

**Entwicklung von Replikonsystemen mit subgenomischen  
Abschnitten von HCV-RNA Genotyp 3a Isolaten klinisch  
charakterisierter Patienten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Barbara Schönberger

Aus dem Institut für Virologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

und

Klinik für Innere Medizin II  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Betreuer: PD Dr. Christoph Sarrazin

**Entwicklung von Replikonsystemen mit subgenomischen  
Abschnitten von HCV-RNA Genotyp 3a Isolaten klinisch  
charakterisierter Patienten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Barbara Schönberger  
Tierärztin aus Wien

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

PD Dr. Christoph Sarrazin

Tag der Disputation: 10. Mai 2007

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Homburg, den

.....  
(Barbara Schönberger)

# **1 Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1	Taxonomie	5
2.1.1	HCV-Variabilität und HCV-Genotypen	5
2.2	Klinik und Therapie	6
2.2.1	Klinischer Verlauf der HCV-Infektion	6
2.2.2	Therapie der HCV-Infektion	6
2.3	Molekularbiologie des Hepatitis-C-Virus	8
2.3.1	Die HCV-Genomorganisation	8
2.3.1.1	Strukturproteine	9
2.3.1.2	Nichtstrukturproteine	10
2.3.2	Die HCV-Replikation	11
2.4	Vergleich mit Pestiviren	13
2.5	HCV-Tiermodell	14
2.6	Das HCV-Replikonsystem	15
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte und Einwegmaterialien</b>	<b>20</b>
4.2	Allgemeine Chemikalien	21
4.3	Fertige Reagenzien-Sets	22
4.4	Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	23
4.4.1	Restriktionsendonukleasen	23
4.4.2	Enzyme	23
4.4.3	DNA-Längenstandards	24
4.5	Oligonukleotide	24

---

4.5.1	Primer für die Amplifikation der Konsensusprimerregion	24
4.5.2	Primer für die RT-PCR der HCV-Isolate 427 und 2879	24
4.5.3	Sequenzierprimer für die HCV-Isolate 427 und 2879	25
4.5.4	Mutageneseprimer für die HCV-Isolate 427 und 2879	26
4.6	Bakterien	27
4.7	Zellen	27
4.8	Medien	27
4.8.1	Medien für die Bakterienkultur	27
4.8.2	Medium für die Zellkultur	28
4.9	Vektoren/Plasmide	29
4.9.1	pCR®-XL-TOPO®	29
4.9.2	pFK I389 neo/NS3-3'/wt-AflIII-Con1	30
4.10	Puffer und Lösungen	30
4.10.1	Puffer für die Gelelektrophorese	30
4.10.2	Puffer und Lösungen für die Kompetenzinduktion von Bakterien	31
4.10.3	Puffer und Reagenzien für den Northern-Blot	32
4.10.4	Herstellung von RNase-freiem Wasser (DMPC-Wasser)	32
4.10.5	Puffer für die <i>in vitro</i> Transkription und Transfektion	32
4.11	Patientenisolate zur Generierung der Replikonkonstrukte	33
<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>34</b>
5.1	RNA-Isolierung	34
5.2	DNA-Mini-Präparation	35
5.3	DNA-Maxi-Präparation	35
5.4	Agarosegelelektrophorese	36
5.5	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	37
5.6	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
5.7	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligasen	38
5.8	Kompetenzinduktion und Transformation von <i>E. coli</i>	38

---

5.9	Klonierung von PCR-Produkten	39
5.10	Ortsspezifische Mutagenese	40
5.11	Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)	41
5.12	Die PCR-gestützte Mutagenese	43
5.13	DNA-Sequenzierung	47
5.14	Trypsinierung der Zellen nach G418-Selektion und Gesamt-RNA Präparation	48
5.15	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
5.16	<i>In vitro</i> Transkription	49
5.17	Sondenherstellung und Austestung für den Northern-Blot	51
5.18	Northern-Blot zum Genotyp-spezifischen Nachweis der HCV-RNA	54
5.19	RNA-Transfektion und Passage der transfizierten Zellen	55
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
6.1	Die Amplifikation des NS3-NS5B HCV-Genomabschnittes der Isolate 427 und 2879	57
6.1.1	Herstellung spezifischer Primer	57
6.1.2	Etablierung der „langen RT-PCR“	58
6.2	Sequenzierung der Isolate 427 und 2879 und Ermittlung der Konsensussequenzen	61
6.2.1	Herstellung des Konsensusklons 2879con1	62
6.2.2	Herstellung des Konsensusklons von HCV-Isolat 427con1	64
6.2.3	Herstellung weiterer Konstrukte der Isolate 2879 und 427	67
6.3	Herstellung von Replikonkonstrukten mit adaptiven Mutationen	69
6.4	Transfektion und Untersuchung der Zellen auf replizierende HCV-RNA des Genotyps 3a	70
6.5	Herstellung von Replikonkonstrukten mit der 3'NTR des Genotyps 3a	76

