

AUS DER KLINIK FÜR GASTROENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE UND ENDOKRINOLOGIE
DER MEDIZINISCHEN HOCHSCHULE HANNOVER

Einfluss von Lipoproteinrezeptoren und lipidsenkenden Medikamenten auf den Hepatitis-C-Replikationszyklus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
RINA MAREKE ÖTJENGERDES
aus Hannover

Hannover 2023

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule am 19.08.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Thomas von Hahn

1. Referentin: PD Dr. rer. nat. Martina Mühlenhoff

2. Referentin: Prof. Dr. med. Hortense Slevogt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2024

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. med. Torsten Witte

1. Prüfer: Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt

2. Prüferin: Prof. Dr. med. Bettina Wedi

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	II
Einleitung	1
Hepatitis-C-Virus	1
Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr	2
Lipidsenkende Medikamente	3
Zielsetzung	6
Publikation	7
Weitere Ergebnisse	31
Material und Methoden	31
CETP-Inhibitor Obicetrapib hat keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt	32
CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Torcetrapib beeinflussen den HCV- Replikationszyklus	33
CETP-Inhibitor Obicetrapib beeinflusst möglicherweise die HCV-Infektion in lipoproteinrezeptordefizienten Zellen.....	35
Diskussion	37
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44
Danksagung	52
Lebenslauf	53
Erklärung nach § 2 Absatz 2 Nr. 7 und 8 Promotionsordnung	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT	Alanin-Aminotransferase
apo	Apolipoprotein
AST	Aspartat-Aminotransferase
CC ₅₀	mittlere zytotoxische Konzentration
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
DAA	direkt antiviral wirkende Substanzen (engl. <i>direct-acting antivirals</i>)
DKO	Doppel-Knockout (hier SR-B1- und LDLr-KO)
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fluc	Firefly-Luciferase
GP	Glykoprotein
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCV _{cc}	von Zellkulturen abgeleitetes (engl. <i>cell culture derived</i>) HCV
HCV _{pp}	HCV-Pseudopartikel (engl. <i>pseudoparticle</i>)
HDL	High-Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
Huh-7.5	Human hepatoma-derived 7.5
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
kb	Kilobasen
KO	Knockout
LD	Lipidtröpfchen (engl. <i>lipid droplet</i>)
LDL	<i>low-density</i> -Lipoprotein
LDLr	<i>low-density</i> -Lipoproteinrezeptor
LVP	lipovirales Partikel
M	molar (mol/L)
MLV	murines Leukämievirus
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NANBH	Non-A/Non-B-Hepatitis
Nluc	Nanoluciferase
PCSK9	Proprotein-Convertase-Subtilisin/Kexin Typ 9
PEG-INF	pegyliertes Interferon
PPAR- α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α
pp	Pseudopartikel
RLU	relative Lichteinheit (engl. <i>relativ light unit</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1, SCARB-1
VLDL	<i>very-low-density</i> -Lipoprotein
WHO	World Health Organization

EINLEITUNG

Hepatitis-C-Virus

Im Jahr 2020 wurden Harvey J. Alter, Charles M. Rice und Micheal Houghton für die Entdeckung des Hepatitis-C-Virus (HCV) mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Ihre Auszeichnung unterstreicht die jahrelange Erfolgsgeschichte in der Erforschung und Behandlung des HCV.

In den 1970er Jahren kam es gehäuft zu transfusionsabhängigen Hepatitiden, die nicht auf eine Infektion mit den damals kurz zuvor entdeckten Viren Hepatitis-A-Virus oder Hepatitis-B-Virus zurück zuführen waren. Die sogenannte Non-A/Non-B-Hepatitis (NANBH) wurde erst 1989 als Hepatitis-C-Virus identifiziert (1,2). Selbst heute, 40 Jahre nach seiner Entdeckung, stellt eine chronische Infektion mit HCV eine Herausforderung für die globale Gesundheit dar.

Während etwa 18–34% der akuten Infektionen spontan ausheilen, kann es unbehandelt bei 60–80% der Infizierten zu einer chronischen Infektion kommen (3).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organization*) schätzt, dass weltweit etwa 58 Millionen Menschen chronisch mit Hepatitis-C infiziert sind (4). Eine chronische Infektion mit HCV ist Ursache für Lebererkrankungen. Sie kann zu Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom führen (3). Für das Jahr 2019 verzeichnete die WHO weltweit etwa 290 000 Todesfälle durch die Folgen chronischer HCV-Infektionen (4).

Einen Durchbruch in der Therapie der HCV-Infektion stellte die Entwicklung und Einführung direkt antiviral wirkender Substanzen (engl. *direct-acting antivirals*, DAAs) dar, die eine vollständige Heilung der Infektion ermöglichen können (5–7).

Aufgrund der guten Wirtsanpassung bleibt eine chronische HCV-Infektion jedoch oft jahrelang unentdeckt. In den USA werden schätzungsweise nur 50% der HCV-Infektionen entdeckt und behandelt (8). Um in Zukunft eine wirksame Prävention leisten zu können, bleibt es daher notwendig die Interaktionen zwischen Wirt und Virus eingehend zu studieren.

Das Hepatitis-C-Virus ist ein behülltes, positiv-strängiges RNA-Virus aus der Familie der *Flaviviridae*. Es wird in 7 Genotypen unterschieden (9), die sich weltweit unterschiedlich häufig verteilen (10). Das 9,6 kb große Genom (11) kodiert für die Strukturproteine Core, E1, E2 und die Nichtstrukturproteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (12).

Das Protein p7 ist ein kleines, hydrophobes, integrales Molekül, das Ionenkanäle formt und während des Zusammenbaus und der Virusfreisetzung von Bedeutung ist (13,14). Während NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B mit unterschiedlichen Funktionen an der Replikation beteiligt sind (15), hat NS2 eine tragende Rolle beim Zusammenbau des Virus (16).

Das sogenannte Core-Protein umgibt die Einzelstrang-RNA und gemeinsam formen beide Strukturen das Nukleokapsid. Die Glykoproteine E1 und E2 formen ein Heterodimer und bilden eingebettet in einer von der Wirtszelle abgeleiteten Lipidschicht die Hülle des HCV (17,18).

Zwischen dem HCV-Replikationszyklus und dem Fettstoffwechsel der Wirtszelle besteht eine enge Beziehung, da in allen Schritten der Virusvermehrung Lipide eine zentrale Rolle spielen. Vermutlich wird dadurch die Fähigkeit des Virus lange Zeit vom menschlichen Immunsystem unerkannt zu bleiben begünstigt.

In Blutseren HCV-infizierter Patienten liegt HCV als lipoviraler Partikel (LVP) vor. Es wird assoziiert mit den Lipoproteinen *very-low-density* Lipoprotein (VLDL) und *low-density* Lipoprotein (LDL) gefunden (19,20). Die LVPs bestehen neben dem Nukleokapsid und den Glykoproteinen E1 und E2 aus freiem Cholesterol, Triglyzeriden, und unterschiedlichen Apolipoproteinen (apo), wie apoB und apoE (21–23).

Über die Bindung an den *low-density* Lipoproteinrezeptor (LDLr) und den *high-density* Lipoproteinrezeptor *scavenger receptor class B type 1* (SR-B1) auf der Wirtszelloberfläche gelangen die LVPs in die Wirtszelle (24–26). In neu geordneten Membranvesikeln der Wirtszellmembran, dem sogenannten *membranous web*, findet durch die Nichtstrukturproteine die Replikation des viralen Genoms statt (27). Der Zusammenbau der Viruspartikel erfolgt in räumlicher Nähe zu zytosolischen Lipidtröpfchen (LD, engl. *lipid droplets*) und anschließend erfolgt die Reifung und Freisetzung der LVPs über den VLDL-Sekretionsweg (28,29).

Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr

Sowohl SR-B1, als auch LDLr scheinen eine Rolle während des Eintritts von HCV in die Wirtszelle zu spielen. Während die Funktion des SR-B1-Rezeptors weitgehend unstrittig ist, bleibt die genaue Rolle des LDLr weiterhin ungeklärt.

Der Viruseintritt in die Wirtszelle erfolgt über die Bindung von SR-B1 an apoE und Glykoprotein E2 des LVP, wodurch die Bindung von CD81 an E2 vermittelt wird (25,30,31). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Eintritt von HCV und anderen Flaviviren über den LDLr erfolgen kann (24). Weitere Studien zeigten, dass LDLr an apoE bindet und damit den HCV-Eintritt vermittelt (32,33). In anderen Studien wiederum wurde vermutet, dass der LDLr weniger für den Eintritt des Virus verantwortlich ist, sondern vielmehr eine Rolle während der Replikation spielt (34). 2017 zeigten Yamamoto *et al.*, dass LDLr die Funktion von SR-B1 übernehmen kann und

beide Rezeptoren eine ähnliche Funktion im HCV-Eintritt zu haben scheinen (26). Der genaue Mechanismus über den der LDLr den Eintritt von LVPs in die Wirtszelle vermittelt bleibt weiterhin unklar.

Physiologisch, spielen die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel menschlicher Zellen. Sie vermitteln die Aufnahme von Cholesterinen in die Zelle. SR-B1, auch SCARB-1 genannt, bindet *high-density* Lipoprotein (HDL) und vermittelt so die Cholesterinaufnahme in die Zelle. Der Rezeptor wird überwiegend in der Leber und den Nebennieren exprimiert (35). SR-B1 ist ein Transmembranprotein, das aus einer extrazellulären, zwei transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne besteht (36).

LDLr ist ein membranständiger Rezeptor, der die endozytische Aufnahme von LDL in die Zelle vermittelt und in nahezu allen Körperzellen exprimiert wird (37,38). ApoB100 und apoE, die den überwiegenden Proteinanteil von LDL ausmachen, sind die natürlichen Liganden des LDLr. Nach erfolgreicher Endozytose und Internalisierung von LDL, unterliegt der LDLr einem Recycling: Durch zytosolische pH-Änderungen dissoziieren Rezeptor und Ligand, und der LDLr gelangt erneut zur Zelloberfläche, um wiederholt an einen Liganden binden zu können (37).

Lipidsenkende Medikamente

Ein hoher LDL-Cholesteringehalt im Serum kann langfristig zu Atherosklerose führen und ist ein Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (39). Um dieses Risiko zu vermindern, werden häufig lipidsenkende Medikamente verordnet. Über unterschiedliche Mechanismen wird der Gehalt an LDL im Serum des Patienten reduziert. Seit 1997 hat die Anwendungsprävalenz von Statinen, der bekanntesten Gruppe lipidsenkender Medikamente, in Deutschland deutlich zugenommen. Zwischen 2008 und 2011 nahmen 26,9% der Studienteilnehmer in der Altersklasse zwischen 65 und 79 Jahren ein Statin ein (40). Damit stellen Statine ein weit verbreitetes Medikament dar. Zu den zugelassenen lipidsenkenden Medikamenten, die in dieser Arbeit diskutiert werden, zählen neben den Statinen auch Fibrate und Proprotein-Convertase-Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) -Inhibitoren. Die Cholesterinester-Transferprotein (CETP) -Inhibitoren, konnten in klinischen Studien bislang nicht überzeugen und haben daher noch keine Zulassung erhalten können.

Statine hemmen die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), indem sie die aktive Bindestelle blockieren (41). Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase blockiert den Mevalonat-Weg der Cholesterinsynthese und führt zu einer verminderten Cholesterolproduktion, was über einen Feedbackmechanismus zu einer gesteigerten Produktion von LDLr führt (42). Statine könnten über die Hemmung des Mevalonat-Weges unterschiedliche Effekte auf die Zelle haben, die nicht nur in direktem Zusammenhang mit einer veränderten Cholesterolproduktion stehen (43).

Fibrate reduzieren in Patienten mit Hyperlipidämie die Konzentration von Cholesterin, Triglyceriden und LDL-Cholesterin und erhöhen die Konzentration von HDL-Cholesterin im Serum. Hauptsächlich wirken Fibrate über die Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors α (PPAR- α), der eine zentrale Rolle im menschlichen Lipoprotein Metabolismus spielt. Darüber hinaus bewirken Fibrate eine Aktivierung der Lipolyse, fördern die Aufnahme von Fettsäuren, hemmen die hepatische Triglyceridproduktion, verbessern die Affinität von LDLr an LDL, reduzieren den Austausch von Lipiden zwischen VLDL und HDL und fördern die HDL-Produktion, indem sie den reversen Cholesterin-Transport fördern (44,45).

Das Enzym PCSK9 wird hauptsächlich in Leber, Nieren, Kleinhirn und Dünndarm exprimiert (46). PCSK9 bindet an die extrazelluläre Domäne des LDLr in Hepatozyten und führt durch verstärkten lysosomalen Abbau des LDLr zum reduzierten LDLr-Recycling und einer verminderten Dichte von LDLr auf der Zelloberfläche (47,48). PCSK9-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper, die das Rezeptorrecycling fördern, die Dichte von LDLr erhöhen und damit die LDL-Konzentration im Serum vermindern (49,50).

Das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) vermittelt den Transport der Cholesterolester von HDL zu apoB-enhaltenden LDL und VLDL im Austausch für Triglyceride (51). In Patienten mit einer genetischen Mutation des CETP-Gens, konnte beobachtet werden, dass eine verminderte CETP-Aktivität mit einer Reduktion von LDL-Cholesterin, apoB und einer Steigerung von HDL-Cholesterin in Serum einhergeht (52). CETP-Inhibitoren bilden einen Komplex mit CETP und HDL, was zu einer Inaktivierung der CETP-Funktion und einem verminderten Lipidtransfer führt (53). Schlussendlich führt dies sowohl zu einer Verminderung der LDL- und apoB-Konzentration als auch zu einer Steigerung der HDL-Konzentration im Serum (54).

Bislang konnte in einigen klinischen Studien der Nutzen von CETP-Inhibitoren nicht gegenüber den Nebenwirkungen überwiegen (55–57). In der randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten REVEAL-Studie konnte gezeigt werden, dass der CETP-Inhibitor Anacetrapib die Konzentration von Nicht-HDL-Cholesterin deutlich senken konnte, keine signifikanten Nebenwirkungen bestehen und auch das Auftreten von koronaren Events vermindert ist (58). Dennoch waren die Ergebnisse im Vergleich zur bestehenden lipidsenkenden Therapie nicht stark genug, um eine Zulassung und weitere Forschung voranzutreiben. Kürzlich konnte in einer Phase-2-Studie gezeigt werden, dass der CETP-Inhibitor Obicetrapib in Kombination mit einer Statintherapie in Patienten mit Dyslipidämie, die LDL-Cholesterin-Konzentration um bis zu 51% senken kann. Außerdem wurden über den Beobachtungszeitraum von 8 Wochen die Konzentrationen von apoB im Serum vermindert und die Konzentration von HDL-Cholesterin im Vergleich zu der Placebogruppe deutlich gesteigert (59). Auch wenn CETP-Inhibitoren bislang nicht für therapeutische Zwecke zugelassen sind, zeigen sie Effekte auf den Fettstoffwechsel der Zelle.

Über ihre unterschiedlichen Wirkmechanismen nehmen lipidsenkende Medikamente in Hepatozyten direkten Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Es liegt daher Nahe, dass lipidsenkende Medikamente auch Einfluss auf den HCV-Replikationszyklus haben könnten.

Der Effekt von Statinen auf den HCV-Replikationszyklus wurde besonders *in vivo* kontrovers diskutiert.

In vitro zeigten Ye und Wang *et al.*, dass Lovastatin einen Effekt auf die Replikation des HCV hat und diese vermindert. Durch die Gabe von Mevalonat oder Geranylgeraniol konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass Lovastatin eine Wirkung auf die Geranylgeranylierung hat und dies notwendig für die HCV-Replikation sein könnte (60). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die gängigsten Statine, mit Ausnahme von Pravastatin, die Replikation von HCV reduzieren. In Kombination mit Interferon- α konnte ein verstärkter antiviraler Effekt beobachtet werden (61,62). Später zeigte sich, dass für die antivirale Wirkung von Statinen auf die HCV-Replikation die Induktion von Hämoxxygenase-1 (HO-1) notwendig zu sein scheint (63). Blanchet *et al.* zeigten, dass Statine, mit Ausnahme von Pravastatin, den HCV-Eintritt dosisabhängig beeinflussen können. Während bei niedrigen Statinkonzentrationen eine erhöhte HCV-RNA gemessen wurde, hemmten niedrige Konzentrationen den Viruseintritt (64).

Diese Effekte auf den HCV-Replikationszyklus konnten für Pravastatin nicht nachgewiesen werden (62,64), was vermuten lässt, dass neben der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase andere Wirkmechanismen für die Interaktion mit HCV notwendig sein könnten.

In klinischen Studien, die die *in vivo* Ergebnisse widerspiegeln, zeigten sich kontroverse Ergebnisse. In HCV-Infizierten Patienten konnte gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Fluvastatin eine Reduktion der HCV-RNA bewirken kann (65). Andere Studien konnten keinen antiviralen Effekt in HCV-Infizierten mittels Statintherapie feststellen (66,67). Ein große longitudinale, nationale Kohortenstudie unter HCV-infizierten Veteranen (ERCHIVES), zeigte, dass Statine das Ansprechen auf eine antivirale Therapie verbessern und gleichzeitig einen positiven Effekt auf die leberspezifischen Langzeitfolgen einer HCV-Infektion zu haben scheinen (68). Wurde die PEG-IFN/Ribaverin-Therapie um Fluvastatin ergänzt, konnte in chronisch mit HCV infizierten Patienten ein viraler Rückfall minimiert werden und die virale Ansprechrate verbessert werden (69).

Die Wirkung von Fibraten auf den HCV-Replikationszyklus ist bislang wenig erforscht. Bereits 1999 wurde ein Zusammenhang zwischen dem HCV, dem Lipidmetabolismus und Fibraten gefunden. Sabile und Perlemuter *et al.* zeigten, dass das HCV Core-Protein an apoAII bindet. Außerdem konnte in HepG2 Zellen unter Gabe von Fenofibrat eine gesteigerte Expression von sowohl apoAII, als auch dem HCV Core Protein beobachtet werden (70). In Leberbiopsien HCV-infizierter Patienten zeigte sich außerdem, dass die Expression von PPAR- α mRNA vermindert ist (71). In einer klinischen Studie zeigte

sich, dass unter Therapie mit Bezafibrat, HCV-RNA bei chronisch HCV infizierten Patienten abnahm (72). Später wurde gezeigt, dass die Therapie mit Bezafibrat in Patienten mit fortgeschrittener chronischer HCV-Infektion die Reduktion der Leberenzyme AST/ALT bewirkt und damit während einer HCV-Infektion einen leberprotektiven Effekt hat (73).

Auch die Rolle von PCSK9 während einer HCV-Infektion ist bislang unklar. Es scheint im Rahmen einer HCV-Infektion jedoch eine Rolle zu spielen. Während einer Infektion mit HCV nimmt die Zahl von LDLr auf der Hepatozytenoberfläche zu, wohingegen die Proteinexpression von PCSK9, das die Degradation von LDLr fördert, abnimmt (74). Eine verstärkte Expression von membrangebundenem PCSK9 scheint die Expression von CD81 und LDLr zu vermindern (75). Im Gegensatz dazu wurde für den PCSK9-Inhibitor Alirocumab gezeigt, dass dieser die Expression des Oberflächenrezeptors CD81 nicht verändert. Es wurde kein Einfluss auf HCV-Eintritt und -Replikation beobachtet (76).

CETP-Inhibitoren wurden bislang wenig im Zusammenhang mit einer HCV-Infektion erforscht. Dennoch scheint CETP während einer HCV-Infektion beeinflusst zu sein. In Patienten mit aktiver HCV-Infektion wurde eine erhöhte Konzentration von CETP im Serum festgestellt (77).

Trotz einiger Studien wird deutlich, dass der Einfluss lipidsenkender Medikamente auf den HCV-Replikationszyklus noch weitgehend unklar ist.

Zielsetzung

Die vorangegangenen Studien zeigen auf, dass der HCV-Replikationszyklus eng mit dem Fettstoffwechsel der Zelle verbunden ist. Dennoch scheint es noch immer unklar zu sein, wie die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr in den Eintritt des Virus involviert sind.

Diese Arbeit soll weitere Hinweise sammeln, wie einzelne Komponenten des Fettstoffwechsels der Zelle mit dem HCV-Replikationszyklus interagieren. Der Fokus wird insbesondere auf die vermeintlich redundante Funktion des SR-B1-Rezeptors und LDLr im HCV-Replikationszyklus gelegt. Hierzu werden LDLr- und SR-B1-Defiziente Knockout-Mutanten charakterisiert und auf ihre Suszeptibilität gegenüber HCV untersucht.

Kern dieser Arbeit soll die Untersuchung des Einflusses von lipidsenkenden Medikamenten auf den HCV-Replikationszyklus sein. Ihr Einfluss soll auf den HCV-Eintritt, den gesamten HCV-Replikationszyklus und auf die HCV-Infektion in lipoproteinrezeptordefizienten Zellen untersucht werden. Als lipidsenkende Medikamente werden in dieser Arbeit ausgewählte Vertreter der Gruppe der Statine, Fibrate, PCSK-9-Inhibitoren und im Weiteren auch CETP-Inhibitoren dienen.

