurde HCV RNA mittels Standard-RT-qPCR aus der extrahierten Gesamt-RNA verwendeter Zellen nachgewiesen. Alternativ wurde ein MAVS-GFP-Reportersystem genutzt, welches von der Huh7-Lunet-Zelllinie exprimiert wurde. Hierbei liegt GFP im Zytosol nicht infizierter Zellen vor und wird bei einer Infektion durch proteolytische Spaltung mittels der HCV Protease NS3-4A in den Zellkern verlagert. Um diesen zweiten Readout zu optimieren, entwickelte ich eine automatisierte, bildbasierte Analyse, welche infizierte Zellen über die Kolo-kalisation von DAPI und GFP mithilfe eines machine learning Programms quantifizierte.

Nach Abschluss der Etablierung testete ich eine Kohorte von 27 Seren chronischer HCV Patienten. Nur ein Serum, welches von einem Patienten nach Lebertransplantation stammte und einen außergewöhnlich hohen Titer aufwies, ermöglichte den Nachweis von HCV Replikation sowohl in RT-qPCR als auch in der bildbasierten Analyse. Ich schloss hieraus, dass die Infektionskapazität von HCV Seren mit regulären Titern im Allgemeinen zu gering war, und fokusierte mich daraufhin in einer zweiten Runde auf Seren mit hohen Viruslasten. Bei 10 von 29 dieser neu getesteten Seren gelang es mir, eine aktive HCV Replikation nachzuweisen. Die bildbasierte Analyse erwies sich hierbei als die robustere und verlässlichere Nachweismethode aufgrund mehrerer Faktoren. Beispiele waren die Tatsache, dass diese einen Nachweis von Infektionen auf Einzelzellebene ermöglichte, oder dass hier input RNA im Kontrast zu RT-qPCR keinen Störfaktor darstellte.

Infektionen mit Patientenseren könnten durch viele verschiedene Faktoren eingeschränkt sein, wie zum Beispiel toxische Serumbestandteile, beschädigte Viruspartikel aufgrund physikalischer Einflüsse, neutralisierende Antikörper, unzureichende Skalierbarkeit und vieles mehr. Daher etablierte ich als zusätzlichen Assay die Transfektion von aus Serum extrahierter viraler RNA, um so einige der Einschränkungen des Infektionsansatzes zu eliminieren. Nach einem Vergleich von Elektroporation und Liposomen-basierter Transfektion etablierte ich einen RNA-Transfektionsassay unter Verwendung von Elektroporation. Darüber hinaus wurden zwei Methoden zur Konzentration größerer Serummengen vor RNA-Extraktion verglichen, um auch Seren mit niedrigem Titer testen zu können. 10 Patientenseren wurden daraufhin sowohl mit den Infektions- als auch dem Transfektionsassay getestet, und hinsichtlich ihrer Ergebnisse verglichen.

Zusammenfassend entwickelte ich zwei Assays, welche HCV WT Replikation aus Patientenisolaten in Zellkultur ermöglichten. Beide Ansätze enthielten zwei Nachweismethoden: Die Bestimmung der viralen Kopienzahl mittels RT-qPCR und den mikroskopischen Nachweis infizierter Zellen unter Verwendung einer neu eingeführten bildbasierten Analyse. Darüber hinaus boten sie die Möglichkeit, Resistenz- und Sensitivitätstests für alternative Therapieschemata durchzuführen. Hierfür wurde ein Workflow etabliert und erfolgreich mit einem Post-Transplantationsserum getestet. Insgesamt wurden 61 Seren von HCV-infizierten Patienten analysiert, wobei eine erfolgreiche HCV WT Replikation in 18 Fällen nachgewiesen werden konnte. Hierdurch konnte ich zeigen, dass die Replikation von WT Patientenisolaten möglich war, und mithilfe der neu etablierten bildbasierten Analyse sogar exakt quantifiziert werden konnte. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse konnten außerdem potentielle Determinanten für eine erfolgreiche HCV WT Replikation in Zellkultur diskutiert werden. Abschließend konnte ich zeigen, dass mit Patientenisolaten arbeitende Ansätze viele Vorteile bieten und für zahlreiche weitere zukünftige Fragestellungen verwendet werden könnten.