Inhaltsverzeichnis	4
<hr/>	
<b>7 DISKUSSION</b>	<b>78</b>
7.1 Auswahl der Patienten für die Herstellung der einzelnen Replikonkonstrukte	79
7.2 Herstellung der Konsensusklone und Transfektion von Wildtyp RNA-Konstrukten	80
7.3 Analyse der HCV-Replikons hinsichtlich ihrer Replikationskompetenz	82
7.4 Verwendung einer adaptierten Zelllinie für die Transfektion der RNA-Konstrukte	87
7.5 Die Bedeutung von RNA-Elementen in den NTRs sowie den kodierenden Bereichen für die Replikation der HCV-RNA	88
7.6 Replikationsmodelle bei Vertretern aus den Familien <i>Flaviviridae</i> und <i>Togaviridae</i>	92
7.7 Strategien zur Herstellung eines Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA des Genotyps 3a	94
<b>8 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>9 SUMMARY</b>	<b>98</b>
<b>10 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>100</b>
<b>11 REFERENZEN</b>	<b>102</b>



## 2 Einleitung

### 2.1 Taxonomie

Bis zur Entdeckung des Hepatitis-C-Virus (HCV) wurden Hepatitiden, die durch keines der damals bekannten Hepatitisviren verursacht wurden und vor allem in Folge von Bluttransfusionen auftraten, als NonA-NonB-Hepatitiden (NANBH) bezeichnet. Nach der Isolierung des Hepatitis-C-Virus aus einem Schimpansen mit nachfolgender Charakterisierung durch *Choo et al.* wurde dieses Virus der Familie der *Flaviviridae* als eigenes Genus Hepacivirus zugeordnet (30). Neben dem Genus Hepacivirus finden sich innerhalb der Familie der *Flaviviridae* die Genera Pestivirus und Flavivirus. Zum Genus Flavivirus zählen eine Reihe von human- und tierpathogenen Erregern, die meist durch Arthropoden übertragen werden und fieberhafte hämorrhagische Erkrankungen sowie Enzephalitiden verursachen können, zum Teil auch mit zoonotischem Potential. Das Genus Pestivirus umfaßt ausschließlich tierpathogene Erreger, die von großer wirtschaftlicher Bedeutung sind. Hierzu zählen das Virus der klassischen Schweinepest, das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe und der Erreger der Border Disease bei Schafen.

#### 2.1.1 HCV-Variabilität und HCV-Genotypen

Das HCV kann in 6 unterschiedliche Genotypen eingeteilt werden, die sich in ihrer Nukleotidsequenz zwischen 31-34% unterscheiden. Diese Genotypen werden in unterschiedliche Subtypen eingeteilt, deren Nukleotidsequenzen um etwa 20% divergieren. Der Genotyp 1b ist weltweit verbreitet und in Mitteleuropa der am häufigsten gefundene Genotyp. Die Genotypen 2a und 2b sind ebenfalls weltweit verbreitet und repräsentieren 10-20% der HCV-Genotypen. Der Genotyp 3 ist am häufigsten auf dem indischen Subkontinent anzutreffen. Der Genotyp 4 ist auf dem afrikanischen Kontinent sowie in Ländern des Mittleren Osten der häufigste Genotyp. Die Genotypen 5 und 6 treten selten auf und wurden in Südafrika (Genotyp 5) und Südostasien (Genotyp 6) isoliert (92, 93).

## 2.2 Klinik und Therapie

### 2.2.1 Klinischer Verlauf der HCV-Infektion

Die Transmission der HCV-Infektion erfolgt fast ausschließlich parenteral, in der Regel durch kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte, sowie durch kontaminierte Instrumente und Kanülen. Neben der Leber als Hauptreplikationsort wurde die Vermehrung des HCV in lymphozytären Zellen beschrieben (5, 58, 74). Klinisch verläuft eine HCV-Infektion häufig inapparent. Eine akute ikterische Hepatitis tritt lediglich in ca. 20% und eine fulminante Hepatitis nur in sehr seltenen Fällen auf. Bei einem Großteil der Patienten jedoch (60-80%) verläuft die Krankheit chronisch und ist im Verlauf von 20-40 Jahren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Leberzirrhose verbunden (2, 85).

### 2.2.2 Therapie der HCV-Infektion

Schon vor der Isolierung und Charakterisierung des HCV wurden Patienten, die an einer Non-A-Non-B Hepatitis erkrankt waren, mit Interferon-*alpha* (IFN- $\alpha$ ) behandelt. Die Ansprechrate der IFN- $\alpha$  Monotherapie mit einer Normalisierung der Leberwerte bzw. einer dauerhaft nicht nachweisbaren HCV-RNA Menge im Blut, betrug jedoch nur ca. 10%. Durch den Einsatz von pegyliertem Interferon konnte die dauerhafte virologische Ansprechrate auf 20-40% erhöht werden, da durch eine verzögerte Freisetzung und durch eine längere biologische Halbwertszeit ein gleichmäßiger Wirkspiegel des Interferons im Serum erzielt werden kann (115). Das Ansprechen auf eine Therapie mit IFN- $\alpha$ /Ribavirin ist definiert als fehlender Nachweis von HCV-RNA im Blut 24 Wochen nach Therapieende. Eine weitere Verbesserung der Therapie von Patienten, die an chronischer Hepatitis-C erkrankt waren, erfolgte durch die Kombination von (pegyliertem) IFN- $\alpha$  mit dem antiviral wirkenden Guanosinanalogon Ribavirin (69, 82). Auffällig ist, daß 80-90% der Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 2 oder 3 auf eine Therapie mit (pegyliertem) IFN- $\alpha$ /Ribavirin dauerhaft virologisch ansprechen, wohingegen bei Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 1a/b die dauerhaften virologischen Ansprechraten nur bei 40-50% liegen (33, 67, 116). Die Ursachen für die unterschiedliche Sensitivität