PUBLIKATION

Die dieser Dissertation zugrundeliegende Publikation mit dem Titel „Interdependent Impact of Lipoprotein Receptors and Lipid-Lowering Drugs on HCV Infectivity“ von Zapatero-Belinchón und Ötjengerdes *et al.* wurde 2021 im peer-reviewed MDPI Journal „Cells“ veröffentlicht (78).

Autoren: **Francisco J. Zapatero-Belinchón**, **Rina Ötjengerdes**, Julie Sheldon, Benjamin Schulte, Belén Carraquí-Madroñal, Graham Brogden, Laura M. Arroyo-Fernández, Florian W. R. Vondran, Benjamin Maasoumy, Thomas von Hahn, Gisa Gerold

Die Verwendung der Publikation in dieser Dissertation erfolgte im Sinne der open access Creative Commons Attribution (CC-BY) license nach § 3 der Terms of Use (<https://res.mdpi.com/data/mdpi-terms-of-use.pdf>, Stand 04. Mai 2023).






Mein Anteil umfasste in Zusammenarbeit mit den anderen Wissenschaftlern die Durchführung der Experimente, Analyse der Ergebnisse, Darstellung der Daten, das Schreiben der ersten Version des Manuskriptes und das Überarbeiten des Manuskriptes wie in der Publikation unter *Author contribution* ausführlich aufgelistet.

Im Detail umfasste meine Arbeit die Untersuchung des Einflusses von lipidsenkenden Medikamenten auf den HCV-Eintritt und auf die Zellviabilität (Fig. 1), Experimente zur Untersuchung des Einflusses von lipidsenkenden Medikamenten auf die HCV-Infektion im HCVcc-Modell und auf die Zellviabilität (Fig. 2A), Durchführung von Western Blots zur Charakterisierung der Expression von SR-B1 und LDLr in den lipoproteinrezeptordefizienten Zelllinien (Fig. 3B, Fig. S1A), in Zusammenarbeit mit Francisco J. Zapatero-Belinchón die Quantifizierung des Cholesterolgehaltes in lipoproteinrezeptordefizienten Zellen (3E), Experimente zum Einfluss des HCV-GT1a-Eintrittes in den lipoproteinrezeptordefizienten Zellen (Fig. 4A, Fig. S2A) und den Einfluss von lipidsenkenden Medikamenten auf den HCV-Replikationszyklus und die Zellviabilität in lipoproteinrezeptordefizienten Zellen (Fig. 5).

Die retrospektive *in vivo*-Studie einer HCV-Kohorte (Fig. 6) wurde von Benjamin Schulte und Benjamin Maasoumy durchgeführt und ist nicht Gegenstand dieser Dissertation.

Article

Interdependent Impact of Lipoprotein Receptors and Lipid-Lowering Drugs on HCV Infectivity

Francisco J. Zapatero-Belinchón ^{1,2,3,4,5,6,7,†} , Rina Ötjengerdes ^{1,2,3,4,†}, Julie Sheldon ¹, Benjamin Schulte ^{2,4} , Belén Carriqui-Madroñal ^{1,7}, Graham Brogden ^{1,7}, Laura M. Arroyo-Fernández ⁷ , Florian W. R. Vondran ^{4,8}, Benjamin Maasoumy ^{2,4}, Thomas von Hahn ^{2,9,*}  and Gisa Gerold ^{1,5,6,7,*} 

- ¹ Centre for Experimental and Clinical Infection Research, Institute for Experimental Virology, TWINCORE, 30625 Hannover, Germany; Francisco.Zapatero@tiho-hannover.de (F.J.Z.-B.); Rina.M.Oetjengerdes@stud.mh-hannover.de (R.Ö.); julie.sheldon@twincore.de (J.S.); Belen.Carriqui@tiho-hannover.de (B.C.-M.); Graham.Brogden@tiho-hannover.de (G.B.)
- ² Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany; Schulte.Benjamin@mh-hannover.de (B.S.); Maasoumy.Benjamin@mh-hannover.de (B.M.)
- ³ Institute of Molecular Biology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany
- ⁴ German Center for Infection Research (DZIF), Hannover-Braunschweig Site, 38124 Braunschweig, Germany; Vondran.Florian@mh-hannover.de
- ⁵ Department of Clinical Microbiology, Virology, Umeå University, SE-90185 Umeå, Sweden
- ⁶ Wallenberg Centre for Molecular Medicine (WCMM), Umeå University, SE-90185 Umeå, Sweden
- ⁷ Department of Biochemistry & Research Center for Emerging Infections and Zoonoses (RIZ), University of Veterinary Medicine Hannover, 30559 Hannover, Germany; Laura.Maria.Arroyo.Fernandez@tiho-hannover.de
- ⁸ Department of General, Visceral and Transplant Surgery, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany
- ⁹ Department of Gastroenterology, Hepatology and Interventional Endoscopy, Asklepios Hospital Barmbek, Semmelweis University, Campus Hamburg, 22307 Hamburg, Germany
- * Correspondence: t.hahn@asklepios.com (T.v.H.); gisa.gerold@tiho-hannover.de (G.G.)
- † These authors contributed equally.
- ‡ These authors contributed equally.



Citation: Zapatero-Belinchón, F.J.; Ötjengerdes, R.; Sheldon, J.; Schulte, B.; Carriqui-Madroñal, B.; Brogden, G.; Arroyo-Fernández, L.M.; Vondran, F.W.R.; Maasoumy, B.; von Hahn, T.; et al. Interdependent Impact of Lipoprotein Receptors and Lipid-Lowering Drugs on HCV Infectivity. *Cells* **2021**, *10*, 1626. <https://doi.org/10.3390/cells10071626>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 28 May 2021
Accepted: 25 June 2021
Published: 29 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The HCV replication cycle is tightly associated with host lipid metabolism: Lipoprotein receptors SR-B1 and LDLr promote entry of HCV, replication is associated with the formation of lipid-rich membranous organelles and infectious particle assembly highjacks the very-low-density lipoprotein (VLDL) secretory pathway. Hence, medications that interfere with the lipid metabolism of the cell, such as statins, may affect HCV infection. Here, we study the interplay between lipoprotein receptors, lipid homeostasis, and HCV infection by genetic and pharmacological interventions. We found that individual ablation of the lipoprotein receptors SR-B1 and LDLr did not drastically affect HCV entry, replication, or infection, but double lipoprotein receptor knock-outs significantly reduced HCV infection. Furthermore, we could show that this effect was neither due to altered expression of additional HCV entry factors nor caused by changes in cellular cholesterol content. Strikingly, whereas lipid-lowering drugs such as simvastatin or fenofibrate did not affect HCV entry or infection of immortalized hepatoma cells expressing SR-B1 and/or LDLr or primary human hepatocytes, ablation of these receptors rendered cells more susceptible to these drugs. Finally, we observed no significant differences between statin users and control groups with regards to HCV viral load in a cohort of HCV infected patients before and during HCV antiviral treatment. Interestingly, statin treatment, which blocks the mevalonate pathway leading to decreased cholesterol levels, was associated with mild but appreciable lower levels of liver damage markers before HCV therapy. Overall, our findings confirm the role of lipid homeostasis in HCV infection and highlight the importance of the mevalonate pathway in the HCV replication cycle.

Keywords: hepatitis C virus; SR-B1; LDLr; lipid metabolism; lipoprotein receptor; lipid-lowering drug; statin; fibrate; PCSK9-inhibitor; HMG-CoA-reductase inhibitor; HCV

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infects 71 million people and causes approximately four hundred thousand deaths annually [1]. Chronic infection can lead to hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma, and is the leading cause of liver transplantation worldwide [2]. Since the discovery and approval of direct-acting antiviral agents (DAA) [3], almost all infections can be cured by drug treatment if available [4,5]. Nonetheless, to this day, HCV remains a highly prevalent pathogen that is uniquely adapted to its human host and able to evade the host immune system without causing general immunosuppression.

The ability of HCV to fly under the radar of the immune system may partly be due to the HCV replication cycle being tightly intertwined with the host's lipid metabolism. In HCV-infected patients, HCV is found in association with very-low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) in the so-called lipoviral particle (LVP) [6,7], which may shield virions from immune recognition. Inside the cell, HCV replication is associated with the formation of a double-membrane replication compartment known as "membranous web" [8]. During HCV assembly, viral structural and non-structural proteins hijack lipid droplets and the VLDL secretory pathway for the assembly and secretion of the LVPs [9,10].

Interestingly, these HCV LVPs have been proposed to exploit LDL and high-density lipoprotein (HDL) receptors, namely scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) and low density lipoprotein receptor (LDLr), for productive cell entry [11–13]. In agreement with this model, both LVP-embedded apolipoprotein E (apoE) and viral envelope glycoprotein E2 have been shown to bind to SR-B1 and thereby facilitate subsequent binding of E2 to CD81 [11,14]. On the other hand, the role of LDLr in the HCV entry life cycle is still controversial [15–17]. Whereas some studies have proposed that LDLr mediates cell attachment via the LVP component apoE [16,17], others have reported that LDLr may have a role in viral replication [15]. Finally, a landmark study by Yamamoto and colleagues indicated, for the first time, that LDLr and SR-B1 may have a redundant role in HCV entry [13]. In this study, generation of individual genetic knock-outs (KOs) of LDLr or SR-B1 had a modest impact on HCV infection, but genetic ablation of both receptors had a much more pronounced effect. Importantly, this effect could be rescued by overexpression of either SR-B1 or LDLr individually. However, the effect of genetic ablation of lipoprotein receptors on cellular cholesterol content and expression of HCV entry factors remained elusive.

Lipid-lowering drugs (LLDs) are used for the treatment of hyperlipidemia with LDL being the most important target lipid species since its levels are strongly associated with cardiovascular risk [18]. Since the liver plays a central role in lipid metabolism, LLDs impact liver homeostasis (including lipoprotein receptor expression) and consequently, they may influence permissiveness of hepatocytes to HCV infection. In addition, altered serum lipoprotein levels may influence the infectivity of HCV LVPs. Currently, there are mainly three different classes of LLD in clinical use: statins, fibrates, and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors [18]. These LLDs decrease blood LDL levels by different mechanisms. Statins are known to interact with the binding site of 3-hydroxy-3methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and thereby inhibit the mevalonate pathway which leads to a decreased de novo cholesterol synthesis in hepatocytes and consequently increased expression of cell surface LDLr [19,20]. Fibrates induce the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) transcription factors which in turn activate the synthesis of HDL and increase the activity of lipoprotein lipases [21]. Furthermore, fibrates increase fatty acid uptake, reduce triglyceride production, decrease exchange of cholesteryl ester and triglyceride between VLDL and HDL, and increase the affinity between LDLr and LDL [22]. Lastly, PCSK9 is an enzyme that promotes LDLr cell surface internalization and lysosomal degradation [23,24]. PCSK9-inhibitors are humanized antibodies (abs) that specifically bind and block serum PCSK9 resulting in a higher density of LDLr on the cell surface [25].

The effects of individual LLDs on the HCV replication cycle have been previously addressed [26–33]. Statins seem to have a multimodal mode of action with regard to HCV replication [26–28]. For instance, it has been shown that inhibition of geranylgeranylation by statins hinders HCV replication [26]. Alternatively, Blanchet et al. described a dual proviral/antiviral effect on the entry of HCV that was dependent on the drug dose in vitro. At low concentrations statins upregulate LDLr and thereby HCV entry, while at higher concentrations statins downregulate the HCV entry cofactor Claudin-1 (CLDN1) and inhibit virus entry [27]. Finally, Wuestenberg and colleagues showed that statins inhibit HCV replication in vitro through the induction of the heme degrading enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) and induction of the interferon response [28]. The combination of statins with interferon or DAAs has synergistic effects that reduce HCV RNA levels and prevent the rise of resistant variants [29,30]. Interestingly, all these in vitro studies observed a lack of antiviral activity for pravastatin suggesting that the suppression of HMG-CoA reductase activity might not be the main determinant of HCV inhibition [26–28].

In vivo, the efficiency of statins is strongly debated [34–36]. A retrospective study of HCV chronically infected patients routinely attending the clinic failed to show a correlation between statin therapy and decreasing viral loads [35]. However, in a randomized controlled trial, combination of pegylated interferon therapy with statins increased the sustained viral response (SVR) and reduced the relapse rate of chronically infected patients [37]. Moreover, an analysis of the longitudinal Electronically Retrieved Cohort of HCV Infected Veterans (ERCHIVES) revealed that patients treated with statins in addition to HCV therapy had a higher SVR and lower liver disease progression over 24 months after HCV treatment [36]. Although the interplay between statins and HCV has been extensively studied, the impact of fibrates and PCSK9 inhibitors during HCV infection is much less clear. For fibrates, early reports suggested that fenofibrate intervention increases secretion of apolipoprotein all (apoAll) and HCV core (C) in HepG2 cells [32]. It was later shown that clofibrate intervention of humanized C/OTg mice inhibit HCV replication by activation of antiviral host factor quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT) [33]. Although initial clinical studies suggested a beneficial effect of bezafibrate addition on serum viral loads of HCV infected patients, it was subsequently shown that this observation was associated with lower liver injury levels and higher liver functionality [38,39]. Lastly, the only study dealing with the fully humanized α -hPCSK9 monoclonal ab (mab) alirocumab suggested that this mab does not affect HCV entry and replication, refuting previous reports that suggested a reduction of CD81 cell surface expression and HCV infectivity after ectopic expression of a membrane-bound version of PCSK9 [31,40]. Taken together, since LLDs are among the most commonly used drugs worldwide, it is imperative to understand the interplay between LLDs, hepatocyte lipid homeostasis and HCV infectivity.

In this study, we aimed to understand the effect of different classes of LLDs at clinically relevant concentrations and under different genetic conditions on HCV infection in vitro and in vivo. Statin simvastatin, fibrate fenofibrate, and PCSK9 inhibitor alirocumab had marginal or no effect on HCV glycoprotein (GP)-mediated entry or cell-culture derived HCV (HCVcc) infection of hepatoma cells (Huh-7.5) or primary human hepatocytes (PHH). Whereas individual genetic ablation of either LDLr or SR-B1 did not affect HCV infectivity drastically, a double lipoprotein receptor KO (DKO) notably decreased HCV infection. We could show that this effect was not due to alterations of HCV cell entry co-factor expression or cellular cholesterol content. Treatment of these lipoprotein receptor-deficient cells with simvastatin and fenofibrate led to an additive reduction of HCV infectivity, suggesting that cholesterol level alterations or lipid homeostasis caused the observed HCV inhibition. Lastly, retrospective analysis of a cohort of patients treated with DAA-based HCV therapy failed to show a correlation between HCV RNA levels and statin treatment but suggests a modest beneficial effect of statins on liver integrity before DAA therapy. In summary, our results underline the importance of lipid homeostasis for HCV infection and suggest a link between de novo cholesterol synthesis and HCV infection.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines

Huh-7.5 and Huh-7.5.1 adherent hepatoma cell lines were kindly donated by Charles M. Rice (Rockefeller University, New York City, NY, USA). Parental Huh-7.5 derived lipoprotein receptor KOs SR-B1 #1, #2, #3, #4; LDLr KO #1, #2, #3, #4, and DKO #1, #2, #3 cell lines were cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), non-essential amino acids, penicillin/streptomycin (100 µg/mL) and L-Glutamine (2 mM) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) at 37 °C and 5% CO₂. From here on this media formulation will be denominated DMEM complete.

2.2. DNA Plasmids

HIV-based gutted Gag-Pol packaging construct, transfer plasmids CSPW (Puromycin resistance gene Puro^r) and pWPI_NanoLuc_BLR (NanoLuciferase), VSV-G, MLV env, HCV J6 E1-E2, or HCV H77 E1-E2 glycoprotein expressing vector, and pCDNA3.1 empty backbone have been previously described [41–43]. Full-length Jc1 firefly luciferase (FLuc) reporter construct pFKi389LucEiJFH1/J6/C-846 and HCV Con1 (pFKi 389 Neo EI Core 3'JFH1wt) have been previously described [44,45]. HCV replicon constructs pFK-Luc-JFH1/ΔE1-E2 and pFK-Luc-JFH1/ΔE1-E2 ΔGDD were previously described [45]. The CRISPR kit used for constructing multiplex CRISPR/Cas9 single and double knock-out (KO) vectors was a gift from Takashi Yamamoto (Addgene kit # 1000000055) [46]. Target sequence oligonucleotides TTTGGAGTCAACCCAGTAG and TCATGAAGGCACGTCGCCG against *LDLR* exon 12 and *SCARB1* exon 4 were respectively cloned by golden gate assembly into pX330A-1x2 and pX330S-2 according to the author's protocol [46]. Briefly, 10 µM annealed oligonucleotides were mixed with 25 ng/µL vector, BbsI restriction enzyme (NEB, Ipswich, Massachusetts, USA), and T4 ligase buffer and enzyme (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Reaction was run for 3 cycles at 37 °C for 5 min and 16 °C for 10 min. Resulting products were transformed in DH5α E. coli bacteria and clones were Sanger sequenced for correct nucleotide sequence. For the generation of *LDLR/SCARB1* double KO vector pX330A-1x2/LDLRgRNA3-SCARB1gRNA2, 50 ng/µL of pX330A-1x2/LDLRgRNA3 and 100 ng/µL of pX330S-2/SCARB1gRNA2 were mixed with BsaI restriction enzyme (NEB, Ipswich, MA, USA), T4 ligase buffer and enzyme and run at 37 °C for 5 min, 16 °C for 10 min for 25 cycles. Product was transformed and sequenced verified.

2.3. Generation of Lipoprotein Receptor-Deficient Cell Lines

To generate LDLr, SR-B1 and DKO Huh-7.5, cells were seeded into a 6-well format at 8×10^5 cells/well confluency. The next day, pX330A-1x2/LDLRgRNA3, pX330S-2/SCARB1gRNA2, and pX330A-1x2/LDLRgRNA3-SCARB1gRNA2 constructs were individually co-transfected with Puro^r expressing vector CSPW at a 3:1 ratio with FUGENE[®] HD reagent (Promega, Madison, WI, USA) (FUGENE 5:1 DNA) according to the manufacturer's protocol. 12 h post-transfection, media was removed and fresh DMEM complete media supplemented with 4 µg/mL Puromycin was added to the transfected and non-transfected control cells. 48 h post-treatment (time after all non-transfected control cells were dead), selection media was removed and cells were left to recover for 72 h. Subsequently, serial dilution-based single cell cloning was performed on each treatment. Individual clones were expanded and KO generation verified by cell surface staining and immunoblotting of the target proteins.

2.4. HCV Virus Production and Infection

Jc1-Fluc HCVcc particles were produced as previously described [45]. Briefly, the pFKi389LucEiJFH1/J6/C-846 plasmid DNA was MluI (NEB, Ipswich, MA, USA) linearized and in vitro transcribed (IVT). 5 µg IVT RNA were electroporated in Huh-7.5.1 cells and

incubated at 37 °C and 5% CO₂. Virus supernatant was harvested 72 h after electroporation, filtered through a 0.45 µm pore filter (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and stored at −80 °C until further use. HCV P100pop was a kind gift from Professor Esteban Domingo (CBMSO, Madrid, Spain) [47].

To understand the impact of LLDs during HCV infection, 5×10^3 Huh-7.5 or lipoprotein receptor-deficient cells were seeded in a 96-well plate and incubated for 24 h. The next day, cells were preincubated with selected LLDs 24 h before infection. Then, 50 µL virus and LLD were mixed and added to cells. 4 h post-infection (hpi), virus was removed and fresh DMEM with LLD was added. 72 hpi cells were lysed using an in-house lysis buffer (0.5 M Gly-Gly, 1 M MgSO₄, 0.2 M EGTA, 1% Triton-X100) supplemented with DTT and frozen at −80 °C prior luciferase measurement. Luciferase assay was performed as described before [48] and measured on a Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany).

2.5. HCV Kinetics in Primary Human Hepatocytes

Primary human hepatocytes (PHHs) from three separate donors were isolated from explanted livers and plated on collagen-coated 24-well plates with an approximate density of 3.75×10^5 cells/well as previously described [49]. Informed consent was approved by the ethics commission of Hannover Medical School. One day after plating, culture media was changed to HCM media (Lonza, Basel, Switzerland) and treated with 1 µM Simvastatin, 5 µM Fenofibrate µM, 1 µM Alirocumab or DMSO (at the highest concentration used to dissolve the treatments). To control innate immune signaling, 10 µM ruxolitinib was also added to the cells (Adipogen Life Sciences, Liestal, Switzerland). Approximately 16 h after the pretreatment of the LLDs and ruxolitinib, the cells were infected with 3.75×10^5 (measured on Huh-7.5 cells) of an HCVcc population with a high replication capacity (P100pop) [50,51]. 4 h later, the cells were washed with $5 \times$ PBS and fresh media with drugs added. Supernatant and cells lysates were collected 4, 24, 72, and 96 h post-infection for quantification of intracellular HCV RNA and infectious particle release.

2.6. RNA Extraction and RT-qPCR Quantification of Viral RNA

To quantify intracellular HCV RNA in PHHs, total RNA from primary cells were isolated using a NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. For each sample HCV RNA was quantified in technical replicates utilizing a LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes Kit (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) following the manufacturer's instructions and the following primers and probe, 5'-UTR Forward primer, TCTGCGGAACCGGTGAGTA; 5'-UTR reverse primer, GGGCATAGAGTGGGTTTATCCA; and 5'-UTR probe, [6FAM]-AAAaggACCCAgTCTTCCcgCAA-[TMR]. 10-fold serial dilutions of an in vitro-transcribed (IVT) HCV Jc1 RNA were used in each run for generation of a standard curve.