der verschiedenen HCV-Genotypen gegenüber der IFN-basierten Therapie sind ungeklärt. Es wird angenommen, daß das HCV in der Lage ist sich gegenüber der antiviralen Wirkung von IFN zu schützen. Bisher sind 3 HCV-Proteine mit einer Hemmung der von IFN- $\alpha$  vermittelten Wirkungen in Zusammenhang gebracht worden. Neben dem Hüllprotein E2 und dem NS5A-Protein wurde für die NS3/4A-Serinprotease ein inhibierender Einfluß auf die IFN- $\alpha$  vermittelte Wirkung beschrieben. Bei den HCV-Proteinen E2 und NS5A konnte in Zellkultur eine Interaktion mit der durch IFN- $\alpha$  induzierten Proteinkinase (PKR) nachgewiesen werden (35, 101). Das Hüllprotein E2 von Genotyp 1a/b-Isolaten besitzt carboxy-terminal (C-terminal) eine 12 AS umfassende PKR/eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierungs-Homologie-Domäne (PePHD). Eine Bindung der PKR durch die PePHD *in vitro* wurde bei HCV-1a/1b-Isolaten beschrieben. Für HCV-Isolate des Genotyps 2 oder 3 konnte diese Bindung nicht nachgewiesen werden. Mutationsanalysen zeigten, daß klinisch keine Korrelation zwischen Mutationen in dieser Region und dem Ansprechen auf eine Therapie bei Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 1 bzw. 3a besteht (88, 90).

Entsprechend dem E2-Protein zeigten *in vitro* Untersuchungen, daß NS5A durch Interaktion mit der PKR deren Wirkung hemmen kann (35). In japanischen Studien wurde beschrieben, daß Mutationen innerhalb einer sogenannten Interferon-Sensitivität determinierenden Region (ISDR), eines 40 AS umfassenden Abschnitts des NS5A-Proteins, mit einem fehlenden Ansprechen auf eine Therapie bei Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 1a/b korreliert. Bei Patienten, bei denen innerhalb der ISDR ein Austausch von mindestens vier AS im Vergleich zur sogenannten Prototypsequenz nachweisbar war, konnte signifikant häufiger ein dauerhaftes Ansprechen auf eine Therapie mit IFN- $\alpha$  gefunden werden (26, 27). Entsprechende Mutationsanalysen bei HCV-Patienten aus Nordamerika und Europa ergaben zunächst keinen schlüssigen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mutationen innerhalb der ISDR und dem Ansprechen auf eine Therapie (86, 87, 89). In Folgestudien jedoch zeigte sich bei größeren Patientenkollektiven auch in diesem Fall eine direkte Korrelation. Allerdings fanden sich Mutationen in der ISDR vergleichsweise selten und es konnte eine Bedeutung von Mutationen im NS5A-Protein außerhalb der ISDR für den therapeutischen Erfolg nachgewiesen werden

(87, 90). Kürzlich wurde die NS3/4A Serinprotease als weitere Ursache für eine Inhibierung der IFN- $\alpha$ -vermittelten Wirkung in Betracht gezogen. Durch doppelsträngige RNA erfolgt die Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Interferon regulierender Faktor 3) in den Zellkern. Dies führt zur Transkription und Expression von Typ I Interferonen in der Zelle. Untersuchungen des IRF-3-Signalweges in HuH-7 Zellen und Osteosarcomazellen zeigten, daß bei Expression der NS3/4A-Serinprotease die Hyperphosphorylierung und die Translokation des IRF-3 in den Kern verhindert wird (31).

## 2.3 Molekularbiologie des Hepatitis-C-Virus

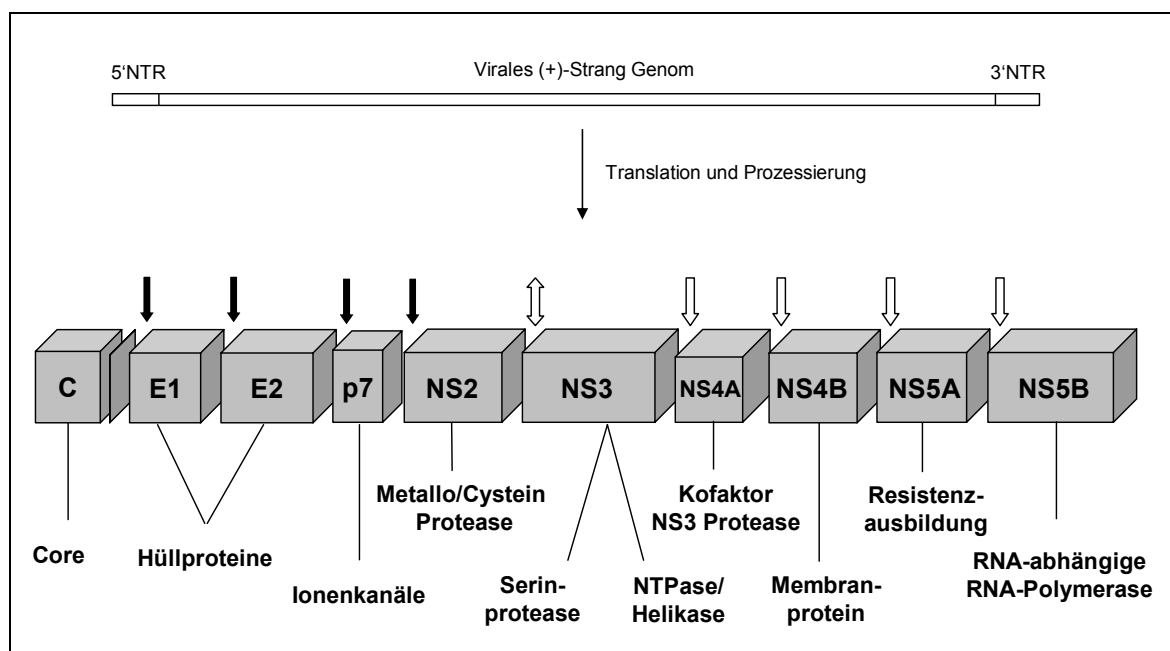
### 2.3.1 Die HCV-Genomorganisation

Das Hepatitis-C-Virus besitzt ein einzelsträngiges kontinuierliches RNA-Genom in positiver Orientierung und einer Länge von ca. 9600 Nukleotiden (18). Die virale RNA enthält einen einzigen offenen Leserahmen, der für ein Polyprotein von etwa 3000 Aminosäuren kodiert und dessen Expression *cap*-unabhängig ist. Dieses Polyprotein wird co- und posttranslational proteolytisch in eine Anzahl unterschiedlicher Proteine gespalten. Am 5'Ende des HCV-Genoms befindet sich eine nicht-translatierte Region (5'NTR) mit einer Länge von etwa 340 Nukleotiden, innerhalb derer es zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (,stem-loops') kommt. Die 5'NTR spielt sowohl bei der Replikation der viralen RNA als auch bei ihrer Translation eine wichtige Rolle. Die 5'NTR beinhaltet eine interne Ribosomenbindungsstelle, die sogenannte IRES (internal ribosome entry site), über die die virale RNA direkt vor dem Startcodon an die Ribosomen (40S Untereinheit) bindet und die Translation unmittelbar gestartet werden kann (108). Am 3'Ende des HCV-Genoms befindet sich eine weitere nicht-translatierte Region (3'NTR) (99). Diese besteht aus einer variablen Sequenz von etwa 40 Nukleotiden, gefolgt von einem poly-U/UC-Bereich unterschiedlicher Länge und einem innerhalb der verschiedenen Genotypen hochkonservierten Sequenzabschnitt von 98 Nukleotiden, den sogenannten ,X-tail'. Auch innerhalb dieser Region kommt es zur Ausbildung von Sekundärstrukturen oder auch ,stem-loops' (52, 99).

Noch während der Translation wird das Polyprotein durch zelluläre und virale Proteasen in mindestens 10 unterschiedliche Proteine gespalten. Im Amino (N)-terminale Drittel des Polyproteins befinden sich die Strukturproteine (C, E1, E2), die am Aufbau des Viruspartikels beteiligt sind. Bei p7 handelt es sich um ein hydrophobes Protein, dessen genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. C-terminal umfaßt das Polyprotein die Aminosäuren für die Nichtstrukturproteine (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B).

### 2.3.1.1 Strukturproteine

Die Abspaltung der Strukturproteine erfolgt durch zelluläre Proteasen (Abbildung 1). Am äußersten Amino (N)-Terminus wird als Hauptbestandteil des Nukleokapsids das Coreprotein mit einem Molekulargewicht (MG) von 21 kDa abgespalten (113).



#### Abbildung 1: Die Organisation des HCV-Genoms und die Prozessierung des Polyproteins.

Das HCV ist ein Einzelstrang RNA-Virus von ca. 9,6 kb Länge mit zwei nicht-translatierten Regionen am 5' bzw. 3'Ende. Es kodiert für ein Polyprotein, welches in die einzelnen Proteine gespalten wird. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Positionen, an denen das Polyprotein von wirtseigenen Peptidasen gespalten wird. Die Spaltung zwischen NS2 und NS3 erfolgt durch die NS2/3 Protease. Der farblose Doppelpfeil weist darauf hin, daß es sich hier um einen autoproteolytischen Prozeß handelt. Die übrigen farblosen Pfeile bezeichnen die Positionen, an denen das Polyprotein durch die NS3/4A-Protease prozessiert wird.

Durch Verschiebung des Leserahmens innerhalb der für das Coreprotein kodierenden Sequenz erfolgt die Expression eines weiteren HCV-Proteins mit einem MG von ca. 17 kDa, das F Protein (107, 112). Nachfolgend werden die Strukturproteine E1, mit einem MG von etwa 31 kDa und E2 mit einem MG von ca. 70 kDa abgespalten, die beide stark glykosyliert werden und in die äußere Virusmembran integriert sind (38). E1 und E2 bilden Heterodimere (21). Ferner befindet sich innerhalb von E2 eine 27 AS umfassende hypervariable Region (HVR1) (111). Diese Region soll eine wichtige Rolle bei der Bindung des HCV durch neutralisierende Antikörper spielen. Sowohl E1 und E2 besitzen im carboxy-terminalen Bereich eine hydrophobe Transmembrandomäne (73). Bei p7 handelt es sich um ein 63 AS langes, stark hydrophobes Polypeptid mit einem MG von 7 kDa, das eng assoziiert mit Membranen des rauhen ER vorliegt (16). *In vitro* Experimente mit Untersuchungen an künstlichen Membranen konnten zeigen, daß rekombinantes p7 Ionenkanäle ausbildet, wobei die Ausbildung dieser Ionenkanäle möglicherweise durch Amantadin inhibiert werden kann (39, 78). Untersuchungen an dem p7 der zu HCV eng verwandten tierpathogenen Pestiviren zeigten, daß eine Deletion von ca. 36 Aminosäuren innerhalb von p7 keine Auswirkung auf die virale Replikation hat, es konnten jedoch keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden. Bei diesen Viren spielt p7 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Produktion von infektiösen Virionen (43).