Viral RNA extraction and quantification of infected lipoprotein receptor knock-outs was based on previous work [52]. Briefly, HCVcc Jc1-WT or mock infected cells were lysed and RNA extracted according to Qiagen RNeasy (Qiagen, Venlo, Netherlands) manufacturer's protocol. Extracted RNA was measured using a Nanodrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). To detect viral RNA via RT-qPCR a probe against the HCV X-tail genomic region was used [53]. Each reaction comprised 3 µL of RNA and 17 µL of a mixture of Master Hydrolysis Probes (Roche, Basel, Switzerland), 300 nM HCMgR2 and 200 nM XFTF5 primers, and 100 nM HCVMGB2 custom probe. PCR was run for 45 cycles on a Light Cycler 480 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland). 10-fold serial dilutions of IVT HCV Con1 RNA (pFKi 389 Neo EI Core 3'JFH1wt) were added in each run for generation of a standard curve. Absolute viral copy numbers were extrapolated from Ct values of samples versus the standard. Baseline and cut-off cycles were 3 and 40, respectively. Final copy numbers were normalized to the extracted total RNA concentration. Each biological sample was measured in duplicate.

2.7. TCID₅₀ Assay

To quantify infectious particle release, 1×10^4 cells/well of Huh-7.5 cells were seeded onto 96-well plates. One day after plating, 6 replicate wells were infected with HCV infected supernatant, serially diluted and incubated for 72 h. The cells were then fixed with 100% methanol for 10 min, followed by 2 washes with PBS plus 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PBS-T). Endogenous peroxidases were blocked with 3% H₂O₂ in PBS-T for 5 min. The cells were subsequently incubated with 440 pg/mL of anti-NS5A 9E10 antibody (Cell Essentials, Boston, MA, USA) at room temperature for 1 h. Unbound antibodies were washed twice with PBS-T and the cells were incubated 1 h with anti-mouse IgG-HRP (A4416, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a 1:300 dilution. Peroxidase activity was detected after 2 X PBS-T washing and the addition of a carbazole substrate (0.32% *w/v* 3-amino-9-ethylcarbazole in *N,N*-dimethylformamide diluted in 5 mM acetic acid, 10 mM sodium acetate, pH 8.0 and 0.4% H₂O₂) for 10 min. Unbound substrate was washed twice with H₂O and stained cells were visualized under a microscope. Positive wells were counted and the tissue infective dose 50% (TCID₅₀) was calculated using the Spearman and Kärber calculation [54].

2.8. Pseudoparticle Production and Transduction

Pseudoparticles for LLD treatments were generated as previously described [41]. Briefly, HEK293T producer cells were co-transfected with 1 µg DNA plasmids containing HIV gag-pol, envelope viral glycoproteins, and a NLuc or FLuc luciferase reporter gene in a 1:1:7 ratio using polyethylenimine (PEI) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). 48 h and 72 h post-transfection, the pseudoparticles (pps) supernatant was collected, filtered through a 0.45 µm pore filter (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and pooled together. Virus pp supernatant was stored at 4 °C for up to 7 days and at −80 °C for long term storage. For HCV GP-driven entry studies in lipoprotein receptor knock-out cell lines, HEK293T producer cells were co-transfected with 1.3 µg HIV gag-pol, 1.3 µg Fluc luciferase reporter gene, and 1 µg envelope GP with FUGENE[®] HD reagent (Promega, Madison, WI, USA) (FUGENE 3:1 DNA) according to the manufacturer's instructions.

To test the effect of LLDs on HCV GP-mediated entry, 5×10^3 cells were seeded one day before in a 96-well plate and pre-incubated with different concentrations of LLDs an extra day before transduction. Polybrene (H9268-5G, Sigma-Aldrich, San Luis, MS, USA) was added to a final concentration of 4 µg/mL to 50 µL virus pps and applied together with LLDs or solvent controls. 6 h post-transduction (hpt) pps were removed and cells incubated for 72 hpt. Then, cells were lysed with 35 µL/well of our in-house lysis buffer (see previous) supplemented with DTT and frozen at −80 °C until measurement. For NLuc measurement, 20 µL lysate was mixed with 80 µL coelenterazine substrate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), incubated for 5 min at room temperature (rt) and measured as previously described [42] using a Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany).

For assessment of HCV GP-driven entry in lipoprotein-deficient cell lines, 8×10^4 cells/well were seeded using a 12 well format and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. 500 µL of pps encoding for Fluc were mixed with 4 µg/mL polybrene (see previous) and added to cells for 6 h. Viral supernatants were subsequently removed, and cells lysed 72 hpt. Fluc of 20 µL lysate was measured as previously described [55]. Specific GP-driven entry was determined as the differential luciferase signal from GP-bearing particles and no GP (NoEnv) negative control.

2.9. HCV Replication Assay

Subgenomic HCV (pFK-Luc-JFH1/ΔE1-E2 and pFK-Luc-JFH1/ΔE1-E2 ΔGDD) RNA was transcribed *in vitro* and transfected into the Huh-7.5 or lipoprotein receptor knock-outs by electroporation as previously described [45]. 1×10^5 electroporated cells were seeded in 24-well plates for luciferase measurement and 10^4 in 96-well plates for cell proliferation assessment. At the indicated time points, cells were either lysed using 200 µL of Fluc

lysis buffer and frozen at -20°C before measurement or assessed for cell proliferation using a MTT assay (MTT cell proliferation kit, OzBioSciences, Marseille, France). Fluc was measured as previously described using a Centro XS3 LB 960 plate luminometer (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany) [56] and proliferation with a Multiskan Go Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). After data collection, a FLuc/cell proliferation ratio was calculated for each time point and normalized to the ratio values at 4 h post-electroporation.

2.10. Cell Viability Measurements

To examine the effect of LLDs on cell viability, an MTT Assay was performed as previously described [57]. 0.5 mg/mL MTT substrate was added to drug-treated cells and incubated for 1 h at 37°C . MTT substrate was then removed and DMSO was added to the cells. Absorbance at 570 nm was measured using a Biotek Synergy 2 ELISA plate reader (Winooski, VT, USA). Reference absorbance at 630 nm was subtracted from specific absorbance at 570 nm. Cells treated with MTT solution and 10% SDS were used as a negative control.

NLuc Assay was alternatively performed to analyze cell viability of LLDs during gp-mediated HCV entry experiments. To establish NLuc expressing Huh-7.5 cells, 30–50% confluent Huh-7.5 cells were transduced with VSV-Gpps carrying a NLuc reporter gene. After 6 h fresh DMEM complete medium was added. NLuc expression was evaluated three passages after transduction and at the end of each individual GP-mediated cell entry assay, as previously described [42].

2.11. Flow Cytometry

For quantification of extracellular protein expression, immunostaining with fluorescently-conjugated abs followed by flow cytometry was performed. In brief, adherent cells were washed with phosphate buffer saline (PBS), dislodged with non-enzymatic versene reagent (15040066, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and centrifuged at 1250 rounds per minute (rpm) for 5 min. Cell pellets were resuspended in FACS buffer (1% FCS in PBS) containing 1 μL FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and transferred to a V-bottom 96-well plate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Subsequently, cells were either stained with saturating concentrations of conjugated mouse abs α -human APC CD81 (561958, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), α -human APC SR-B1 (363207, Biolegend, San Diego, CA, USA), and α -human PE LDLr (FAB2148P, Minneapolis, MN, USA) or their respective isotype controls for 20 min in the dark. Stained cells were washed once and resuspended in FACS buffer before analysis. Protein expression was quantified by APC or PE channel fluorescent intensity measurement using an Accuri C6 Plus flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For quantification of endogenous levels of HCV entry co-factors, resuspended cells were fixed (1% FCS, 0.5% PFA in PBS) for 10 min at RT, permeabilized (1% FCS, 0.1% Saponin in PBS) for 20 min on ice, and immunostained with monoclonal α -human occludin (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mouse) (33–1500, Invitrogen/Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA), and polyclonal α -human claudin-1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (51–900) (Invitrogen/Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) or α -human NPC1L1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (#5058, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 60 min on ice. Subsequently, cells were washed in FACS buffer and bound abs detected with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Alexa Fluor 488 (AF488)-conjugated abs (goat α -mouse A-11029, goat α -mouse A-11034) (Invitrogen/Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). Unspecific staining was controlled by immunostaining with equimolar concentrations of monoclonal mouse (555746, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) or polyclonal rabbit IgG (I5006, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Specific protein expression (ΔMFI) was calculated by subtracting the geometric mean intensity (MFI) of the isotype control staining from the specific ab MFI.

2.12. Western Blot

Expression of HCV entry factors was analyzed by protein immunoblot as previously described [55]. For protein detection, α -human SR-B1 (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (NB400-104, Novus Biologicals, Littleton, USA), α -human LDLr (1.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (ab52818, Abcam, Cambridge, UK), α -human occludin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mouse) (33–1500, Invitrogen/Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA), α -human claudin-1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (51–900, Invitrogen/Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) or α -human NPC1L1 (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rabbit) (#5058, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used. HRP-linked α -mouse (1:20,000) (A4416, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and α -rabbit (1:20,000) (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) were used to detect proteins. For developing, HRP-based Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva Life Sciences, Marlborough, MD, USA) was used. Blots were documented with ChemoStar Professional Imager System (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Germany).

2.13. Cholesterol Quantification Assay

Total cholesterol content of lipoprotein receptor-deficient cell lines was quantified using the Cholesterol Quantification Kit (MAK043) by Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 cells were collected and frozen at -20°C until cholesterol quantification. Lipids were extracted using chloroform:isopropanol:IGEPAL CA-630 (7:11:0.1) and the organic phase was dried under vacuum using a Savant DNA-SpeedVac concentrator (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Extracted lipids were dissolved in Cholesterol Assay buffer and stored at -20°C . Reaction mix was set up according to the manufacturer's instructions and absorbance was measured at 570 nm in a Biotek Synergy 2 ELISA plate reader (Winooski, VT, USA). Cholesterol amount was extrapolated from an in-run cholesterol standard curve. Blank was subtracted from all values for background correction. The final cholesterol concentration was calculated by equating the cholesterol amount to the sample volume.

2.14. Lipid-Lowering Drugs

LLDs simvastatin (S6196) and fenofibrate (F6020) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Both compounds were diluted with DMSO to a final stock concentration of 50 mM and stored at 4°C . Alirocumab (Praluent) was ordered from Sanofi (Paris, Île-de-France, FR) and was stored at 4°C .

2.15. Patients and Methods

For this analysis 773 HCV infected patients who received antiviral treatment with DAA regimens at the outpatient clinic of Hannover Medical School from 2014 (approval of sofosbuvir)—2019 were considered. HCV RNA values, at specific time points during DAA therapy, from two different cohort subgroups were compared. In total, 15 patients did not show any documented HCV RNA values at the time of analysis and therefore were excluded. Patients with documented statin use at therapy start of DAA treatment were compared with patients without documented statin use at therapy start as control group. To adjust for possible confounders two matchings were performed. In matching one presence of cirrhosis and viral genotype were used as criteria to compare baseline values. In matching two, in addition to cirrhosis and viral genotype, HCV antiviral regimen was included to compare treatment values. The matching ratio was 2:1 generating a control group twice as big as the statin group. Matching partners were included in the analysis in the order of appearance in the original data set. We excluded patients without an appropriate matching partner. HCV RNA values were obtained at week 0, week 2, week 4, week 8, and week 12 using either the Cobas Ampliprep Cobas Taqman v.2.0 (Roche, limit of quantification 15 IU/mL) or the Aptima HCV Quant assay (Hologic; limit of quantification 10 IU/mL). If quantification limit for HCV RNA was reached (<15 IU/mL, <10 IU/mL) this was put into analysis as 15 IU/mL or 10 IU/mL. Undetectable HCV RNA was put into analysis as 1 due to logarithmic presentation of the data. Furthermore, clinical parameters,

at baseline and/or treatment weeks, e.g., age, sex, HCV genotype, presence of cirrhosis, DAA therapy regimen, and AST as well as ALT levels were obtained. Clinical data were generated using standard laboratory procedures at Hannover Medical School. Cirrhosis was defined as fibroscan over 14.5 kPa. If fibroscan data were not available other clinical parameters for definition of cirrhosis were used. If no data were available for a particular time point, this dataset was excluded from the final analysis. Similar methods have been previously used by Maasoumy et al. [58].

2.16. Statistics

Infection, replication, and entry assays were performed three times ($n = 3$) with 3 technical replicates. Immunoblots were performed twice ($n = 2$). Cell surface and total stainings were carried out as 3 biological replicates. Cholesterol quantification was done thrice with two technical replicates. For the retrospective study, data was collected with Microsoft® Excel® 2010 (Redmond, WA, USA) and stated as absolute numbers, median and quartiles, always clearly labeled. Statistical analysis and visualization were done using GraphPad® Prism® 8 or 9 (La Jolla, CA, USA). Parametric, one, or two-way ANOVA corrected for multiple comparisons with Sidak or Dunnett methods as well as non-parametric unpaired Mann-Whitney U test were used to calculate statistical significance. p -value significance was represented as: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$. p -values above 0.05 were considered not significant and were not illustrated.

2.17. Ethics

This analysis was performed according to the principles of good clinical practice as well as the declaration of Helsinki and approved by the local ethics committee (No. 2148-2014). All patients gave written informed consent.

3. Results

3.1. Glycoprotein-Driven HCV Entry Is Not Affected by Lipid-Lowering Drugs

To examine the effect of lipid-lowering drugs (LLDs) on glycoprotein (GP) mediated HCV entry of hepatocytes, we pre-treated Huh-7.5 cells with increasing concentrations of simvastatin, fenofibrate and alirocumab for 24 h before transduction with pseudoparticles (pps) encoding for NLuc and pseudotyped with either HCV genotype 1a (H77) E1-E2 GPs (HCVpp), no GP (NoEnvpp) or Murine Leukemia Virus Env (MLVpp) in combination with drugs or solvent controls (Figure 1A,C,E). We used Huh-7.5/NLuc cells treated in parallel with the corresponding drugs to control for cell cytotoxicity (Figure 1B,D,F).

HCVpps and MLVpps transduced the cells about 10 to 400-fold above NoEnv levels, respectively (data not shown). The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of simvastatin and fenofibrate in the HCVpp transduction assay was 10.2 μ M and 25.3 μ M, respectively (Figure 1A,C) and correlated with the inhibitory effects for MLV env-driven transduction (13.5 μ M IC₅₀ simvastatin, 25.9 μ M fenofibrate), suggesting that the inhibitory effect is not HCV specific, but rather due to cell cytotoxicity. Indeed, the 50% cytotoxicity concentrations (CC₅₀) determined in stably NLuc expressing cells of simvastatin and fenofibrate was 27.4 μ M and 26.0 μ M, respectively, strongly indicating that the antiviral effect of these compounds for HCV is associated to antiproliferative effects on Huh-7.5 cells (Figure 1B,D). The PCSK9 inhibitor alirocumab did not affect GP-driven entry or cell viability at the tested concentrations (Figure 1E,F). These results suggest that LLDs do not affect HCV GP-mediated cell entry at a non-toxic concentration.

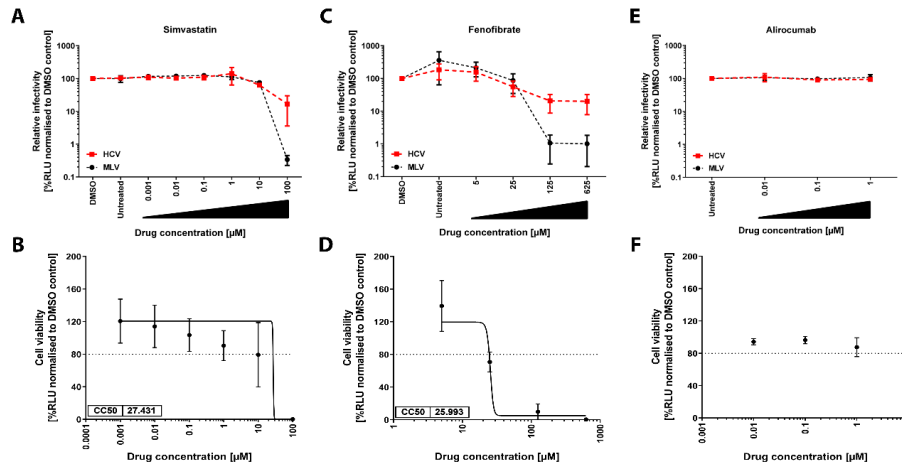


Figure 1. Lipid-lowering drugs (LLDs) do not affect Hepatitis C virus (HCV) genotype 1a entry into Huh-7.5 cells. Effect of LLD on HCV entry and cell viability. Dose-response of lentiviral pseudoparticle (pp) entry into Huh-7.5 (A,C,E). Cells were preincubated for 24 h with increasing concentrations of either simvastatin (A), fenofibrate (C), or alirocumab (E) before transduction with NLuc-encoding pps bearing E1-E2 GT1a glycoprotein (GP) (HCV), MLV env (MLV) for 6 h. NLuc activity was measured 72 h post-transduction (hpt) and luciferase activity was normalized to solvent control. MLVpp entry served as virus control. Drug-induced cytotoxicity (B,D,F). Huh-7.5 cells constitutively expressing NLuc (Huh-7.5/NLuc) were treated with either simvastatin (B), fenofibrate (D) or alirocumab (F) for 30 h as for (B,D,F) but were not transduced. Ninety-six h after treatment, NLuc activity was measured and luciferase activity values were normalized to DMSO control. When determined, CC50 values were indicated at the lower left side of the graph. Graphs represent the average of three independent experiments performed in triplicate with error bars representing the standard deviation (SD).

3.2. Lipid-Lowering Drugs Do Not Impact HCV Infection of Human Immortalized or Primary Hepatocytes

Next, we set out to evaluate the impact of LLDs throughout the whole replication cycle. We selected the highest non-cytotoxic concentration of simvastatin (1 μ M), fenofibrate (5 μ M), and alirocumab (1 μ M) (Figure 1B,D,F) and pre-treated Huh-7.5 cells before, during, and after HCVcc genotype 2a FLuc reporter virus (FLuc-Jc1) inoculation (Figure 2A). We run MTT assays in parallel to account for cell viability. All LLDs tested failed to significantly inhibit HCV infection. Merely, simvastatin showed numerical reduction in infectivity of 19.9%. Conversely, alirocumab mildly enhanced infectivity to 118.3% of control. LLDs did not affect cell viability as measured by the MTT assay. To validate these results in a more relevant model, we treated primary human hepatocytes (PHH) from three different donors with the selected LLDs alone or in combination with the JAK/STAT pathway inhibitor ruxolitinib and infected them with p100pop, a cell culture-adapted HCVcc virus with higher replication fitness (Figure 2B,C) [47,50,51]. As expected, immunocompetent cells partially (48 hpi) or completely (72 hpi) controlled HCV particle release and ruxolitinib treatment circumvented this restriction (Figure 2C). Importantly, LLDs did not significantly affect HCV replication (Figure 2B) or release (Figure 2C) at any of the time points tested or when the innate immune response was active or blunted. Altogether, our results suggest that these drugs do not significantly affect HCV infection in human hepatoma cells.