### 2.3.1.2 Nichtstrukturproteine

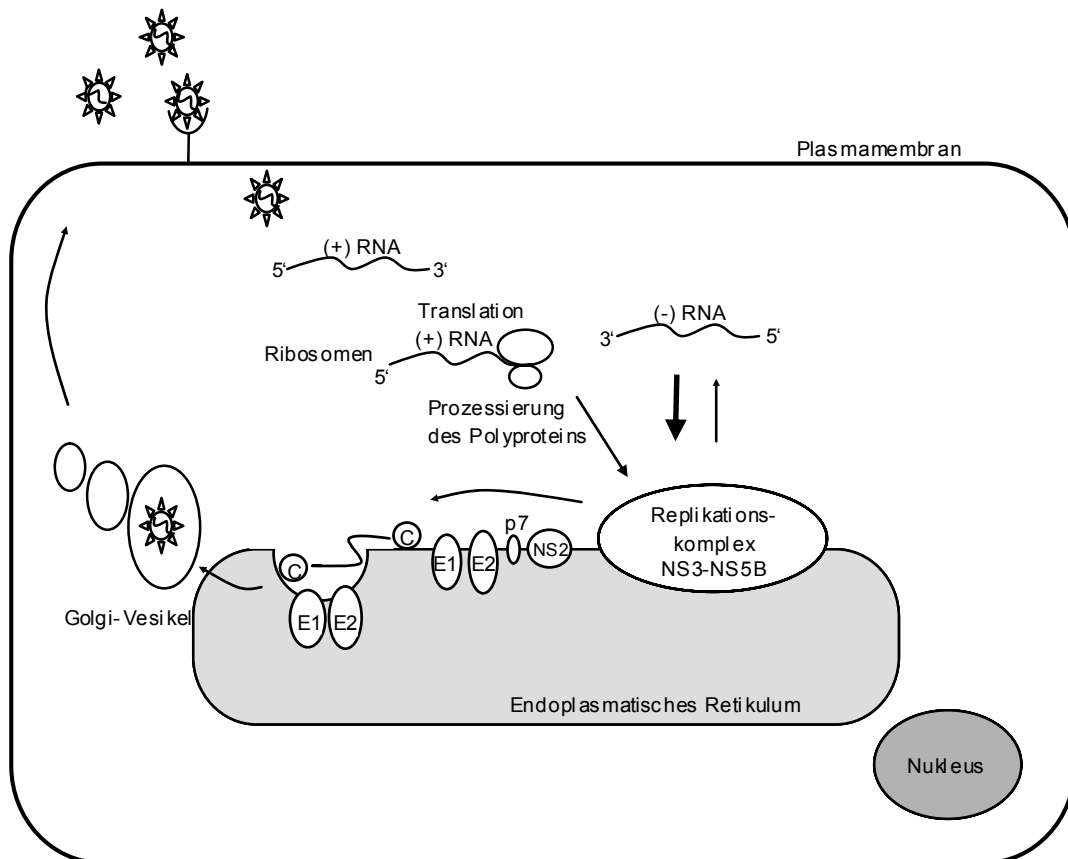
Das NS2-Protein, welches am N-terminalen Ende durch eine zelluläre Protease abgespalten wird, besitzt ein Molekulargewicht von 23 kDa. Die Abspaltung der Nichtstrukturproteine (NSP) NS3-NS5B erfolgt durch viruskodierte Proteasen. NS2 und der N-terminale Abschnitt von NS3 kodieren für eine autokatalytische Protease, die zwischen NS2 und NS3 spaltet (44). Bei NS3 handelt es sich um ein bifunktionelles Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa. Der N-terminale Sequenzabschnitt von NS3 kodiert für eine Protease, die zusammen mit dem Kofaktor NS4A die Proteine NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A und NS5A/5B spaltet (6, 23, 103). C-terminal kodiert NS3 für eine ATP-abhängige Helikase, die

RNA binden und entwinden kann und eine wichtige Rolle bei der Replikation der viralen RNA spielt (41, 98). NS4A, mit einem MG von 8 kDa ist ein Kofaktor der NS3 Protease, bildet mit ihr einen Komplex und ist essentiell für die korrekte Prozessierung des Polyproteins. Zudem verstärkt NS4A die proteolytische Aktivität von NS3 und erhöht dessen metabolische Stabilität (29). Über NS4B ist bisher nur wenig bekannt. Bei diesem Protein mit einem MG von ca. 27 kDa handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit hydrophobem Charakter und multiplen Transmembrandomänen. Es ist an der Bildung des Replikationskomplexes beteiligt (24, 37, 65). Untersuchungen mit Pestiviren zeigten, daß sowohl eine Deletion des gesamten Gens als auch eine Insertion innerhalb der kodierenden Sequenz von NS4B die Replikation der viralen RNA hemmt (60). Bei NS5A handelt es sich um ein stark phosphoryliertes Protein, je nach Phosphorylierungsgrad mit einem MG von 56 oder 58 kDa, und dessen genaue Funktion bis dato nicht vollständig geklärt ist (48). Die Möglichkeit der Resistenzentwicklung von HCV-Isolaten durch Interaktion dieses Proteins mit der PKR wurde bereits aufgeführt (2.2.2). Eine Reihe von in Zellkultur adaptiven Mutationen ist innerhalb von NS5A lokalisiert (10, 61). Es wird angenommen, daß NS5A eine wichtige Rolle bei der Adaptation von HCV-RNA in Zellkultur spielt. Das NS5B-Protein, mit einem MG von 66 kDa, kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase, die die Synthese von viraler RNA erlaubt (8, 63).

### **2.3.2 Die HCV-Replikation**

Die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus erfolgt vor allem über kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte. Der Nachweis von HCV-RNA und HCV-Proteinen in Hepatozyten führte zu der Annahme, daß die Replikation dieses Virus vor allem in Leberzellen stattfindet (9). Die Bindung des Virus an die Zelloberfläche erfolgt über eine Interaktion von zellulären Rezeptoren mit der Virushülle (Abbildung 2). Neben dem essentiellen, aber nicht hinreichenden Rezeptor CD81, wurden der LDL-, der Scavenger- und der DC-Sign Rezeptor als weitere mögliche Interaktionspartner des HCV beschrieben (1, 36, 91, 102). Nach Aufnahme der Virionen durch Endozytose in die Zelle und nach Freiwerden der Virus-RNA im Zytoplasma kann diese aufgrund ihrer positiven Orientierung wie messenger-RNA direkt an den Ribosomen abgelesen und in die Proteinsequenz translatiert werden, um die für die Replikation

notwendigen Enzyme bereit zustellen. Es erfolgt die Translation eines einzigen langen Polyproteins mit nachfolgender Spaltung in die einzelnen Proteine durch zelluläre und virale Proteasen (Abbildung 1). Untersuchungen ergaben, daß sich die prozessierten NSP zu einem Replikationskomplex zusammenlagern, der eng assoziiert mit Membranen des rauhen ER vorliegt und innerhalb dessen die Replikation stattfindet (25, 37).



**Abbildung 2: Infektionsverlauf einer Zelle mit dem Hepatitis-C-Virus.**

Nach Adsorption des Virus an Rezeptoren der Zelle erfolgt die endozytotische Aufnahme des Virus in die Zelle. Das Virusgenom kann aufgrund seiner positiven Orientierung direkt an den Ribosomen abgelesen und in ein Polyprotein translatiert werden. Nach der Prozessierung dieses Polyproteins lagern sich die einzelnen Nichtstrukturproteine zu einem Replikationskomplex zusammen, innerhalb dessen die Replikation abläuft, und der eng assoziiert mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulum (ER) vorliegt. Im Verlauf der Replikation wird aus dem Positivstrang (5'-3') ein Negativstrang (3'-5') synthetisiert, der wiederum als Matrize für die Synthese vieler Positivstrang-RNA zur Verfügung steht. Durch Interaktion mit den Strukturproteinen kommt es zur Partikelmorphogenese am ER, wobei die neuen Partikel ins Lumen des ER knospen. Die Viruspartikel werden anschließend über den konstitutiv sekretorischen Weg aus der Zelle exportiert. Neu gebildete Positivstrang-RNA kann aber auch direkt an den Ribosomen in das virale Polyprotein translatiert werden.



Im Verlauf der Virusreplikation erfolgt das Umschreiben des Positivstranggenoms in einen Minusstrang, der wiederum als Matrize für die Synthese von genomischer RNA positiver Orientierung dient. Diese synthetisierten RNA-Stränge werden einerseits direkt in das virale Polyprotein translatiert, stehen andererseits aber auch für die Bildung neuer Virionen zur Verfügung. Die korrekte Faltung der Membranproteine und deren Glykosylierung erfolgt im rauhen ER. Über die Golgi-Vesikel werden die Virionen zur Plasmamembran transportiert und per Exozytose ausgeschleust (Abbildung 2).

Der Mechanismus der RNA-Initiation im Verlauf der Virusreplikation durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase ist bisher nicht vollständig geklärt. Neben einer Primer-abhängigen Initiation der RNA-Synthese wurde eine *de novo*-Synthese der viralen RNA beschrieben (77, 117). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des HCV kann im Gegensatz zu zellulären DNA-Polymerasen den Einbau komplementärer Nukleotide nicht überprüfen. Dies bedingt eine hohe Mutationsrate, die zur Entstehung von unterschiedlichen Virusvarianten führt. Aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb des HCV-Genoms erfolgte die Klassifizierung der unterschiedlichen Varianten in 6 Genotypen, innerhalb derer wieder unterschiedliche Subtypen unterschieden werden (93, 94). In einem Patienten mit einer HCV-Infektion treten wiederum eine Vielzahl von unterschiedlichen Varianten auf, deren Sequenzen sich nur geringfügig voneinander unterscheiden, die sogenannten Quasispezies (68).