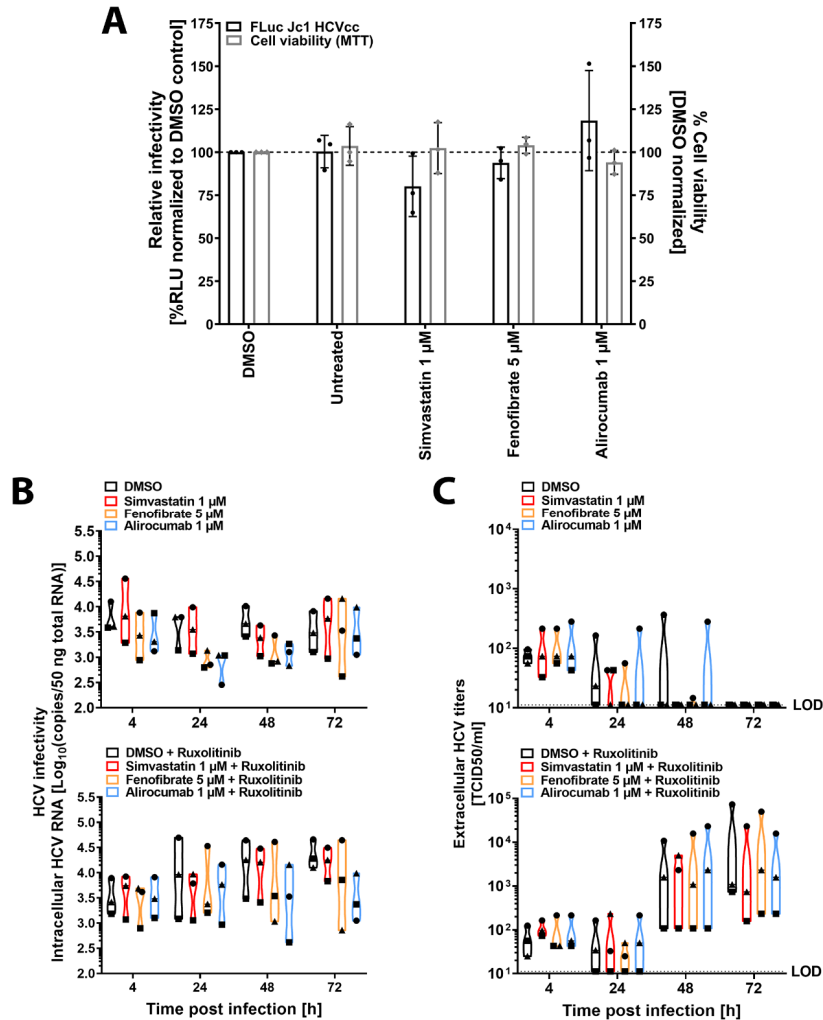


Figure 2. Lipid-lowering drugs do not affect HCV genotype 2a infection of Huh-7.5 or primary human hepatocytes. Cell culture-derived (HCVcc) infection (black bars) and viability (grey bars) in Huh-7.5 cells (A). Cells were pretreated for 24 h prior to infection with the indicated drug concentrations. Pretreated cells were infected with an FLuc reporter virus (Jc1-Fluc) in the presence of drug for 4 h. Virus inoculum was removed, and cells treated with LLDs for 68 h. FLuc activity was measured and normalized to solvent control (DMSO). Cell viability determined by MTT assay. Graph represents the average of 3 independent experiments with 3 technical replicates each. Dots show individual values of each experiment. Error bars represent the SD. For statistical analysis, a multiple comparison two-way ANOVA with a Dunnett correction was performed ($\alpha = 0.05$, degrees of freedom (DF) = 20). HCVcc infection of primary human hepatocytes (PHH) (B,C). PHH from three donors were pretreated for 24 h with LLDs at the indicated concentrations in the absence (B-C, upper panels) or presence (B,C, lower panels) of the JAK/STAT inhibitor ruxolitinib (10 μ M). Cells were then infected for 4 h with 3.75×10^5 TCID₅₀s of the GT2a cell-cultured adapted HCVcc p100pop in combination with the drugs. Virus inoculum was removed, and drugs added until the indicated times post-infection. Intracellular RNA copies (B) and extracellular infectious particles (C) were quantified by RT-qPCR and TCID₅₀ assay, respectively. Graphs represent the distribution and median of each treatment of all donors. Each dot represents an individual donor (circle, triangle, square). Statistics were performed using a multiple comparison two-way ANOVA with a Dunnett correction ($\alpha = 0.05$, degrees of freedom (DF) = 32).

3.3. Genetic Ablation of Lipoprotein Receptors SR-B1 and LDLr Does Not Affect HCV Entry Factor Expression or Cholesterol Content

To understand the role of lipids and cholesterol homeostasis in HCV infection in more depth we first decided to block Huh-7.5 cell lipid, and specifically cholesterol, uptake by genetic ablation of the two main receptors for LDL (LDLr) and HDL (SR-B1) separately or in combination by CRISPR-Cas9 technology. We targeted exon 4 of the *SCARB1* SR-B1 gene and exon 12 of the *LDLr* gene (*LDLr*) since these exons are essential for transcription and translation of all known isoforms of these two proteins (Figure 3A). We generated and characterized 4 individual clones for SR-B1 (#1, #2, #3, #4) and LDLr (#1, #2, #3, #4) KOs as well as three clones (#1, #2, #3) for SR-B1/LDLr DKOs.

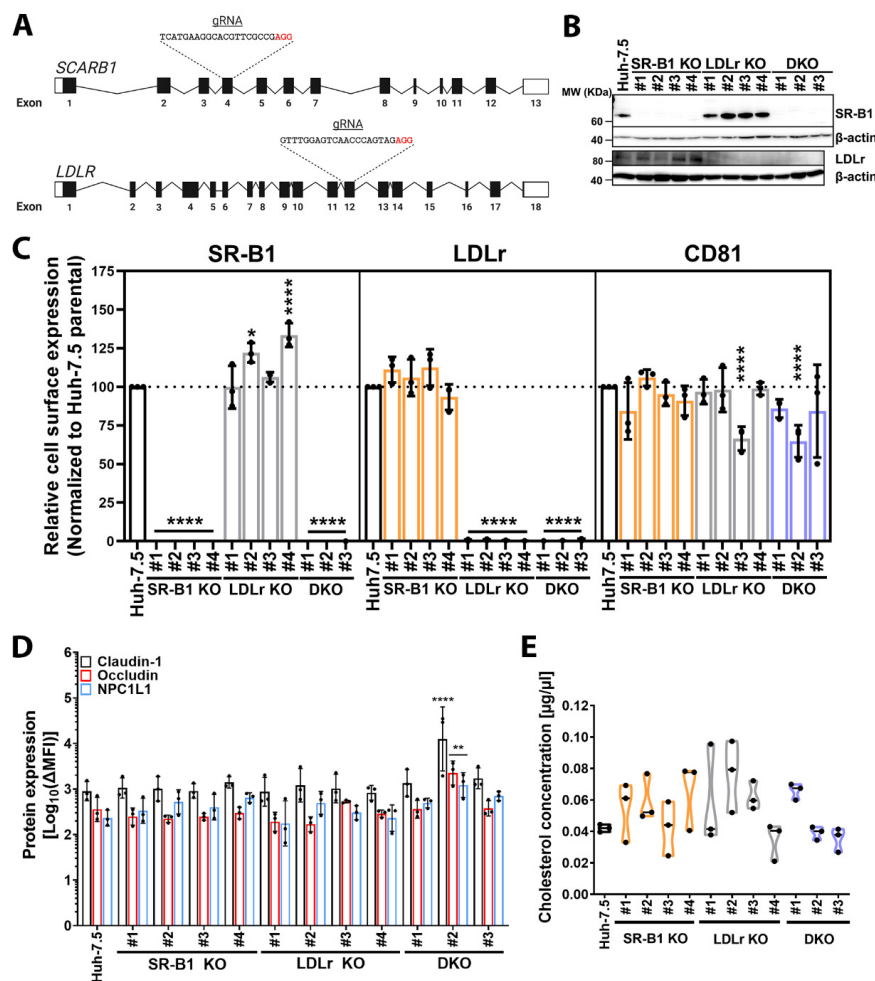


Figure 3. Characterization of lipoprotein receptor-deficient cell lines. Lipoprotein receptor knock-out (KO) strategy and characterization. Lipoprotein receptor *SCARB1* (SR-B1) and *LDLr* (LDLr) gene scheme (A). Graphic representation of genes for SR-B1 and LDLr. Exons are shown as boxes with black areas representing open reading frames (ORFs). Introns are shown as lines. CRISPR-Cas9 guide RNA (gRNA) nucleotide sequence targeting *SCARB1* and *LDLr* are depicted. Protospacer adjacent motif (PAM) is highlighted in red. Image created with BioRender.com (accessed 09/04/2020). Endogenous expression of lipoprotein receptors SR-B1 and LDLr (B). Cell lysates were evaluated for expression of indicated proteins by

immunoblot using abs against the specific targets. β -actin was used as an internal control (42 kDa). Cell surface expression of SR-B1, LDLr, and CD81 in SR-B1 KO clones (light orange bars), LDLr KO clones (grey bars), and DKO clones (light blue bars) (C). Saturating concentrations of fluorophore conjugates abs against cellular targets and their isotype controls were used to stain cells for 20 min at 4 °C. Stained cells were analyzed by flow cytometry and Δ MFI was calculated as stated in the methods. Δ MFI values were normalized to parental Huh-7.5 cells. Endogenous expression of HCV entry factors claudin-1, occludin, and NPC1L1 (D). Protein expression was determined by immunostaining of permeabilized cells with equal amounts of specific abs or isotype controls for 60 min at 4 °C, followed by detection of bound abs with an Alexa Fluor 488 (AF488)-conjugated secondary ab. Specific staining was determined as Δ MFI. Total cholesterol in lipoprotein receptor KO cells (E). Lipids were extracted from cells as described in the methods. The cholesterol fraction was measured using a colorimetric assay and cholesterol amount extrapolated from an in-run standard curve and transformed to cholesterol concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). KO cells are shown in the same color patterns as for C. Graphs C, D, and E display the average of three experiments performed in triplicate and represent individual values as black dots. SD is shown as error bars. Statistical significance of the total (D) or cell surface staining (C) was assessed by a two-way ANOVA with a Dunnett post hoc ($\alpha = 0.05$, $DF = 72$) and with a one-way ANOVA corrected with Dunnett post hoc for the cholesterol content ($\alpha = 0.05$, $DF = 24$) (E). Statistical significance is shown as p -value: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$.

We confirmed that the corresponding clones did not express SR-B1 and/or LDLr by immunoblot (Figure 3B). These results were also confirmed for cell surface expression of the respective proteins by flow cytometry (Figure 3C). Interestingly, SR-B1 cell surface levels in LDLr KO clones #2 and #4 significantly increased in comparison to Huh-7.5 parental cells but LDLr cell surface expression did not increase in any of the SR-B1-deficient clones.

To rule out compensatory effects, we next assessed the surface expression of HCV entry factor CD81 [59] (Figure 3C, right panel) as well as the total expression of entry cofactors claudin-1, occludin, and Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) [41,60,61] in lipoprotein receptor-deficient cells (Figure 3D and Figure S1B). Notably, we observed a significant decrease of CD81 surface expression levels in LDLr KO clones #3 and DKO clone #2. Claudin-1, occludin and NPC1L1 were detected by immunoblot at the expected sizes of 22, 65 and 140 kDa, respectively, in all clones (Figure S1). In contrast to CD81, we did not observe any drastic change in protein expression levels of claudin-1, occludin, and NPC1L1 in all KO clones but DKO #2, which significantly increased expression of all three proteins (Figure 3D). Finally, we quantified cholesterol content to rule out any possible secondary effect on HCV infection due to alteration of cellular cholesterol content. We did not find any statistically significant differences in cholesterol content among the KO clones regardless of their genetic background (Figure 3E). The median cholesterol concentrations in lipoprotein receptor KO clones were slightly higher or similar to parental Huh-7.5 cells (Figure 3E).

In summary, these results suggest, that genetic ablation of SR-B1 and/or LDLr does not drastically impact HCV entry factor expression or cellular cholesterol content.

3.4. LDLr and SR-B1 Play a Redundant Role in HCV Infection but Not in Entry

To delineate the role of each lipoprotein receptor in HCV infection, we next evaluated the susceptibility and permissiveness of lipoprotein receptor KO cells to HCV. We excluded LDLr KO #3 and DKO #2 from our main analysis due to their decreased expression of surface CD81 (Figure 3C). We transduced KO and DKO cells with FLuc-encoding NoEnvpp, HCVpp from GT1a (H77) and GT2a (J6), or MLVpps for 6 h and measured FLuc activity 72 h later. We set MLVpp luciferase activity of each experiment to 100 percent (data not shown), normalized each virus to this value, and subtracted the unspecific entry of NoEnvpps (Figure 4A). Three out of four SR-B1 KO clones were significantly less susceptible to HCV GP-driven entry regardless of their genotype. Conversely, only LDLr KO #2 had lower susceptibility to HCV GP-mediated entry. Importantly, both DKO clones showed significantly lower HCVpp entry. The average fold-reduction for GT1a H77 HCVpp among lipoprotein receptor KO cells was 3.5 for SR-B1 and 1.8 for LDLr clones, and 2.5 and 2 for GT2a J6 in SR-B1 and LDLr clones, respectively. Finally, the average HCVpp entry was 7.9-fold lower for GT1a H77 pps and 6.3 for GT2a J6. Notably, statistical analysis did not show any significant differences in HCVpp susceptibility between SR-B1 and DKOs.

LDLr KO #3 and DKO clone #2 were highly refractory to HCVpps, with LDLr KO #3 being virtually resistant to HCV GT2a J6 E1-E2 transduction [Supplemental 2A]. Our results confirm the previously observed role of SR-B1 cell surface expression for HCV GP-driven cell entry and suggest a minor synergistic effect of SR-B1 and LDLr.

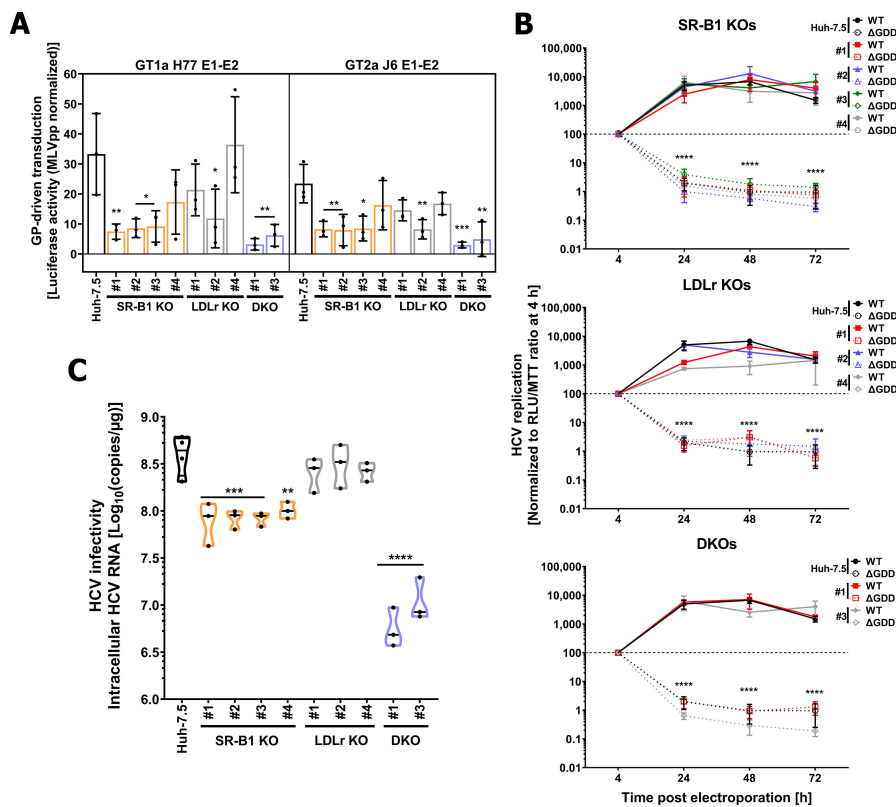


Figure 4. Lipoprotein receptor SR-B1 and LDLr do not affect HCV replication, SR-B1 facilitates GP-driven cell entry, and both redundantly participate in HCV infection. HCV GP-mediated entry in lipoprotein-deficient cells (A). Huh-7.5 parental (black bars), SR-B1 (light orange bars), LDLr (grey bars), and DKOs (light blue bars) were transduced with NLuc-encoding GT1a H77 or GT2a J6 HCVpp, negative (NoEnvpp), and positive (MLVpp) controls for 6 h. Six hpt, lentiviral particles were removed and reporter expression measured 72 h after. Raw relative light units (RLU) values were normalized to MLVpp values of the same cell line to account for intercellular variation. NoEnvpp normalized values were subtracted to represent HCV GP-specific entry. HCV subgenomic replication in Huh-7.5 and lipoprotein receptor-deficient cells (B). Cells were transfected with a HCV GT2a replication-competent (WT) or deficient (Δ GDD) subgenomic genomes tagged with FLuc. RLU values were normalized to 4 h post-electroporation and to MTT values to account for initial RNA delivery and cell growth variabilities between cell lines. Graph represents the average of three independent experiments performed in triplicate \pm sem. HCVcc infection of lipoprotein-deficient and parental cells (C). Indicated cell lines were infected untagged GT2a Jc1 HCVcc. Virus inoculum was removed hpi. Twenty-four hpi cells were lysed and Intracellular HCV RNA copies determined with an X-tail based absolute RT-qPCR. Data are shown as violin plots with median (black line) and individual values (black dots). Data distribution is symbolized by the plots' shape. A two-way ANOVA with Dunnett post hoc ($\alpha = 0.05$, DF = 10) was used for statistical analysis of HCV entry and replication assays and a one-way ANOVA with Sidak's post hoc for HCVcc infection assay ($\alpha = 0.05$, DF = 25). p -value was calculated and shown as: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

LDLr has previously been implicated in HCV replication [15]. To determine the role of lipoprotein receptors in this step of the virus life cycle, we electroporated Huh-7.5 or KO cells with a replicative GT2a HCV subgenomic RNA (WT) or a replication-deficient subgenomic RNA (Δ GDD) that encodes for Fluc (Figure 4B and Figure S2B). As expected, all SR-B1 KO cells replicated at similar rates as Huh-7.5 (Figure 4B). Interestingly, while LDLr KO cells #1 and #4 had lower replication rates at 24 and #4 at 48 h post-electroporation, all DKO cells tested had similar replication rates (Figure 4B and Figure S2B). These results suggest a clone rather than protein-specific effect. As expected, replication-deficient Δ GDD failed to replicate in all cell lines tested (Figure 4B and Figure S2B). These results rule out a possible effect of lipoprotein receptors in HCV replication.

Lastly, we inoculated all KO and parental Huh-7.5 cells with untagged Jc1 GT2a HCVcc for 4 h and let the infection progress for 20 h (Figure 4C and Figure S2C). LDLr ablation did not affect HCV infectivity in all clones (Figure 4C) but #3 (Figure S2). In line with the HCVpp results (Figure 4A), infectivity was significantly reduced in all SR-B1 KO clones with an average 4.8-fold reduction of HCV copies in comparison with parental Huh-7.5 cells. Strikingly, cell permissiveness was greatly reduced in all DKOs (approx. 52-fold) compared to parental cells (Figure 4C and Figure S2C). These data suggest that lipoprotein receptors redundantly promote HCVcc infection.

3.5. Lipid-Lowering Drugs Affect HCV Infection in Lipoprotein Receptor-Deficient Cell Lines

To investigate how cellular lipid homeostasis and its modulation by LLDs impacts HCV infection in a genetically altered background, we selected SR-B1 KO #3, LDLr KO #1, and DKO #1 for treatment with selected LLDs.

First, we tested whether LLDs could have a cytotoxic effect on cells devoid of lipoprotein receptors. Therefore, we treated each lipoprotein-deficient cell line with the concentrations previously tested on Huh-7.5 cells (1 μ M simvastatin, 5 μ M fenofibrate, 1 μ M alirocumab) for 96 h before performing an MTT-based cell viability assay (Figure 5A). Whereas alirocumab and fenofibrate did not induce cytotoxicity in any of the clones, simvastatin moderately but significantly reduced cell viability by 27.39% when both proteins were lacking.

We next tested the effect of LLDs on HCV infectivity in the lipoprotein-deficient cells in a similar fashion as for Huh-7.5 parental cells (Figure 2). FLuc activity values were measured 72 hpi and normalized to solvent control (Figure 5B). Strikingly, simvastatin and fenofibrate reduced HCV infection in all KO cell lines. Although fenofibrate diminished HCV in all KO cell lines by approx. 30–40%, this reduction was not statistically significant. Strikingly, simvastatin significantly inhibited HCV infection differentially in the three KOs: single SR-B1 and LDLr KO cells had a residual infectivity of 52% and 40%, respectively, but the effect was additive when both lipoproteins were lacking (25% residual HCV infection), suggesting that de novo cholesterol synthesis is important for HCV infection. Finally, alirocumab showed a slightly increased infectivity in LDLr KO #1 cells that was not seen in the other clones tested. Thus, it appears that among the tested drugs, statins can have a modest inhibitory effect on HCV infectivity in vitro when SR-B1 and/or LDLr are ablated.