## 2.4 Vergleich mit Pestiviren

Bis zur Etablierung eines HCV-Zellkultursystems mit stabil replizierender subgenomischer RNA war die Vermehrung dieser Viren in Zellkultur nur in sehr begrenztem Umfang möglich, was eine genaue Untersuchung molekularbiologischer Aspekte von HCV und die Evaluierung von antiviral wirkenden Substanzen erschwerte (64). Aufgrund der Ähnlichkeit der Genomorganisation besteht eine enge Verwandtschaft zwischen Vertretern der Pestiviren und dem HCV (19). Zudem zeigten Sequenzvergleiche, daß das Hepatitis-C-Virus den Pestiviren phylogenetisch näher steht als Vertretern aus dem Genus Flavivirus (72). Wie bei

HCV enthalten die Virionen der Pestiviren RNA mit positiver Orientierung, die für ein Polyprotein von etwa 4000 AS kodiert. Dieses Polyprotein wird wie bei HCV co- und posttranslational in die unterschiedlichen Proteine prozessiert (19). Jedoch waren die Infektion von Zellen sowie die erfolgreiche Vermehrung von Pestiviren in Zellkultur bereits vor der Etablierung des Replikonsystems für HCV möglich (7, 105). Eine Besonderheit dieser Erreger ist das Vorkommen von zwei unterschiedlichen Biotypen in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Auswirkungen in Zellkultur. Neben Virusstämmen, die in Zellkultur zu einem zytopathogenen Effekt führen, gibt es Virusstämmen, die kein Absterben der Zellen verursachen (70, 71).

Da bis vor einigen Jahren ein Zellkultursystem mit stabil replizierender HCV-RNA nicht zur Verfügung stand, wurde die Auswirkung einer Reihe antiviral wirkender Substanzen, wie zum Beispiel Ribonukleosidanaloga, an Viren der Bovinen Virusdiarrhoe getestet (95, 96). Weitere vergleichende Studien bezüglich der Translation und Replikation von HCV erfolgten durch Herstellung von Chimären, die innerhalb der 5'NTR unterschiedliche Anteile des HCV und dem Virus der klassischen Schweinepest einerseits und dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe andererseits enthalten (34, 84).

## 2.5 HCV-Tiermodell

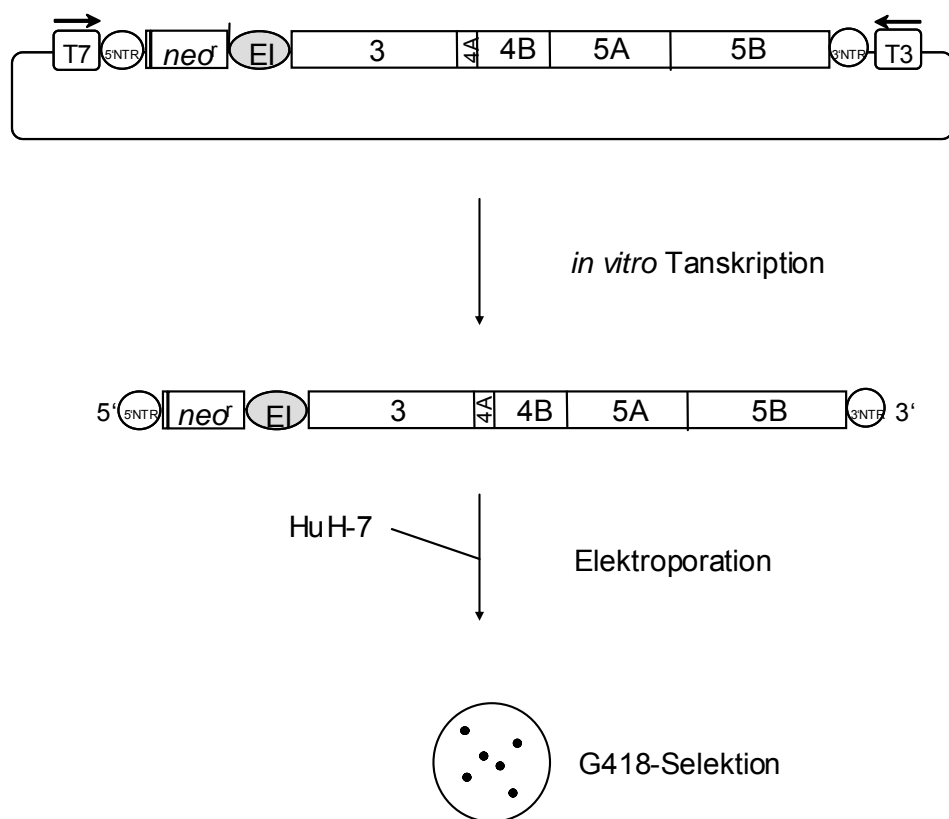
Der Schimpanse stellt derzeit das einzige zur Verfügung stehende Tiermodell für die HCV-Infektion dar. Er läßt sich als einzige Spezies mit dem Virus experimentell infizieren, und reagiert ähnlich dem Menschen auf eine Infektion mit einer Erhöhung der Alaninaminotransferase (ALT) und einer Ausbildung von zytoplasmatischen Veränderungen („membranous web“) in den Hepatozyten. Ein weiterer Vorteil ist, daß eine HCV-Infektion bei diesen Tieren von Beginn an überwacht werden kann, wogegen bei Patienten eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus häufig erst in einem späten klinischen Stadium diagnostiziert wird und Informationen über frühe Stadien der Infektion weitgehend fehlen. Für eine direkte Übertragung der Befunde auf den Menschen ist der Schimpanse allerdings nur bedingt geeignet, da bei diesen Tieren eine experimentelle Infektion milder und seltener als bei Menschen chronisch verläuft. Ein weiterer Nachteil dieses Modells sind die hohen Kosten sowie ethische

Aspekte bei der Verwendung dieser Tiere als Modell für die *in vivo* Untersuchung des Hepatitis-C-Virus (13, 66).