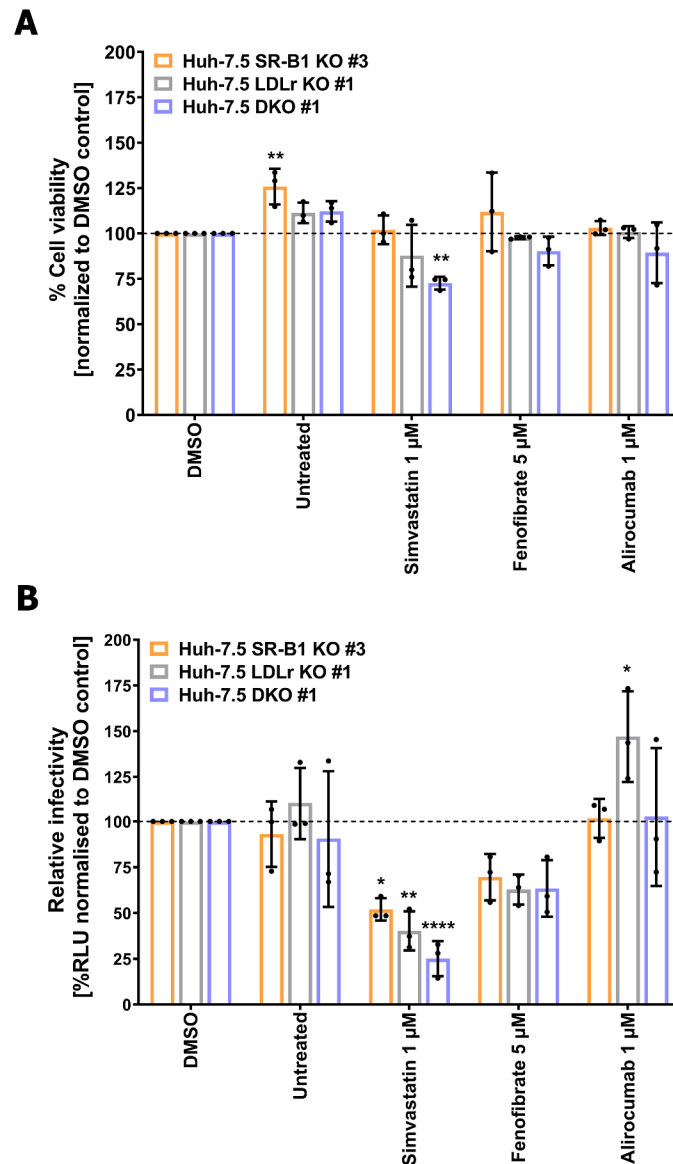


Figure 5. Lipid-lowering drugs affect HCV infection of lipoprotein receptor-deficient cell lines. Drug-induced cell cytotoxicity of lipoprotein receptor-deficient cell lines (A). Huh-7.5 derived SR-B1 KO #3 (light orange bars), LDLr KO #1 (grey bars) and DKO #1 (light blue bars) were treated with 1 μ M simvastatin, 5 μ M fenofibrate or 1 μ M alirocumab for 96 h. Cell viability was determined by MTT Assay. (B) HCVcc infection of KO cells (B). SR-B1 KO #3, LDLr KO #1, and DKO #1 were treated with indicated drugs 24 h before infection with an FLuc reporter GT2a HCV virus (Fluc-Jc1) in the presence of the compounds or solvent control. 4 h later, virus was removed and drugs applied for extra 72 h before cell lysis and FLuc measurement. FLuc activities were normalized to DMSO control. Graphs represent 3 independent experiments performed in triplicates. Bars show the average and error bars in SD. Black dots plot individual values. Multiple comparison two-way ANOVA with a post hoc Dunnett correction was performed for statistical analysis ($\alpha = 0.05$, DF = 40). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$.

3.6. Retrospective In-Vivo Analysis of a HCV Patient Cohort Suggests a Slight Beneficial Effect of Statin Usage on Liver Health

Finally, we retrospectively analyzed a cohort of 717 chronically HCV infected patients and compared statin users and non-statin users in terms of liver damage and HCV RNA value decline throughout a certain part of the treatment period (week 0 and 2). Table S1 shows baseline characteristics of the analyzed cohort. In line with previous surveys in Germany [60], approx. 5.72% of chronically infected patients were receiving a statin at the start of antiviral treatment. Importantly, we could see differences between the two study groups such as different frequencies of cirrhosis and genotype 3 infection or inconstant distribution of HCV regimens. To adjust for confounders like presence of cirrhosis, viral genotypes, and used HCV regimens, we performed two different matchings. Matching one includes cirrhosis and genotype while matching two additionally covers HCV regimen. Baseline characteristics of the compared groups are shown in Tables S2 and S3. We used matching one (GT, cirrhosis) to evaluate viral RNA (Figure 6A), aspartate aminotransferase (AST) (Figure 6C), and alanine aminotransferase (ALT) (Figure 6E) levels prior to start of the HCV therapy. Although we found no differences in RNA levels (Figure 6A) between patients, we observed a lower trend for AST levels (52 U/L for DAA vs. 42.5 for DAA + statins) (Figure 6C) and a statistically significant reduction for ALTs values (61 U/L vs. 46) in patients under statin treatment (Figure 6D). Two weeks after beginning HCV treatment, we accounted for cirrhosis, GT, and HCV regimen (matching two) and observed no significant differences in viral RNA, AST, or ALT levels (Figure 6B,E,D). Taken together, our results indicate that statins do not likely affect HCV infection in vivo but may partially protect chronically infected patients before therapy from virus-associated liver damage.

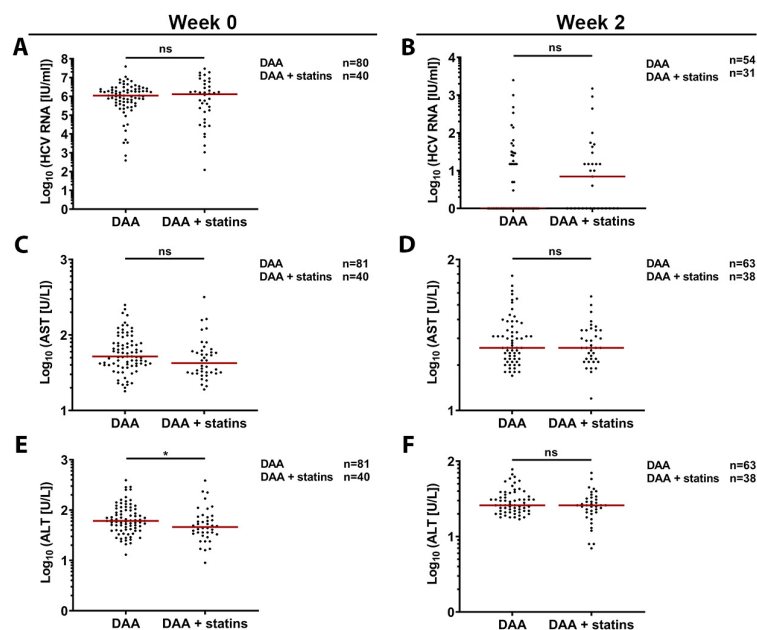


Figure 6. Mildly decreased aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels before HCV therapy in chronically infected patients taking statins. HCV RNA blood levels in patients following HCV direct-acting antiviral (DAA) therapy regimens in the presence or absence of statins (A,B). AST (C,D) and ALT (E,F) blood levels during HCV DAA treatment. Number of patients included in each analysis is shown in the legend and data points for each patient are represented as individual dots. For statistical analysis unpaired, two-tailed, no parametric Mann-Whitney test was performed. No significant (ns) $p > 0.05$; * $p \leq 0.05$.

4. Discussion

The well-established link between lipid metabolism and HCV replication cycle prompted us to study the interplay between lipoprotein receptors and lipid-lowering drugs (LLDs) during HCV infection. While some aspects of the interaction between the HCV replication cycle and LLDs—most notably statins—have previously been studied by others, it remained elusive if combined genetic and pharmacological perturbations targeting host lipid metabolism affect HCV replication. We could confirm that lipoprotein receptors SR-B1 and LDLr play a redundant role in HCV infection that is not dependent on cellular cholesterol content or expression of HCV entry co-factors. Furthermore, we could demonstrate that HCV is more susceptible to LLDs simvastatin and fenofibrate when these receptors are missing. Lastly, statins do not seem to influence HCV viral loads but may improve liver health in vivo in our retrospectively analyzed cohort of HCV infected patients under antiviral therapy.

It is widely accepted that the lipoprotein receptor SR-B1 is critical for HCV entry, while the role of LDLr and whether it is truly required for HCV entry has long been debated. SR-B1 is known to interact with both LVP-embedded ApoE and the viral glycoprotein E2, which ultimately facilitate binding of E2 to the CD81 receptor [11,14]. Moreover, naturally occurring single-nucleotide polymorphisms (SNPs) S112F and T175A are both associated to high HDL-cholesterol serum levels and decrease HCV uptake [13,61]. Here we showed that ablation of SR-B1 affects GP-driven entry, confirming these observations. Likewise, LDLr promotes viral entry by a process dependent on its lipid-binding region [12,13] and an association between SNP rs688 and HCV resistance among HCV multiple exposed individuals has been suggested [62]. In 2016, Yamamoto and colleagues showed that SR-B1 and LDLr may redundantly participate in HCV entry and this effect was dependent on the HDL and LDL binding regions of SR-B1 and LDLr, respectively [13]. However, expression of HCV entry factors such as occludin, claudin-1, or NPC1L as well as differences in cellular cholesterol content were not assessed in the lipoprotein receptor-deficient cell lines in this previous study. Our study confirms and builds on their results by showing that HCV co-factors and cholesterol content are not dramatically affected by lipoprotein receptor ablation (Figure 3D,E). Notably, we observed interclonal variation of SR-B1 and CD81 cell surface levels (Figure 3C). Alterations in CD81 surface expression levels has previously been reported in clonal populations of hepatoma cells [63,64]. Whereas SR-B1 upregulation in LDLr knock-out (KOs) was mild, decreased CD81 cell surface expression was substantial in some clones and this may disturb HCV uptake. In keeping with this, HCV entry and infection in the clones LDLr KO #3 and DKO #2 was greatly reduced (Figure S2A,C). These results bring to light the drawbacks of the genetic variability among KO cell clones sourcing from a common parental cell line and underscore the importance of analyzing multiple KO clones for conclusive findings.

LLDs failed to decrease HCV infection in Huh-7.5 or PHH cells in our study (Figure 2). Although this is in agreement with previous research regarding the PCSK-9 inhibitor alirocumab [31], our results differ from previous findings for the statin simvastatin [27,28]. This disparity might be related to drug-induced cytotoxicity since drug concentrations used in previous studies were close to our calculated half-maximal cytotoxic concentration (CC50, 27.4 μ M, Figure 1). Alternatively, known pleiotropic effects of statins [reviewed in [65,66]] might differ depending on the cell type. Finally, to our knowledge, this is the first study investigating the role of fenofibrate on the whole HCV replication cycle. In summary, we suggest that clinically-relevant drug concentrations [67] of the selected LLDs do not affect HCV infection.

Statins target 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a rate-limiting, pivotal enzyme of the mevalonate pathway [19,20]. This pathway controls both de novo cholesterol synthesis and protein prenylation (geranylgeranylation and farnesylation) [20]. For HCV it was previously suggested that replication is dependent on geranylgeranylation of an unknown host protein [26]. Here we showed in lipoprotein receptor-deficient cell lines (Figure 3A,B) that statins significantly decrease HCV infection

(Figure 5B) without a major impact on cell viability (Figure 5A). This suggests *de novo* cholesterol synthesis and not protein prenylation as the main determinant of HCV susceptibility (Figure 5B). Nevertheless, additional effects of statins on HCV replication via protein prenylation might explain the slight reduction we observed in parental Huh-7.5 cells after treatment with simvastatin (Figure 3A). Future studies should address which steps of the HCV replication cycle are modulated in lipoprotein-deficient cells after statin treatment as well as which metabolites (mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate, and squalene) could rescue HCV infectivity.

Alirocumab targets the secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK-9), which binds to LDLr at the plasma membrane and promotes its lysosomal degradation [23]. We observed a slight enhancing effect of alirocumab on HCV infectivity in the LDL receptor-deficient cells (Figure 5B). Although we do not expect this effect to be biologically relevant, we hypothesize that in the absence of LDLr, PCSK-9 might bind surface SR-B1 and target it for degradation, as previously suggested [68]. Therefore, alirocumab may prevent the interaction of PCSK-9 and SR-B1 and leave SR-B1 cell surface levels unaltered. Following studies could address this theory by assessing the cell surface levels of SR-B1 in the presence or absence of alirocumab in LDLr-deficient cell lines. Lastly, fibrates stimulate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha, which in turn inhibit triglyceride synthesis and increase lipoprotein lipase activity and thereby leading to decreased VLDL assembly and secretion [22]. Fenofibrate mildly inhibited HCV infection of all tested lipoprotein-deficient cell (Figure 5B). Interestingly, reduction of HCV infection was comparable in all cell lines regardless of their genetic background, suggesting that the mode of action of fenofibrate is common in all lipoprotein receptor-deficient cells. Since fibrates induce fatty acid uptake [69] and reduce VLDL secretion [70], ablation of lipoprotein receptors preventing fatty acid uptake together with fibrate treatment decreasing VLDL synthesis results in decreased HCV assembly and release. On the other hand, lipoprotein lipase has been shown to block HCV entry [71]. An increase of this enzyme by fibrates may thus have an additional inhibitory effect. Taken together, we observe differential effects of different classes of LLDs on HCV infection.

The effect of statins on HCV infection in patients is controversial [29,35,36]. A study on recently diagnosed chronically HCV infected patients did not see differences in viral loads [35]. Conversely, combination of statins with PEGylated interferon or direct-acting antivirals (DAAs) significantly decreased HCV viral loads and improved sustained virological responses among patients as compared to PEGylated interferon or DAA treatment alone [29,36]. Our findings suggest that statins may not have a beneficial effect when in combination with specific HCV therapeutics (Figure 6 B,D,F). Besides their role as LLDs, statins are also known to be anti-inflammatory, antifibrotic, and antiangiogenic and thus are thought to protect against chronic inflammatory diseases such as progression of hepatic fibrosis [reviewed in [72]]. Our findings may partly support this model showing a lower trend of AST and significantly reduced ALT levels in patients under statin therapy before DAA treatment (Figure 6C–F). The most important limitation of the studied cohort is the heterogeneous nature of the baseline characteristics. Indeed, different frequencies of cirrhosis and genotype 3 infections, as well as the inconstant distribution of the HCV regimens between the groups can be seen as confounding factors. Hence, we adjusted for possible confounders by matching for different parameters. Matching two (cirrhosis, genotype and regimen) is in our opinion superior to matching one (cirrhosis, genotype) when it comes to interpreting the time points after therapy start. Matching one should only be used to especially focus on week 0 data due to the missing regimen matching. Therefore, significant differences in RNA levels and liver damage markers after therapy start should be neglected in this case. Additionally, the analysis has more limitations. No dosing data of the statins were included, and statin use was only evaluated at one time point during the analysis. Due to the fact that the matching was done in the order of appearance in the original data set, this type of matching could lead to different results when choosing different matching partners from the original cohort. Nevertheless, we think that these

in vivo data may add some interesting hints to the mainly experimental dimensions of this work, but we suggest a careful interpretation of the data.

In summary, in this study, we comprehensively analyzed the combined effects of LLD treatment and genetic alterations of lipoprotein receptors on HCV infection. Our findings suggest that fibrates and PCSK-9 inhibitors do not considerably impact HCV infectivity, whereas statins can affect the HCV replication cycle by inhibition of the de novo cholesterol synthesis branch of the mevalonate pathway. Importantly, statins may partly protect against virus-induced liver damage. Future studies dissecting the HCV replication cycle steps affected by statins may shed light on the specific mechanism underlying statin-induced HCV inhibition.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10071626/s1>, Figure S1. HCV entry co-factor expression. Figure S2. HCV entry, replication, and infectivity of lipoprotein receptor knock-outs LDLr #3 and DKO #2. Table S1. Baseline characteristics of patient cohort. Table S2. Matching 1 characteristics of patients. Table S3. Matching 2 characteristics of patients.

Author Contributions: Conceptualization, T.v.H. and G.G.; methodology, F.J.Z.-B., R.Ö., J.S., B.C.-M., G.B., L.M.A.-F.; validation, F.J.Z.-B., T.v.H. and G.G.; formal analysis, F.J.Z.-B., R.Ö., J.S., B.S., B.C.-M., G.B.; investigation, F.J.Z.-B., R.Ö., J.S., B.C.-M., G.B., L.M.A.-F.; resources, B.S., F.W.R.V., B.M.; data curation, F.J.Z.-B., R.Ö.; writing—original draft preparation, F.J.Z.-B., R.Ö.; writing—review and editing, F.J.Z.-B., R.Ö., T.v.H., G.G.; visualization, F.J.Z.-B., R.Ö.; supervision, T.v.H., G.G.; project administration, F.J.Z.-B., T.v.H., G.G.; funding acquisition, B.M., T.v.H., G.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: G.G. was supported by the Knut and Alice Wallenberg Foundation, the Federal Ministry of Education and Research together with the Ministry of Science and Culture of Lower Saxony through the Professorinnen Programm III and the Federal Ministry of Education and Research (project COVID-Protect, Projektnummer 01KI20143C); G.G. and T. von H. received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) - Projektnummer 158989968 - SFB 900 project C7. G.B. was supported by a grant from Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur und Volkswagen Stiftung awarded to G.G. (Project number: J 11-76251-99-3/19 (ZN3434)).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the local ethics committee (No. 2148-2014).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to patient confidentiality.

Acknowledgments: We thank Charles Rice for provision of reagents. We also thank Corinne Ginkel and Mandy Döpke for technical support.

Conflicts of Interest: B.M. received speaker and/or consulting fees from Abbott Molecular, AbbVie, Janssen-Cilag, Merck (MSD), and Roche. He also received research support from Abbott Molecular and Roche. B.S. received consulting fees from Gilead Sciences GmbH. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Hepatitis C. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c> (accessed on 26 June 2020).
2. Bhamidimarri, K.R.; Satapathy, S.K.; Martin, P. Hepatitis C virus and liver transplantation. *Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *13*, 214–220.
3. Pecoraro, V.; Banzi, R.; Cariani, E.; Chester, J.; Villa, E.; D’Amico, R.; Beretele, V.; Trenti, T. New Direct-Acting Antivirals for the Treatment of Patients with Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2019**, *9*, 522–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jacobson, I.M.; McHutchison, J.G.; Dusheiko, G.; Di Bisceglie, A.M.; Reddy, K.R.; Bzowej, N.H.; Marcellin, P.; Muir, A.J.; Ferenci, P.; Flisiak, R.; et al. ADVANCE Study Team Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2405–2416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Feld, J.J.; Jacobson, I.M.; Hézode, C.; Asselah, T.; Ruane, P.J.; Gruener, N.; Abergel, A.; Mangia, A.; Lai, C.-L.; Chan, H.L.Y.; et al. ASTRAL-1 Investigators Sofosbuvir and velpatasvir for HCV genotype 1, 2, 4, 5, and 6 infection. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 2599–2607. [[CrossRef](#)]
6. Thomssen, R.; Bonk, S.; Propfe, C.; Heermann, K.H.; Köchel, H.G.; Uy, A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* **1992**, *181*, 293–300. [[CrossRef](#)]
7. André, P.; Komurian-Pradel, F.; Deforges, S.; Perret, M.; Berland, J.L.; Sodoyer, M.; Pol, S.; Bréchet, C.; Paranhos-Baccalà, G.; Lotteau, V. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J. Virol.* **2002**, *76*, 6919–6928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Egger, D.; Wölk, B.; Gosert, R.; Bianchi, L.; Blum, H.E.; Moradpour, D.; Bienz, K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5974–5984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Miyanari, Y.; Atsuzawa, K.; Usuda, N.; Watashi, K.; Hishiki, T.; Zayas, M.; Bartenschlager, R.; Wakita, T.; Hijikata, M.; Shimotohno, K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1089–1097. [[CrossRef](#)]
10. Huang, H.; Sun, F.; Owen, D.M.; Li, W.; Chen, Y.; Gale, M.; Ye, J. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5848–5853. [[CrossRef](#)]
11. Scarselli, E.; Ansuini, H.; Cerino, R.; Roccasecca, R.M.; Acali, S.; Filocamo, G.; Traboni, C.; Nicosia, A.; Cortese, R.; Vitelli, A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **2002**, *21*, 5017–5025. [[CrossRef](#)]
12. Agnello, V.; Abel, G.; Elfahal, M.; Knight, G.B.; Zhang, Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12766–12771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yamamoto, S.; Fukuhara, T.; Ono, C.; Uemura, K.; Kawachi, Y.; Shiokawa, M.; Mori, H.; Wada, M.; Shima, R.; Okamoto, T.; et al. Lipoprotein receptors redundantly participate in entry of hepatitis C virus. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dao Thi, V.L.; Granier, C.; Zeisel, M.B.; Guérin, M.; Mancip, J.; Granio, O.; Penin, F.; Lavillette, D.; Bartenschlager, R.; Baumert, T.F.; et al. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 31242–31257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Albecka, A.; Belouzard, S.; Op de Beeck, A.; Descamps, V.; Goueslain, L.; Bertrand-Michel, J.; Tercé, F.; Duverlie, G.; Rouillé, Y.; Dubuisson, J. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* **2012**, *55*, 998–1007. [[CrossRef](#)]
16. Owen, D.M.; Huang, H.; Ye, J.; Gale, M. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **2009**, *394*, 99–108. [[CrossRef](#)]
17. Wünschmann, S.; Medh, J.D.; Klinzmann, D.; Schmidt, W.N.; Stapleton, J.T. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J. Virol.* **2000**, *74*, 10055–10062. [[CrossRef](#)]
18. Chhetry, M.; Jialal, I. Lipid lowering drug therapy. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
19. Istvan, E.S.; Deisenhofer, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **2001**, *292*, 1160–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Goldstein, J.L.; Brown, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **1990**, *343*, 425–430. [[CrossRef](#)]
21. Ghonem, N.S.; Assis, D.N.; Boyer, J.L. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* **2015**, *62*, 635–643. [[CrossRef](#)]
22. Staels, B.; Dallongeville, J.; Auwerx, J.; Schoonjans, K.; Leitersdorf, E.; Fruchart, J.C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **1998**, *98*, 2088–2093. [[CrossRef](#)]
23. Lagace, T.A. PCSK9 and LDLR degradation: Regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, *25*, 387–393. [[CrossRef](#)]
24. Lagace, T.A.; Curtis, D.E.; Garuti, R.; McNutt, M.C.; Park, S.W.; Prather, H.B.; Anderson, N.N.; Ho, Y.K.; Hammer, R.E.; Horton, J.D. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 2995–3005. [[CrossRef](#)]
25. Mullard, A. Cholesterol-lowering blockbuster candidates speed into Phase III trials. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2012**, *11*, 817–819. [[CrossRef](#)]
26. Ye, J.; Wang, C.; Sumpter, R.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.; Gale, M. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15865–15870. [[CrossRef](#)]
27. Blanchet, M.; Le, Q.-T.; Seidah, N.G.; Labonté, P. Statins can exert dual, concentration dependent effects on HCV entry in vitro. *Antivir. Res.* **2016**, *128*, 43–48. [[CrossRef](#)]
28. Wuestenberg, A.; Kah, J.; Singethan, K.; Sirma, H.; Keller, A.D.; Rosal, S.R.P.; Schrader, J.; Loscher, C.; Volz, T.; Bartenschlager, R.; et al. Matrix conditions and KLF2-dependent induction of heme oxygenase-1 modulate inhibition of HCV replication by fluvastatin. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ikeda, M.; Abe, K.; Yamada, M.; Dansako, H.; Naka, K.; Kato, N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* **2006**, *44*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Delang, L.; Paeshuyse, J.; Vlieghe, I.; Leyssen, P.; Obeid, S.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Op de Beeck, A.; Neyts, J. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology* **2009**, *50*, 6–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ramanathan, A.; Gusarova, V.; Stahl, N.; Gurnett-Bander, A.; Kyratsous, C.A. Alirocumab, a Therapeutic Human Antibody to PCSK9, Does Not Affect CD81 Levels or Hepatitis C Virus Entry and Replication into Hepatocytes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154498. [[CrossRef](#)]

32. Sabile, A.; Perlemuter, G.; Bono, F.; Kohara, K.; Demaugre, F.; Kohara, M.; Matsuura, Y.; Miyamura, T.; Bréchet, C.; Barba, G. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology* **1999**, *30*, 1064–1076. [[CrossRef](#)]
33. Wang, Z.; Gao, Y.; Zhang, C.; Hu, H.; Guo, D.; Xu, Y.; Xu, Q.; Zhang, W.; Deng, S.; Lv, P.; et al. Quinolinate phosphoribosyltransferase is an antiviral host factor against hepatitis C virus infection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5876. [[CrossRef](#)]
34. Bader, T.; Hughes, L.D.; Fazili, J.; Frost, B.; Dunnam, M.; Gonterman, A.; Madhoun, M.; Aston, C.E. A randomized controlled trial adding fluvastatin to peginterferon and ribavirin for naïve genotype 1 hepatitis C patients. *J. Viral. Hepat.* **2013**, *20*, 622–627. [[CrossRef](#)]
35. Forde, K.-A.; Law, C.; O'Flynn, R.; Kaplan, D.-E. Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 5020–5027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Butt, A.A.; Yan, P.; Bonilla, H.; Abou-Samra, A.-B.; Shaikh, O.S.; Simon, T.G.; Chung, R.T.; Rogal, S.S. ERCHIVES (Electronically Retrieved Cohort of HCV Infected Veterans) Study Team Effect of addition of statins to antiviral therapy in hepatitis C virus-infected persons: Results from ERCHIVES. *Hepatology* **2015**, *62*, 365–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Atsukawa, M.; Tsubota, A.; Kondo, C.; Itokawa, N.; Narahara, Y.; Nakatsuka, K.; Hashimoto, S.; Fukuda, T.; Matsushita, Y.; Kidokoro, H.; et al. Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 51–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Fujita, N.; Kaito, M.; Kai, M.; Sugimoto, R.; Tanaka, H.; Horiike, S.; Konishi, M.; Iwasa, M.; Watanabe, S.; Adachi, Y. Effects of bezafibrate in patients with chronic hepatitis C virus infection: Combination with interferon and ribavirin. *J. Viral. Hepat.* **2006**, *13*, 441–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Knop, V.; Bergk, A.; Schlosser, B.; Thieringer, J.; van Bömmel, F.; Frost, N.; Kintscher, U.; Berg, T. Bezafibrate maintenance therapy in patients with advanced chronic hepatitis C. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *25*, 594–600. [[CrossRef](#)]
40. Labonté, P.; Begley, S.; Guévin, C.; Asselin, M.-C.; Nassoury, N.; Mayer, G.; Prat, A.; Seidah, N.G. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology* **2009**, *50*, 17–24. [[CrossRef](#)]
41. Evans, M.J.; von Hahn, T.; Tscherne, D.M.; Syder, A.J.; Panis, M.; Wölk, B.; Hatzioannou, T.; McKeating, J.A.; Bieniasz, P.D.; Rice, C.M. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **2007**, *446*, 801–805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gunesch, A.P.; Zapatero-Belinchón, F.J.; Pinkert, L.; Steinmann, E.; Manns, M.P.; Schneider, G.; Pietschmann, T.; Brönstrup, M.; von Hahn, T. Filovirus Antiviral Activity of Cationic Amphiphilic Drugs Is Associated with Lipophilicity and Ability To Induce Phospholipidosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00143-20. [[CrossRef](#)]
43. Bartosch, B.; Dubuisson, J.; Cosset, F.-L. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 633–642. [[CrossRef](#)]
44. Pietschmann, T.; Kaul, A.; Koutsoudakis, G.; Shavinskaya, A.; Kallis, S.; Steinmann, E.; Abid, K.; Negro, F.; Dreux, M.; Cosset, F.-L.; et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7408–7413. [[CrossRef](#)]
45. Koutsoudakis, G.; Kaul, A.; Steinmann, E.; Kallis, S.; Lohmann, V.; Pietschmann, T.; Bartenschlager, R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5308–5320. [[CrossRef](#)]
46. Sakuma, T.; Nishikawa, A.; Kume, S.; Chayama, K.; Yamamoto, T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sheldon, J.; Beach, N.M.; Moreno, E.; Gallego, I.; Piñeiro, D.; Martínez-Salas, E.; Gregori, J.; Quer, J.; Esteban, J.I.; Rice, C.M.; et al. Increased replicative fitness can lead to decreased drug sensitivity of hepatitis C virus. *J. Virol.* **2014**, *88*, 12098–12111. [[CrossRef](#)]
48. Ciesek, S.; Westhaus, S.; Wicht, M.; Wappler, I.; Henschen, S.; Sarrazin, C.; Hamdi, N.; Abdelaziz, A.I.; Strassburg, C.P.; Wedemeyer, H.; et al. Impact of intra- and interspecies variation of occludin on its function as coreceptor for authentic hepatitis C virus particles. *J. Virol.* **2011**, *85*, 7613–7621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kleine, M.; Riemer, M.; Krech, T.; DeTemple, D.; Jäger, M.D.; Lehner, F.; Manns, M.P.; Klempnauer, J.; Borlak, J.; Bektas, H.; et al. Explanted diseased livers—A possible source of metabolic competent primary human hepatocytes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Perales, C.; Beach, N.M.; Gallego, I.; Soria, M.E.; Quer, J.; Esteban, J.I.; Rice, C.; Domingo, E.; Sheldon, J. Response of hepatitis C virus to long-term passage in the presence of alpha interferon: Multiple mutations and a common phenotype. *J. Virol.* **2013**, *87*, 7593–7607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Carpentier, A.; Sheldon, J.; Vondran, F.W.R.; Brown, R.J.; Pietschmann, T. Efficient acute and chronic infection of stem cell-derived hepatocytes by hepatitis C virus. *Gut* **2020**, *69*, 1659–1666. [[CrossRef](#)]
52. Costa, R.; Todt, D.; Zapatero-Belinchón, F.; Schenk, C.; Anastasiou, O.E.; Walker, A.; Hertel, B.; Timmer, L.; Bojkova, D.; Ruckert, M.; et al. SEC14L2, a lipid-binding protein, regulates HCV replication in culture with inter- and intra-genotype variations. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 603–614. [[CrossRef](#)]
53. Okonechnikov, K.; Golosova, O.; Fursov, M. UGENE team Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1166–1167. [[CrossRef](#)]
54. Vieyres, G.; Pietschmann, T. Entry and replication of recombinant hepatitis C viruses in cell culture. *Methods* **2013**, *59*, 233–248. [[CrossRef](#)]

55. Zapatero-Belinchón, F.J.; Dietzel, E.; Dolnik, O.; Döhner, K.; Costa, R.; Hertel, B.; Veselkova, B.; Kirui, J.; Klintworth, A.; Manns, M.P.; et al. Characterization of the Filovirus-Resistant Cell Line SH-SY5Y Reveals Redundant Role of Cell Surface Entry Factors. *Viruses* **2019**, *11*, 275. [[CrossRef](#)]
56. Bruening, J.; Lasswitz, L.; Banse, P.; Kahl, S.; Marinach, C.; Vondran, F.W.; Kaderali, L.; Silvie, O.; Pietschmann, T.; Meissner, F.; et al. Hepatitis C virus enters liver cells using the CD81 receptor complex proteins calpain-5 and CBLB. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007111. [[CrossRef](#)]
57. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P.W., et al., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2004.
58. Maasoumy, B.; Vermehren, J.; Welker, M.-W.; Bremer, B.; Perner, D.; Höner Zu Siederdissen, C.; Deterding, K.; Lehmann, P.; Cloherty, G.; Reinhardt, B.; et al. Clinical value of on-treatment HCV RNA levels during different sofosbuvir-based antiviral regimens. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 473–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A.J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **1998**, *282*, 938–941. [[CrossRef](#)]
60. Knopf, H.C.; Busch, M.A.; Du, Y.; Truthmann, J.; Schienkiewitz, A.; Scheidt-Nave, C. Changes in the prevalence of statin use in Germany—Findings from national health interview and examination surveys 1997–1999 and 2008–2011. *Z. Evid. Fortbild. Qual. Gesundheitswes.* **2017**, *122*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Westhaus, S.; Deest, M.; Nguyen, A.T.X.; Stanke, F.; Heckl, D.; Costa, R.; Schambach, A.; Manns, M.P.; Berg, T.; Vondran, F.W.R.; et al. Scavenger receptor class B member 1 (SCARB1) variants modulate hepatitis C virus replication cycle and viral load. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 237–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Steba, G.S.; Koekkoek, S.M.; Tanck, M.W.T.; Vanhommerig, J.W.; van der Meer, J.T.M.; Kwa, D.; Brinkman, K.; Prins, M.; Berkhout, B.; Pollakis, G.; et al. MOSAIC (MSM observational Study of Acute infection with Hepatitis C) Study Group and the ACS (Amsterdam Cohort Studies) SNP rs688 within the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) gene associates with HCV susceptibility. *Liver Int.* **2019**, *39*, 463–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Witteveldt, J.; Evans, M.J.; Bitzegeio, J.; Koutsoudakis, G.; Owsianka, A.M.; Angus, A.G.N.; Keck, Z.-Y.; Fong, S.K.H.; Pietschmann, T.; Rice, C.M.; et al. CD81 is dispensable for hepatitis C virus cell-to-cell transmission in hepatoma cells. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 48–58. [[CrossRef](#)]
64. Bitzegeio, J.; Bankwitz, D.; Hueging, K.; Haid, S.; Brohm, C.; Zeisel, M.B.; Herrmann, E.; Iken, M.; Ott, M.; Baumert, T.F.; et al. Adaptation of hepatitis C virus to mouse CD81 permits infection of mouse cells in the absence of human entry factors. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000978. [[CrossRef](#)]
65. Janicko, M.; Drazilova, S.; Pella, D.; Fedacko, J.; Jarcuska, P. Pleiotropic effects of statins in the diseases of the liver. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 6201–6213. [[CrossRef](#)]
66. Liao, J.K.; Laufs, U. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 89–118. [[CrossRef](#)]
67. Björkhem-Bergman, L.; Lindh, J.D.; Bergman, P. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 164–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Adorni, M.P.; Cipollari, E.; Favari, E.; Zanotti, I.; Zimetti, F.; Corsini, A.; Ricci, C.; Bernini, F.; Ferri, N. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis* **2017**, *256*, 1–6. [[CrossRef](#)]
69. Martin, G.; Schoonjans, K.; Lefebvre, A.M.; Staels, B.; Auwerx, J. Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28210–28217. [[CrossRef](#)]
70. Lamb, R.G.; Koch, J.C.; Bush, S.R. An enzymatic explanation of the differential effects of oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta BBA Lipids Lipid Metab.* **1993**, *1165*, 299–305. [[CrossRef](#)]
71. Maillard, P.; Walic, M.; Meuleman, P.; Roohvand, F.; Huby, T.; Le Goff, W.; Leroux-Roels, G.; Pécheur, E.-I.; Budkowska, A. Lipoprotein lipase inhibits hepatitis C virus (HCV) infection by blocking virus cell entry. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Pose, E.; Trebicka, J.; Mookerjee, R.P.; Angeli, P.; Ginès, P. Statins: Old drugs as new therapy for liver diseases? *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 194–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

WEITERE ERGEBNISSE

In Ergänzung zu den in der Publikation untersuchten lipidsenkenden Medikamenten, ist Teil dieser Arbeit zudem der Einfluss von ausgewählten CETP-Inhibitoren auf den HCV-Replikationszyklus. Im Folgenden werden daher ergänzende Materialien, Methoden und Ergebnisse beschrieben. Falls nicht beschrieben, so wurden die Experimente entsprechend der Beschreibung von Zapatero-Belinchón und Ötjengerdes *et al.* (78) durchgeführt.

Material und Methoden

HCVpp-, HCVcc-Infektionsexperimente und Zellviabilität-Assays

Alle HCVpp-, HCVcc-Infektionsexperimente und Zellviabilität-Assays (Nluc- und MTT-Assay) wurden wie in Zapatero-Belinchón und Ötjengerdes *et al.* beschrieben durchgeführt (78).

Lipid-Lowering Drugs

Obicetrapib (DC10134) wurde von DC Chemicals (Shanghai, P.R. China) und Anacetrapib (cay-21558) von Biomol (Hamburg, Deutschland) bezogen. Beide CETP-Inhibitoren wurden als Stocklösung in DMSO zu einer Konzentration von 50 mM gelöst und bei -20 °C gelagert. Torcetrapib (PZ0170) wurde von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) gekauft, in DMSO zu einer Stocklösung von 50 mM verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurden die Programme Microsoft Excel (Version 16.65) und GraphPad Prism 9 (Version 9.4.1) genutzt. Zur Kalkulation der p-Werte wurde die Multiple Comparison One-Way- oder Two-Way-ANOVA-Analyse mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Zur Darstellung der statistischen Signifikanz wurden folgende Werte genutzt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

CETP-Inhibitor Obicetrapib hat keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt

Um beobachten zu können, ob CETP-Inhibitoren einen Einfluss auf den HCV-Eintritt haben, wurden Huh-7.5-Zellen mit 0,1 μM , 1 μM oder 10 μM Obicetrapib präinkubiert, bevor sie mit Nluc-kodierenden Pseudopartikeln (pp) transduziert wurden, die entweder HCV-Genotyp 1a (H77) E1-E2-Glykoproteine oder Murine-Leukämie-Virus-Envelope (MLVpp) tragen (Abb. 1A). Um die Zytotoxizität zu bestimmen, wurden stabil-Nluc-exprimierende Huh-7.5 Zellen auf die gleiche Art behandelt, ohne jedoch mit pps transduziert zu werden (Abb. 1B).

Die relative Infektiosität von HCVpps steigt für die unterschiedlichen Konzentrationen von Obicetrapib in ähnlichem Maß wie die der MLVpps an (Abb. 1A). Es kommt nicht zu einer Minderung der relativen Infektiosität. Konzentrationen bis zu 10 μM Obicetrapib zeigen keine Zytotoxizität. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich bestätigen, dass der CETP-Inhibitor Obicetrapib keinen Einfluss auf den Pseudopartikel vermittelten HCV-Eintritt zu haben scheint.

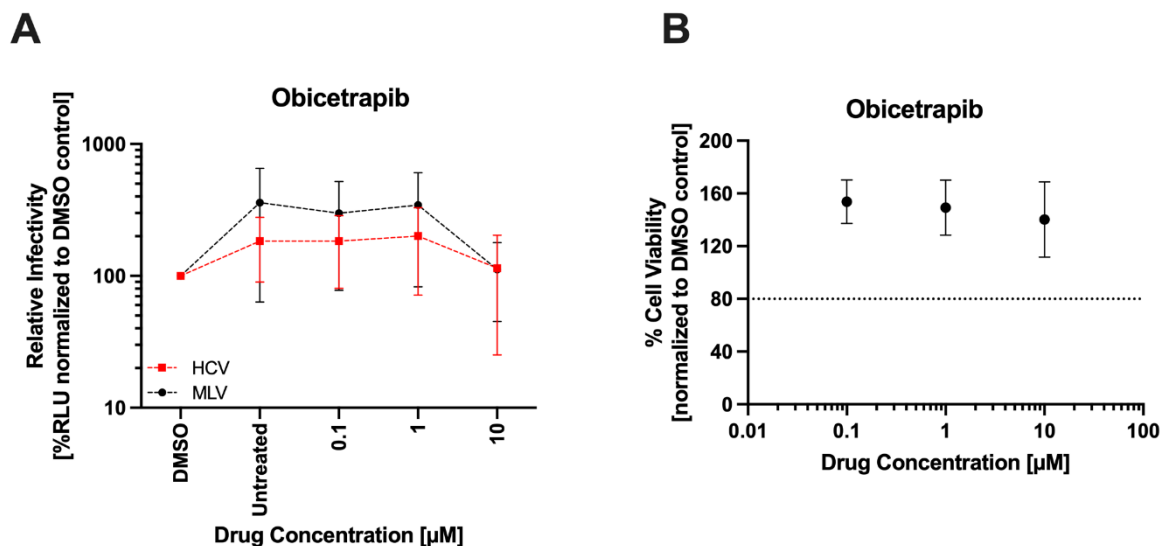


Abbildung 1: CETP-Inhibitor Obicetrapib hat keinen Einfluss auf den HCV-Genotyp-1a-Eintritt in Huh-7.5-Zellen. Dosis-abhängiger Effekt von Obicetrapib auf den Eintritt lentiviraler Pseudopartikel HCVpp in Huh-7.5 Zellen (A). Huh-7.5-Zellen wurden für 24 h mit 0,1 μM , 1 μM oder 10 μM Obicetrapib präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den für Nluc-kodierenden pps transduziert, die entweder die HCV Glykoproteine E1-E2 GT1a (HCV) oder MLV env (MLV) enthalten und für 6 h weiter mit Obicetrapib inkubiert. 72 h nach Transduktion wurde die Nluc-Aktivität gemessen. Die Infektivität wurde zur DMSO-Kontrolle normalisiert. MLV fungiert als Kontrolle. **Dosisabhängige Zytotoxizität von Obicetrapib. (B).** Nluc-exprimierende Huh-7.5-Zellen wurden wie in (A) mit Obicetrapib behandelt, ohne mit lentiviralen Pseudopartikeln transduziert zu werden. Insgesamt wurden die Zellen für 30 h mit Obicetrapib inkubiert. Nach insgesamt 96 h wurde die Nluc-Aktivität gemessen. Die Messwerte wurden zur DMSO-Kontrolle normalisiert und als Zellviabilität dargestellt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Torcetrapib beeinflussen den HCV-Replikationszyklus

Um zu prüfen, ob die CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Torcetrapib einen Einfluss auf den gesamten HCV-Replikationszyklus haben, wurden Huh-7.5 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Medikamente präinkubiert und anschließend mit HCVcc-Genotyp-2a-Fluc-Reportervirus (Fluc-JC1) infiziert (Abb. 2A, C). Während des gesamten Inkubationszeitraumes wurden die Zellen mit gleichbleibenden Konzentrationen des jeweiligen CETP-Inhibitors behandelt. Gleichzeitig wurde in einem parallelen Ansatz die Zytotoxizität dieser Substanzen mit Hilfe des MTT-Assays getestet (Abb. 2B, D).

Diese Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten erhoben und müssen daher als vorläufige Ergebnisse betrachtet werden.

Es zeigte sich, dass Obicetrapib und Torcetrapib den HCV-Replikationszyklus beeinflussen können (Abb. 2). Für Obicetrapib wurde beobachtet, dass bereits Konzentrationen von 3 μM und 5 μM , wenn auch nicht signifikant, die HCV-Infektiosität reduzieren (Abb. 2A). Ab Konzentrationen von 10 μM Obicetrapib zeigt sich eine signifikante Reduktion der Infektiosität. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) liegt bei 3,63 μM . Für die Zytotoxizität von Obicetrapib zeigt sich in diesem experimentellen Ansatz jedoch, dass die halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC_{50}) bei 7,8 μM liegt (Abb. 2B). Die inhibitorischen Effekte von Obicetrapib lassen sich somit vermutlich zu einem Großteil auf zytotoxische Effekte zurückführen.

Torcetrapib kann die Infektiosität von HCV ab einer Konzentration von 3 μM signifikant reduzieren (Abb. 2C). Die IC_{50} liegt bei 1,14 μM . Interessanterweise zeigt sich bei einer Konzentration von 0,3 μM eine Steigerung der HCV Infektiosität. Konzentrationen von Torcetrapib von bis zu 50 μM scheinen die Zellviabilität zwar zu beeinflussen, dennoch wurde eine Zellviabilität von 50% nicht unterschritten (Abb. 2D). Torcetrapib scheint einen Einfluss auf den HCV-Replikationszyklus zu haben. Höhere Konzentrationen wirken sich zwar auf die Zellviabilität von Huh-7.5-Zellen aus, der Effekt ist jedoch gering.

Zusammenfassend, zeigen die Ergebnisse, dass insbesondere Torcetrapib den gesamten HCV-Replikationszyklus hemmen kann. Für Obicetrapib sind vermutlich zytotoxische Effekte für die Reduktion der HCV-Infektiosität ursächlich.

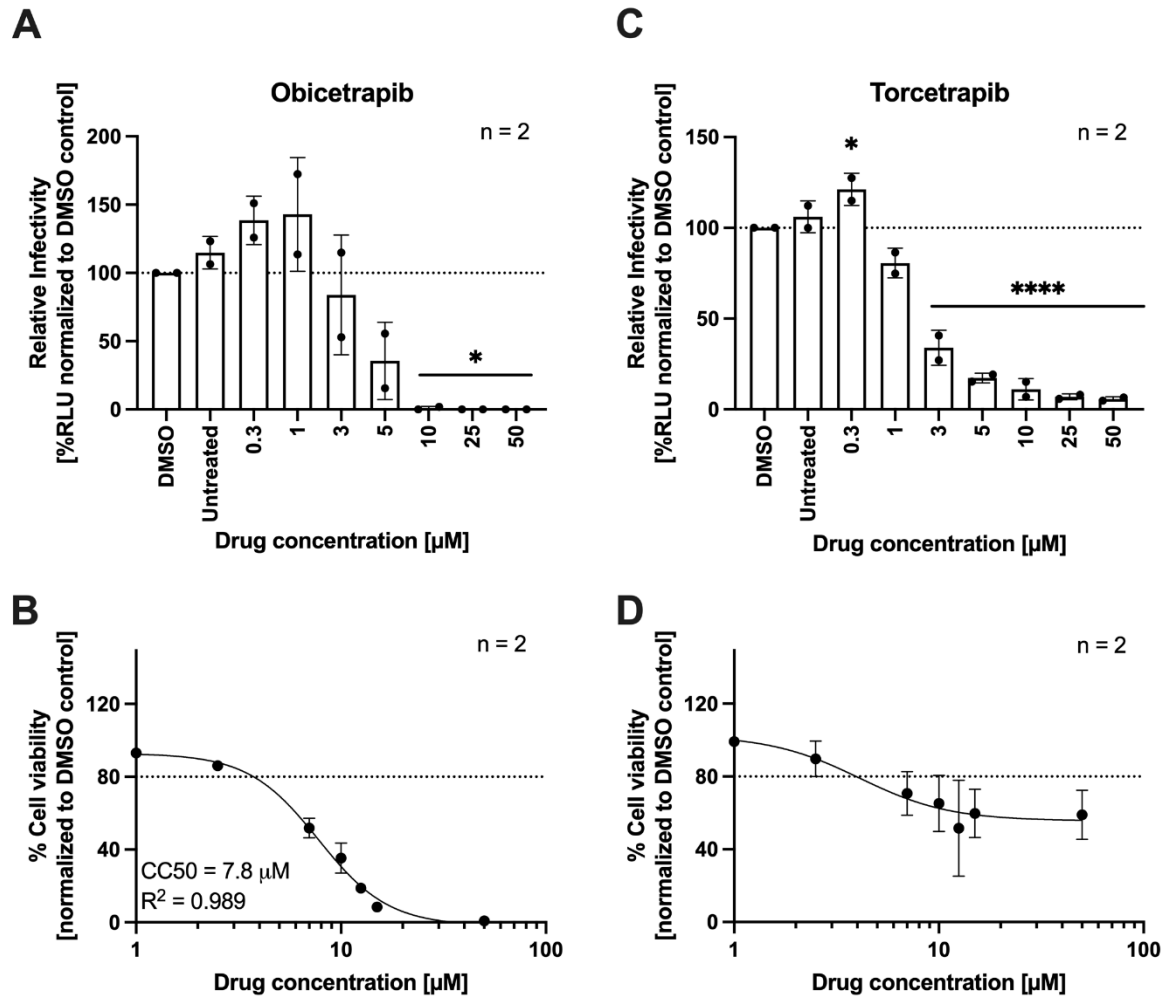


Abbildung 2: CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Torcetrapib beeinflussen die HCV-Genotyp-2a-Infektion in Huh-7.5 Zellen. Dosisabhängiger Einfluss von Obicetrapib und Torcetrapib auf HCVcc vermittelte Genotyp-2a-Infektion (A, C). Zellen wurden für 24 h mit 0,3 μM, 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM oder 50 μM Obicetrapib (A) oder Torcetrapib (C) inkubiert. Im Anschluss wurden die Huh-7.5 Zellen für 4 h mit HCVcc Fluc-JC1 infiziert und mit den CETP-Inhibitoren weiter inkubiert. Nach weiteren 68 h unter Inkubation mit CETP-Inhibitoren wurde die Fluc-Aktivität bestimmt und die Infektiosität zur DMSO-Kontrolle normiert. Dargestellt werden die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte der technischen Replikate eines einzelnen Experimentes, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Zur Berechnung der p-Werte wurde eine One-Way-ANOVA-Analyse mit Dunnett-Korrektur durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durchgeführt. Für die statistische Signifikanz gilt hier: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. **Zytotoxizität von CETP-Inhibitoren (B, D).** Huh-7.5-Zellen wurden mit 1 μM, 2,5 μM, 7 μM, 10 μM, 12,5 μM, 15 μM oder 50 μM Obicetrapib (B) oder Torcetrapib (D) wie in A und B behandelt ohne mit HCV infiziert zu werden. Nach insgesamt 96 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der CETP-Inhibitoren wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die Zellviabilität zur DMSO-Lösemittelkontrolle normiert. Um die CC₅₀-Konzentration zu berechnen wurde ein Kurvenfit durchgeführt. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

CETP-Inhibitor Obicetrapib beeinflusst möglicherweise die HCV-Infektion in lipoproteinrezeptordefizienten Zellen

Weiterhin wurde der Einfluss der CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Anacetrapib auf die lipoproteinrezeptordefizienten Zellen SR-B1 KO #3, LDLr KO #1 und Doppel-Knockout (DKO) #1 untersucht (Abb. 3). Dazu wurden die Lipoproteinrezeptormutanten 24 h vor Infektion mit HCVcc Fluc-JC1 mit Obicetrapib und Anacetrapib präinkubiert. 72 h nach Infektion wurde die Luciferase-Aktivität gemessen und zur DMSO-Kontrolle normiert.

Obicetrapib vermindert die Infektiosität von HCV bereits ab 5 μ M in allen Lipoproteinrezeptormutanten. Bei einer Konzentration von 10 μ M Obicetrapib liegt die relative Infektiosität nahezu unterhalb der Nachweisgrenze. Hierbei sollten jedoch zytotoxische Effekte beachtet werden. In Huh-7.5-Zellen liegt der CC_{50} bei 7,8 μ M (Abb. 2B). Daher ist nicht auszuschließen, dass die Effekte in den lipoproteinrezeptordefizienten Zellen durch zytotoxische Effekte beeinflusst werden.

Der CETP-Inhibitor Anacetrapib zeigt keine signifikanten Effekte auf den HCV-Replikationszyklus in den KO-Mutanten. In DKO #1 zeigt sich die Tendenz, dass Anacetrapib die Infektiosität, wenn auch nicht statistisch signifikant, reduziert.

Obicetrapib scheint den HCV-Replikationszyklus in den lipoproteinrezeptordefizienten Zellen zu beeinflussen, wobei zytotoxische Effekte nicht auszuschließen sind.

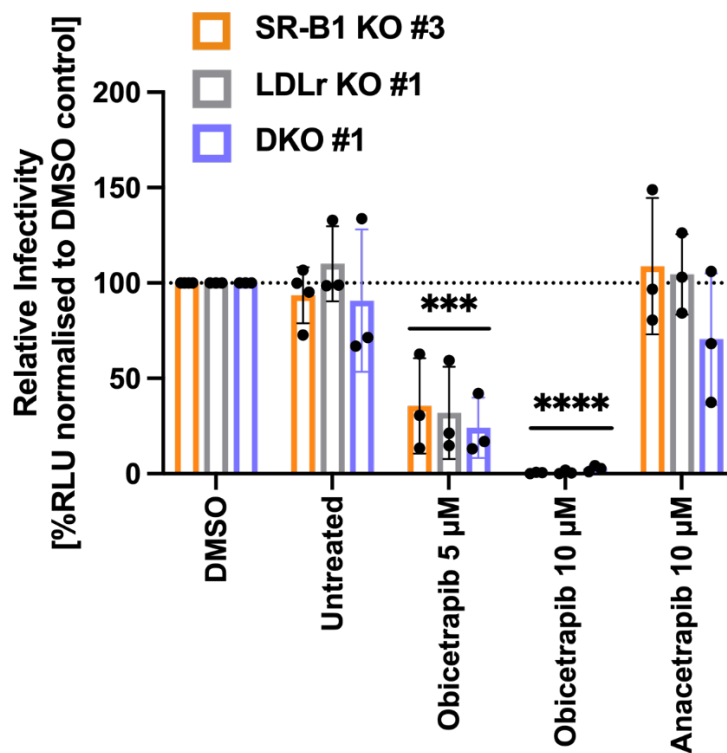


Abbildung 3: CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Anacetrapib haben unterschiedliche Effekte auf die HCV-Genotyp-2a-Infektion in Huh-7.5-Zellen, in denen Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr fehlen. Lipoproteinrezeptordefiziente Huh-7.5 Zellen SR-B1 KO#3, LDLr KO #1 und die Doppel-KO-Mutante DKO #1 wurden 24 h mit 5 µM Obicetrapib, 10 µM Obicetrapib oder 10 µM Anacetrapib präinkubiert. Die Zellen wurden unter Anwesenheit der CETP-Inhibitoren mit HCVcc Fluc-JC1 für 4 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 68 h mit entsprechender Konzentration der CETP-Inhibitoren inkubiert, die Luciferase-Aktivität bestimmt und zur DMSO-Kontrolle normiert. Dargestellt werden die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten. Von SR-B1 KO #3 untreated und DMSO sind bei paralleler Durchführung vier Experimente dargestellt. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte der technischen Replikate eines einzelnen Experimentes, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way-ANOVA mit Dunnett-Korrektur. Die statistische Auswertung wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durchgeführt. Für die statistische Signifikanz gilt hier: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

DISKUSSION

Der Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus ist eng mit dem Fettstoffwechsel der Wirtszelle verknüpft. Trotz jahrzehntelanger Forschung in diesem Gebiet, ist die Rolle des LDLr weiterhin unklar (24,26,32,33). Lipidsenkende Medikamente greifen in den Fettstoffwechsel ein. In nur wenigen Studien konnte, insbesondere für Statine, ein Einfluss auf die Infektiosität von HCV gezeigt werden (60,64,65).

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass der LDLr die Funktion von SR-B1 übernehmen könnte. Dieser Effekt ist unabhängig von der Cholesterolkonzentration oder der Expression von anderen Eintrittsfaktoren ist. Die redundante Funktion von LDLr und SR-B1 konnte nicht für den HCV-Eintritt nachgewiesen werden. Lipidsenkende Medikamente scheinen *in vitro* keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt zu haben. Fehlen die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr dagegen, zeigen Simvastatin und Fenofibrat eine geringe, wenngleich nicht signifikante, Reduktion der Infektiosität. Der CETP-Inhibitor Torcetrapib scheint den HCV-Replikationszyklus zu hemmen.

Der Einfluss von Lipoproteinrezeptoren im HCV-Replikationszyklus wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht. Während mittlerweile gut dokumentiert ist, dass SR-B1 eine wichtige Funktion während des HCV-Eintritts einnimmt (25,31), wurde die Rolle des LDLr in der Vergangenheit kontrovers diskutiert (24,26,34).

In dieser Studie wurde bestätigt, dass der Lipoproteinrezeptor SR-B1 entscheidend für den HCV-Eintritt ist und ein Fehlen dieses Rezeptors den HCV-Eintritt vermindert. Außerdem wurde gezeigt, dass der LDLr keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt hat.

Frühere Studien legten die Vermutung nahe, dass der LDLr eine Funktion im HCV-Replikationszyklus haben könnte (34). In unserer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass in LDLr-Defizienten Zelllinien die HCV-Replikation unverändert bleibt. Ebenso scheint SR-B1 keine Rolle in der HCV-Replikation zu spielen.

In 2016 zeigten Yamamoto *et al.*, dass SR-B1 und LDLr eine redundante Rolle im HCV-Eintritt spielen. In Zellen, denen entweder der SR-B1 oder der LDLr fehlte, war die HCV-Infektiosität im HCVcc-Modell vermindert. Der Effekt war umso größer, wenn beide Rezeptoren fehlten (26). Unsere Studie bestätigte zwar, dass SR-B1 und LDLr eine redundante Funktion im HCV-Replikationszyklus einnehmen, konnte dies jedoch nicht für den HCV-Eintritt und HCV-Replikation bestätigen. Zusätzlich zeigten wir, dass die HCV-supprimierenden Effekte in den lipoproteinrezeptordefizienten Zelllinien unabhängig von einer veränderten Expression der Eintrittsfaktoren CD81, Claudin-1, Occludin und NPC1L1 sind. Auch der Cholesterolgehalt ist in den Rezeptormutanten unverändert. Ergänzend wäre es interessant zu untersuchen, ob sich der

Cholesterolgehalt während einer HCV-Infektion in den lipoproteinrezeptordefizienten Zelllinien verändert. Wir stellten außerdem fest, dass es in den mit CRISPR-Cas9-Technologie erzeugten Lipoproteinrezeptormutanten klonale Unterschiede in der Expression von Oberflächenrezeptoren geben kann. Für zukünftige Experimente sollte dieses Risiko berücksichtigt werden.

Lipidsenkende Medikamente zeigten in einigen Studien einen möglichen Einfluss auf den HCV-Replikationszyklus (61,62,64,72). Dennoch sind die wenigen Ergebnisse bislang nicht wegweisend und insbesondere die Funktion von Statinen *in vivo* ist nicht abschließend geklärt (65–67). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die getesteten lipidsenkenden Medikamente den HCV-Eintritt nicht beeinflussen. Es konnte kein Effekt von lipidsenkenden Medikamenten auf den gesamten HCV-Replikationszyklus, sowohl in Huh-7.5 Zellen als auch in primären Hepatozyten gezeigt werden.

Dies steht im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen, die einen dosisabhängigen Einfluss von Statinen auf den HCV-Eintritt beschreiben. In der Studie von Blanchet *et al.* zeigte sich für die Konzentrationen von 2,5 μM und 5 μM eine gesteigerte HCV-Infektiosität während sich Konzentrationen von 20–40 μM hemmend auf den HCV-Replikationszyklus auswirkten (64). In unserer Arbeit lag der CC_{50} , die halbmaximale zytotoxische Konzentration, von Simvastatin für Huh-7.5-Zellen bei 27,4 μM . Die höchste nicht-zytotoxische Konzentration von Simvastatin lag in diesen Experimenten bei 1 μM . In unserer Arbeit sind die nicht-zytotoxischen Konzentrationen von Simvastatin demnach deutlich geringer, als in jener beschriebenen Publikation. Eine klinisch relevante, nicht-zytotoxische, Konzentration von Statinen hat nach den Ergebnissen dieser Arbeit keinen Einfluss auf den HCV-Replikationszyklus. Die Überdosierung von Statinen in *in vitro* Experimenten wurde bereits in anderen Kontexten diskutiert. Eine einheitliche niedrige Konzentration wurde bislang nicht genutzt (diskutiert in (79)). Zukünftige *in vitro* Studien sollten den Fokus darauflegen, Konzentrationen der jeweiligen lipidsenkenden Medikamente so zu wählen, dass die klinisch relevante Serumkonzentration so gut es geht abgebildet wird.

In Zellen, in denen die Lipoproteinrezeptoren LDLr und SR-B1 fehlen, zeigt Simvastatin eine Reduktion der HCV-RNA im HCVcc-Modell. Der Effekt ist in LDLr-KOs ausgeprägter als in SR-B1-KOs und besonders stark in DKO. Der ausgeprägte Effekt in den DKO-Mutanten scheint auf zytotoxische Effekte und den zellulären Stress zurück zu führen zu sein.

In Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie wurden bereits unterschiedlichen Mutationsformen des LDLr gefunden (80). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wäre es demnach denkbar, dass Patienten, die eine Funktionsstörung des LDLr haben, Statine die Empfänglichkeit gegenüber HCV vermindern.

Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase und damit den Mevalonatweg. Somit wirken sie hemmend auf die Cholesterolsynthese der Zelle (41,42). Unsere Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass die Cholesterolsynthese von Bedeutung für die HCV-Infektiosität sein könnte. Über die Hemmung des Mevalonatweges werden Statine pleiotrope

Effekte auf die Zelle zugeschrieben (43), die auch hier ursächlich für die Effekte auf die KO-Mutanten sein könnten. Um diese Frage genauer beantworten zu können, wäre von Interesse, welchen Effekt Statine auf die Cholesterolkonzentration in den Lipoproteinrezeptor-Mutanten hat. Zukünftige Experimente sollten sich daher auch mit der Frage auseinandersetzen, welche genauen Effekte Statine auf die Mutanten haben und welche Metabolite sich verändern, um der Frage näher zu kommen, wie die Statine den HCV-Replikationszyklus hemmen und welche Faktoren des Fettstoffwechsels für den HCV-Replikationszyklus wichtig sind.

In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, welchen Einfluss Fibrate auf den HCV-Replikationszyklus haben. Fenofibrat zeigt in Huh-7.5-Zellen, in denen die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr fehlen eine milde, wenn auch nicht signifikante Reduktion der HCVcc Infektiosität. Durch die Aktivierung des PAA-Alpha Signalweges steigern Fibrate die Aktivität der Lipoproteinelipase und führen zu einer Verminderung des LDL-Cholesterins (81). Es ist bekannt, dass der HCV-Replikationszyklus durch Lipoproteinlipase gehemmt werden kann (82,83). Auch wenn Fibrate den HCV-Replikationszyklus nur in den lipoproteinrezeptordefizienten Zellen - nicht aber in Huh-7.5 Zellen oder primären Hepatozyten - hemmen, scheint vermutlich die Induktion der Lipoproteinlipase dafür verantwortlich zu sein. Fibrate scheinen in primären Hepatozyten die VLDL-Sekretion zu vermindern (84). Der VLDL-Signalweg wird zum Ausschleusen der HCV-LVP genutzt (29). Fibrate scheinen unterschiedliche Effekte auf den Metabolismus der Zelle zu haben. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, welche genauen Mechanismen für die milden Effekten auf den HCV-Replikationszyklus in Lipoproteinrezeptor-Mutanten ursächlich sein könnten.

In dieser Arbeit wurde auch der Effekt vom PCSK-9-Inhibitor Alirocumab auf den HCV-Replikationszyklus untersucht. In nativen Huh-7.5-Zellen oder primären Hepatozyten zeigt sich kein Effekt von Alirocumab auf den HCV-Replikationszyklus. Im Einklang mit den Ergebnissen von Ramanathan *et al.*, wurde in diese Arbeit gezeigt, dass Alirocumab keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt oder die HCV-Replikation zu haben scheint (76). In Zellen in denen der LDLr fehlt, zeigt Alirocumab die Tendenz die HCV-Infektiosität zu fördern. Dies lässt vermuten, dass PCSK9 nicht nur den LDLr vermehrt degradiert, sondern auch SR-B1 als Liganden nutzt und dessen Degradation fördert. Alirocumab hemmt die Funktion von PCSK-9 wodurch mehr SR-B1 zur Verfügung stehen könnte und so die Infektiosität des HCV-Virus gesteigert wird.

Eine Studie zeigte, dass PCSK9 in Makrophagen auch einen Einfluss auf den Lipoproteinrezeptor SR-B1 hat (85). Um diesen Vorgang genauer zu verstehen wäre es interessant, die Expression von SR-B1 vor und während der Infektion mit HCV und der Behandlung mit Alirocumab zu studieren.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CETP-Inhibitoren auf die HCV-Infektion untersucht. Hierbei konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden. Zum

einen scheint Torcetrapib den HCV-Replikationszyklus mit einem IC_{50} von $1,4 \mu\text{M}$ zu hemmen. Zwar zeigen sich auch geringe zytotoxische Effekte, die inhibitorischen Effekte überwiegen jedoch deutlich. Wichtig hierbei ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Experimente aus Abbildung 2 lediglich zwei Mal mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt wurden und daher als präliminär zu verstehen sind. Um die Aussagekraft zu erhöhen, sollten die Experimente mindestens in Triplikaten durchgeführt werden. Obicetrapib zeigt zwar eine Reduktion der Infektiosität auf den gesamten Replikationszyklus, dies ist jedoch vermutlich auf zytotoxische Effekte zurück zu führen.

Der HCV-Eintritt scheint von Obicetrapib unbeeinflusst zu sein (Abb. 1).

Interessant wäre es zu untersuchen, wie sich Torcetrapib auf den HCV-Eintritt auswirkt. Um zu determinieren, welcher Teil des HCV-Replikationszyklus von Torcetrapib beeinflusst wird, sollte mit einer nicht-toxischen Konzentration von Torcetrapib ebenfalls der Einfluss auf die HCV-Replikation im subgenomic replicon Modell untersucht werden.

Weitere CETP-Inhibitoren sollten in diese Untersuchungen miteingeschlossen werden, um festzustellen, ob es sich um klassenspezifische oder substanzspezifische Effekte handelt.

In Zellen, in denen die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr fehlen, hemmt Obicetrapib die Infektiosität. Doch auch hier können zytotoxische Effekte nicht ausgeschlossen werden. Da in Huh-7.5-Zellen der CC_{50} von Obicetrapib bei $7,8 \mu\text{M}$ liegt, ist es nur wahrscheinlich, dass die Effekte von Obicetrapib auch in diesen Experimenten zum Großteil auf zytotoxischen Effekten beruhen. Hier wäre es notwendig die Zytotoxizität von CETP-Inhibitoren in den lipoproteinrezeptordefizienten Zelllinien zu testen. Die Experimente sollten außerdem um Torcetrapib ergänzt werden. Anacetrapib zeigt in diesen Experimenten die Tendenz die Infektiosität in DKO #1 zu vermindern. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht signifikant.

Ein möglicher Erklärungsansatz, wie der CETP-Inhibitor Torcetrapib die Infektiosität von HCV herabsetzen kann, könnte im Reifungsprozess von HCV-Partikeln liegen. Denolly *et al.* zeigten jedoch, dass der CETP-Inhibitor Torcetrapib nicht an der Lipidation viraler Partikel im Serum beteiligt ist (86). Eine weitere Erklärung könnte die Verminderung der apoB-Konzentration sein. CETP-Inhibitoren vermindern die Konzentration von apo B im Serum (54). Es zeigt sich bereits, dass in apoB100 KO-Zellen, die Infektiosität von HCV vermindert ist. Der HCV-Eintritt blieb dabei unbeeinträchtigt (87).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die hier getesteten CETP-Inhibitoren auf unterschiedliche Weise den HCV-Replikationszyklus beeinflussen. Die Effekte von Obicetrapib sind überwiegend auf zytotoxische Effekte zurückzuführen, während für Torcetrapib angenommen werden kann, dass es sich um einen tatsächlichen Effekt handelt. Ob es sich dabei aber um klassenspezifische oder substanzspezifische Effekte

handelt, sollte weiter untersucht werden. Um die Aussagekraft der Experimente zu verbessern, sollten noch weitere Experimente folgen. Der Effekt der CETP-Inhibitoren sollte in Triplikaten, nicht wie hier Duplikaten durchgeführt werden. Da sich Torcetrapib als geeignetster Kandidat herausgestellt hat, wäre es interessant welchen Einfluss Torcetrapib auf die einzelnen Schritte des Replikationszyklus hat. Hierzu kann Torcetrapib im HCVpp und Subgenomic-Replicon-Modell untersucht werden.

Um zu erklären, durch welchen Mechanismus Torcetrapib die Infektion von HCV vermindert, könnte auch der Cholesterol und apoB-Gehalt im Serum während einer Infektion unter Torcetrapib bestimmt werden. Sollte sich herausstellen, dass die Verminderung von apoB ursächlich ist, könnte versucht werden apoB künstlich zu exprimieren, um die Reduktion der Infektiosität zu verhindern. Generell bestätigen die Ergebnisse bereits jetzt die hohe Bedeutung des Fettstoffwechsels und der Lipoproteinrezeptoren LDLr und SR-B1 für den HCV-Replikationszyklus.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Studie getesteten lipidsenkenden Medikamente unterschiedliche Effekte auf den HCV-Replikationszyklus. In Huh-7.5-Zellen, denen die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr fehlen, haben Statine die größten hemmenden Effekte. Fenofibrat und Alirocumab zeigen milde Effekte, die in unseren Analysen nicht statistische signifikant sind, dennoch einen Hinweis auf mögliche Interaktion bieten. Für zukünftige Experimente wäre es aufschlussreich die zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu untersuchen. Besonders die Frage nach dem Cholesterolgehalt und der Expression übriger HCV-Eintrittsfaktoren unter Behandlung mit Statinen, Fibraten oder PCSK-9-Inhibitoren wäre von Interesse.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Einführung direkt antiviral wirkender Substanzen (engl. *direct-acting antivirals*) wurde die Therapie der Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) revolutioniert. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) sind zurzeit jedoch noch immer etwa 58 Millionen Menschen weltweit chronisch mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert. Die enge Assoziation des Virus mit dem menschlichen Fettstoffwechsel, stellt vermutlich mit einen Grund dar, weshalb es lange unentdeckt im Wirt persistieren kann. Die Verknüpfung des Replikationszyklus von HCV mit dem Fettstoffwechsel der Zelle ist bereits seit der 1990er Jahre bekannt. Die Replikation des Virus findet in Membranvesikeln, dem *membranous web*, statt. Viren werden in räumlicher Nähe zu zytosolischen Lipidtröpfchen (LD, engl. *lipid droplets*) assembliert und die Ausschleusung der Viren aus der Zelle erfolgt über den Sekretionsweg für *very-low-density* Lipoproteine (VLDL). Während des Eintritts von HCV in die Wirtszelle scheinen, neben weiteren Eintrittsfaktoren, die Lipoproteinrezeptoren LDLr und SR-B1-Rezeptor eine wichtige Funktion zu spielen. In dieser Arbeit wird die Rolle der Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr während des HCV-Replikationszyklus näher untersucht.

Aufgrund der engen Kopplung des HCV-Replikationszyklus an den Fettstoffwechsel wird in dieser Arbeit auch der Einfluss klinisch eingesetzter lipidsenkender Medikamente untersucht. Die häufig eingesetzten lipidsenkenden Medikamente haben ebenfalls einen Einfluss auf den menschlichen Fettstoffwechsel. Statine, Fibrate, PCSK9- und CETP-Inhibitoren senken über unterschiedliche Mechanismen den LDL-Gehalt im Serum. Ihr Einfluss auf den HCV-Replikationszyklus ist weitestgehend unerforscht.

In dieser Arbeit wird daher der Zusammenhang zwischen Lipoproteinrezeptoren, dem Fettstoffwechsel und dem Hepatitis-C-Replikationszyklus untersucht. Hierzu werden genetische und pharmakologische Methoden zur Veränderung der Lipoproteinrezeptorkonzentration genutzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Lipoproteinrezeptoren LDLr- und SR-B1-Rezeptor eine Funktion im HCV-Replikationszyklus zu haben scheinen. In Einzel-Knockoutmutanten, in denen entweder LDLr- oder SR-B1 fehlen, ist nur ein geringer Effekt auf die HCV-Suszeptibilität zu beobachten. In Zellen, in denen beide Lipoproteinrezeptoren fehlen, zeigt sich eine deutliche Verminderung der HCV-Infektiosität. Dieser Effekt scheint unabhängig von der Cholesterolkonzentration und den übrigen Eintrittsfaktoren der Zelle zu sein. Für die einzelnen Knockout-Mutanten zeigen sich jedoch klonale Unterschiede in der Expression der Oberflächenrezeptoren.

Lipidsenkende Medikamente scheinen *in vitro* keinen Einfluss auf den HCV-Eintritt zu haben. In den Doppelmutanten, in denen sowohl LDLr als auch SR-B1 fehlen, scheinen Simvastatin und Fenofibrat die HCV-Infektivität, wenn auch nicht signifikant, zu vermindern. Für die CETP-Inhibitoren Obicetrapib und Torcetrapib konnten unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden. Während es scheint, dass Torcetrapib den HCV-Replikationszyklus inhibiert, sind die Effekte von Obicetrapib vermutlich eher auf zytotoxische Effekte zurück zu führen.

Insgesamt unterstützt diese Arbeit die These, dass die Lipoproteinrezeptoren SR-B1 und LDLr eine Rolle während des HCV Replikationszykluses spielen. In den lipoproteinrezeptordefizienten Zelllinien zeigt sich der Effekt besonders ausgeprägt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA cLone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science*. 1989;244(4902):359–62.
2. Manns MP, Maasoumy B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(8):533–50.
3. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1):S58–68.
4. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2022 Aug 9]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341412>
5. Pecoraro V, Banzi R, Cariani E, Chester J, Villa E, D'Amico R, et al. New Direct-Acting Antivirals for the Treatment of Patients With Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Clin Exp Hepatol*. 2019;9(4):522–38.
6. Feld JJ, Jacobson IM, Hézode C, Asselah T, Ruane PJ, Gruener N, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(27):2599–607.
7. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2405–16.
8. Yehia BR, Schranz AJ, Umscheid CA, Lo Re V. The Treatment Cascade for Chronic Hepatitis C Virus Infection in the United States: A Systematic Review and Meta-Analysis. Rizza SA, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e101554.
9. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318–27.
10. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77–87.
11. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization

- and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(6):2451–5.
12. Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. In: Tan SL, editor. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology.* Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
 13. Griffin SDC, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003;535(1–3):34–8.
 14. Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. Baric RS, editor. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):e103.
 15. Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science.* 1999;285(5424):110–3.
 16. Phan T, Beran RKF, Peters C, Lorenz IC, Lindenbach BD. Hepatitis C Virus NS2 Protein Contributes to Virus Particle Assembly via Opposing Epistatic Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes. *J Virol.* 2009;83(17):8379–95.
 17. Lindenbach BD. Virion Assembly and Release. In: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 199–218. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 369).
 18. Freedman H, Logan MR, Law JLM, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect Dis.* 2016;2(11):749–62.
 19. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 1992;181(5):293–300.
 20. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J Virol.* 2002;76(14):6919–28.
 21. Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. Human Apolipoprotein E Is Required for Infectivity and Production of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *J Virol.* 2007;81(24):13783–93.
 22. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(23):9505–10.
 23. Nielsen SU, Bassendine MF, Martin C, Lowther D, Purcell PJ, King BJ, et al. Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *J Gen Virol.* 2008;89(10):2507–17.

24. Agnello V, Ábel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(22):12766–71.
25. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 2002;21(19):5017–25.
26. Yamamoto S, Fukuhara T, Ono C, Uemura K, Kawachi Y, Shiokawa M, et al. Lipoprotein Receptors Redundantly Participate in Entry of Hepatitis C Virus. Tellinghuisen TL, editor. *PLOS Pathog.* 2016;12(5):e1005610.
27. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J Virol.* 2002;76(12):5974–84.
28. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):1089–97.
29. Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale M, et al. Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(14):5848–53.
30. Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O, et al. Characterization of Hepatitis C Virus Particle Subpopulations Reveals Multiple Usage of the Scavenger Receptor BI for Entry Steps. *J Biol Chem.* 2012;287(37):31242–57.
31. Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology.* 2007;46(6):1722–31.
32. Wünschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) and HCV E2 Interactions with CD81 and the Low-Density Lipoprotein Receptor. *J Virol.* 2000;74(21):10055–62.
33. Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology.* 2009;394(1):99–108.
34. Albecka A, Belouzard S, de Beeck AO, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology.* 2012;55(4):998–1007.
35. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science.* 1996 Jan 26;271(5248):518–20.

36. Krieger M. Charting the Fate of the “Good Cholesterol”: Identification and Characterization of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem.* 1999;68(1):523–58.
37. Brown MS, Goldstein JL. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science.* 1986;232(4746):34–47.
38. Tissue expression of LDLR - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130164-LDLR/tissue>
39. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459–72.
40. Knopf HC, Busch MA, Du Y, Truthmann J, Schienkiewitz A, Scheidt-Nave C. Changes in the prevalence of statin use in Germany – findings from national health interview and examination surveys 1997-1999 and 2008-2011. *Z Für Evidenz Fortbild Qual Im Gesundheitswesen.* 2017;122:22–31.
41. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science.* 2001;292(5519):1160–4.
42. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343(6257):425–30.
43. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999;84(3):413–28.
44. Kornitzer M, Dramaix M, Vandenbroek MD, Everaert L, Gerlinger C. Efficacy and tolerance of 200 mg micronised fenofibrate administered over a 6-month period in hyperlipidaemic patients: An open Belgian multicenter study. *Atherosclerosis.* 1994;110:S49–54.
45. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation.* 1998;98(19):2088–93.
46. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):928–33.
47. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 to Epidermal Growth Factor-like Repeat A of Low Density Lipoprotein Receptor Decreases Receptor Recycling and

- Increases Degradation. *J Biol Chem.* 2007;282(25):18602–12.
48. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest.* 2006;116(11):2995–3005.
49. Chan JCY, Piper DE, Cao Q, Liu D, King C, Wang W, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(24):9820–5.
50. Karatasakis A, Danek BA, Karacsonyi J, Rangan BV, Roesle MK, Knickelbine T, et al. Effect of PCSK9 Inhibitors on Clinical Outcomes in Patients With Hypercholesterolemia: A Meta-Analysis of 35 Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(12):e006910.
51. Chajek T, Fielding CJ. Isolation and characterization of a human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1978;75(7):3445–9.
52. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990;323(18):1234–8.
53. Ranalletta M, Bierilo KK, Chen Y, Milot D, Chen Q, Tung E, et al. Biochemical characterization of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2739–52.
54. Krauss RM, Wojnooski K, Orr J, Geaney JC, Pinto CA, Liu Y, et al. Changes in lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy individuals treated with the CETP inhibitor anacetrapib. *J Lipid Res.* 2012;53(3):540–7.
55. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *N Engl J Med.* 2007;357(21):2109–22.
56. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med.* 2012;367(22):2089–99.
57. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(20):1933–42.
58. The HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(13):1217–27.
59. Nicholls SJ, Ditmarsch M, Kastelein JJ, Rigby SP, Kling D, Curcio DL, et al. Lipid lowering effects of the CETP inhibitor obicetrapib in combination with high-intensity statins: a randomized phase 2 trial. *Nat Med.* 2022;28(8):1672–8.

60. Ye J, Wang C, Sumpter R, Brown MS, Goldstein JL, Gale M. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(26):15865–70.
61. Ikeda M, Abe K ichi, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology.* 2006;44(1):117–25.
62. Delang L, Paeshuyse J, Vliegen I, Leyssen P, Obeid S, Durantel D, et al. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology.* 2009;50(1):6–16.
63. Wuestenberg A, Kah J, Singethan K, Sirma H, Keller AD, Rosal SRP, et al. Matrix Conditions and KLF2-Dependent Induction of Heme Oxygenase-1 Modulate Inhibition of HCV Replication by Fluvastatin. Alisi A, editor. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e96533.
64. Blanchet M, Le QT, Seidah NG, Labonté P. Statins can exert dual, concentration dependent effects on HCV entry in vitro. *Antiviral Res.* 2016;128:43–8.
65. Bader T, Fazili J, Madhoun M, Aston C, Hughes D, Rizvi S, et al. Fluvastatin Inhibits Hepatitis C Replication in Humans. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG.* 2008;103(6):1383–9.
66. O’Leary JG, Chan JL, McMahon CM, Chung RT. Atorvastatin does not exhibit antiviral activity against HCV at conventional doses: A pilot clinical trial. *Hepatology.* 2007;45(4):895–8.
67. Forde KA, Law C, O’Flynn R, Kaplan DE. Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J Gastroenterol.* 2009;15(40):5020.
68. Butt AA, Yan P, Bonilla H, Abou-Samra AB, Shaikh OS, Simon TG, et al. Effect of addition of statins to antiviral therapy in hepatitis C virus–infected persons: Results from ERCHIVES. *Hepatology.* 2015;62(2):365–74.
69. Atsukawa M, Tsubota A, Kondo C, Itokawa N, Narahara Y, Nakatsuka K, et al. Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b: Combination of statin reduces viral relapse. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(1):51–6.
70. Sabile A, Perlemuter G, Bono F, Kohara K, Demaugre F, Kohara M, et al. Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates. *Hepatology.* 1999;30(4):1064–76.
71. Dharancy S, Malapel M, Perlemuter G, Roskams T, Cheng Y, Dubuquoy L, et al. Impaired expression of the peroxisome proliferator–activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2005;128(2):334–42.

72. Fujita N, Kaito M, Kai M, Sugimoto R, Tanaka H, Horiike S, et al. Effects of bezafibrate in patients with chronic hepatitis C virus infection: combination with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat.* 2006;13(7):441–8.
73. Knop V, Bergk A, Schlosser B, Thieringer J, van Bömmel F, Frost N, et al. Bezafibrate maintenance therapy in patients with advanced chronic hepatitis C: *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25(5):594–600.
74. Syed GH, Tang H, Khan M, Hassanein T, Liu J, Siddiqui A. Hepatitis C Virus Stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor Expression To Facilitate Viral Propagation. Diamond MS, editor. *J Virol.* 2014;88(5):2519–29.
75. Labonté P, Begley S, Guévin C, Asselin MC, Nassoury N, Mayer G, et al. PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology.* 2009;50(1):17–24.
76. Ramanathan A, Gusarova V, Stahl N, Gurnett-Bander A, Kyratsous CA. Alirocumab, a Therapeutic Human Antibody to PCSK9, Does Not Affect CD81 Levels or Hepatitis C Virus Entry and Replication into Hepatocytes. Pecheur EI, editor. *PLOS ONE.* 2016;11(4):e0154498.
77. Satoh K. High level of serum cholesteryl ester transfer protein in active hepatitis C virus infection. *World J Hepatol.* 2016;8(5):291.
78. Zapatero-Belinchón FJ, Ötjengerdes R, Sheldon J, Schulte B, Carriquí-Madroñal B, Brogden G, et al. Interdependent Impact of Lipoprotein Receptors and Lipid-Lowering Drugs on HCV Infectivity. *Cells.* 2021;10(7):1626.
79. Björkhem-Bergman L, Lindh JD, Bergman P. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?: Letter to the Editors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(1):164–5.
80. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of Disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4(4):214–25.
81. Heller F, Harvengt C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 1983;25(1):57–63.
82. Andréo U, Maillard P, Kalinina O, Walic M, Meurs E, Martinot M, et al. Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol.* 2007;9(10):2445–56.
83. Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, et al. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. *Virology.* 2010;407(1):152–9.
84. Lamb RG, Koch JC, Bush SR. An enzymatic explanation of the differential effects of

- oleate and gemfibrozil on cultured hepatocyte triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis and secretion. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1165(3):299–305.
85. Adorni MP, Cipollari E, Favari E, Zanotti I, Zimetti F, Corsini A, et al. Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis*. 2017;256:1–6.
86. Denolly S, Granier C, Fontaine N, Pozzetto B, Bourlet T, Guérin M, et al. A serum protein factor mediates maturation and apoB-association of HCV particles in the extracellular milieu. *J Hepatol*. 2019;70(4):626–38.
87. Schaefer EAK, Meixiong J, Mark C, Deik A, Motola DL, Fusco D, et al. Apolipoprotein B100 is required for hepatitis C infectivity and Mipomersen inhibits hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016;22(45):9954.

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an **Prof. Dr. Thomas von Hahn** ohne den die Realisierung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gilt auch **Prof. Dr. Gisa Gerold**, die mich in ihr Team integriert und mich in der Umsetzung des Projektes stets unterstützt hat. **Prof. Dr. Thomas Pietschmann** möchte ich für die Möglichkeit danken, dieses Projekt in seinem Institut weiterführen zu können. Bedanken möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Abel Viejo-Borbolla**, der mich als Co-Supervisor im Rahmen des StrucMed-Programmes betreut hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei **Dr. Francisco Zapatero-Belinchón**. Als Betreuer hast Du mir all die wichtigen Dinge gezeigt, die ich für die Durchführung dieses Projektes brauchte. Durch unsere produktiven Gespräche, Dein breites Wissen und Deine lange Erfahrung konnten wir unsere Ideen realisieren. Du hast immer daran geglaubt, dass wir dieses Projekt erfolgreich abschließen können. Thanks Fran!

Außerdem möchte ich allen **Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Hahn, Gerold und Pietschmann** für die schönen Pausenzeiten, motivierenden Gespräche und die tolle Zeit danken. Besonders danken möchte ich **Antonia**. Vielen Dank, dass Du mir all die wichtigen Tipps und Tricks im Labor gezeigt hast und bis zuletzt eine wichtige Ansprechpartnerin für mich warst.

Danken möchte ich auch meinen **Freunden**. Danke für Euer Verständnis in stressigen Zeiten und die schönen gemeinsamen Erlebnisse, die den Uni- und Arbeitsstress schnell vergessen lassen haben.

Ganz besonderer Dank geht an **André**. Du bist mit mir durch all die Höhen und Tiefen gegangen, die solch eine Arbeit mit sich bringt und hattest immer ein offenes Ohr für meine Sorgen. Mit deiner wissenschaftlichen Expertise und Deiner unermüdlichen Geduld konntest Du mir in so vielen Situationen weiterhelfen. Ich bin froh Dich an meiner Seite zu wissen.

Meinen Eltern **Jutta und Georg** möchte ich besonders danken. Durch Eure bedingungslose Unterstützung, stete Förderung und motivierenden Gespräche habe ich die stützende Hand im Rücken, die es mir bisher ermöglicht hat meine Ziele zu erreichen.

ERKLÄRUNG NACH § 2 ABSATZ 2 NR. 7 UND 8 PROMOTIONSORDNUNG

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Einfluss von Lipoproteinrezeptoren und lipidsenkenden Medikamenten auf den Hepatitis-C-Replikationszyklus“ in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas von Hahn und Prof. Dr. Gisa Gerold ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung der Dissertation sucht oder mir die obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse dieser Dissertation wurden in *Cells*, *MDPI* veröffentlicht.

Hannover, den _____

Rina Mareke Ötjengerdes