## 2.6 Das HCV-Replikonsystem

Lange Zeit stand kein geeignetes Zellkultursystem für die Aufklärung der Virusreplikation des HCV zur Verfügung, da sich die Vermehrung dieses Virus in den unterschiedlichen Zellkultursystemen als sehr schwierig gestaltete. Erst die Etablierung eines Zellkultursystems mit autonom replizierenden subgenomischen Abschnitten des Genotyps 1b in humanen Hepatomazellen (HuH-7 Zellen) ermöglicht genaue Untersuchungen der viralen Replikation und Proteinexpression von HCV in Zellkultur (64). Das erste beschriebene Replikon ist ein bizistronisches Konstrukt, bestehend aus einem Neomycin-Phosphotransferase-Gen (vermittelt G418 Resistenz) und der Konsensussequenz, HCV Con1, die für die NSP NS3-NS5B kodiert (64). Das Isolat, welches für die Herstellung des Replikons herangezogen wurde, stammte aus der Leber eines chronisch infizierten Patienten, wobei Informationen über den Verlauf der HCV-Infektion dieses Patienten wie z.B. klinische Symptome oder das Ansprechen auf eine Therapie fehlen. Am 5'Ende dieses Konstrukts befindet sich die für die Replikation essentielle HCV 5'NTR einschließlich der für die Translation des Neomycin-Phosphotransferase-Gens wichtigen HCV-IRES. Im Anschluß an die HCV-IRES befindet sich die Sequenz, die für die ersten 12 AS des Core Proteins kodiert und für die volle Funktionalität der IRES wichtig ist. Die Translation der HCV-NSP wird über eine EMCV-IRES (IRES des Encephalomyocarditisvirus; EMCV) gesteuert (Abbildung 3). Die 3'NTR bildet als essentieller Bereich für die virale Replikation den Abschluß des Replikons in 3'Orientierung. Die Transfektion dieser *in vitro* transkribierten neo-HCV-RNAs erfolgt mittels Elektroporation in Zellen der humanen Hepatoma-Zelllinie. HuH-7 Zellen, die die virale Replikation unterstützen, entwickeln eine G418-Resistenz. Zellen, die nicht transfiziert werden oder in denen keine Replikation der HCV-RNA stattfindet, sterben unter Selektion ab (Abbildung 3). Nach Elektroporation der Wildtypsequenz von HCV Con1 konnte anfangs nur eine geringe Anzahl von G418-resistenten Klonen selektioniert werden. Die Analyse der in Zellkultur replizierenden Replikon-RNA

ergab, daß spezifische Mutationen die Replikation der RNA von HCV Con1 in unterschiedlichem Maße verstärken (53, 61, 62). Diese sogenannten „adaptiven Mutationen“ konnten in allen HCV-NSP nachgewiesen werden. Die Adaptationsmutationen treten gehäuft innerhalb der für die Helikasedomäne kodierenden Sequenz des NS3 Gens und der sehr wahrscheinlich an der Hyperphosphorylierung dieses Proteins beteiligten Region des NS5A-Gens auf (10, 61). Ebenso sind Mutationen innerhalb der verschiedenen NSP beschrieben, die in unterschiedlichen Kombinationen neben einer Erhöhung des Replikationsniveaus der HCV-RNA auch zu einer verringerten Replikationseffizienz führen (61).



**Abbildung 3: Experimenteller Ablauf zur Etablierung von Zelllinien mit persistent replizierendem Replikon im Zellkultursystem.**

Das Replikonplasmid (oberes Konstrukt, 4.9.2) dient als Ausgangsmaterial für eine *in vitro* Transkription, durch die Replikon-RNA hergestellt wird. Das eigentliche Replikonkonstrukt ist in der Mitte der Abbildung schematisch dargestellt. Die RNA wird mittels Elektroporation in HuH-7 Zellen transfiziert. Repliziert die virale RNA in den transfizierten Zellen, so bilden die Zellen eine Resistenz gegen G418 aus und es wachsen unter Selektion resistente Kolonien.

Ein weiteres Konstrukt wurde generiert, das anstatt des Neomycinresistenzgens, ein Reporter-gen, das Luziferasegen von *Photinus Pyralis*, enthält (53). Da die Aktivität der Luziferase mit dem Replikationsniveau der HCV-RNA korreliert, kann in HuH-7 Zellen das Replikationsniveau der HCV-Replikonkonstrukte mit den unterschiedlichen adaptiven Mutationen relativ einfach gemessen werden.

Einige Jahre später gelang die Etablierung eines weiteren Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA des HCV-Isolates HCV-N von Genotyp 1b. Dieses Isolat wurde im Gegensatz zur Konsensussequenz Con1 als infektiös nach Inokulation in einen Schimpansen beschrieben. Neben subgenomischen Abschnitten (NS2-NS5B, E1-NS5B) wurde die erfolgreiche Replikation des gesamten HCV-Genoms (Core-NS5B) dieses Isolates in Zellkultur beschrieben (15, 47).

Die Etablierung eines Replikonsystems von subgenomischer RNA eines HCV-Isolates des Genotyps 1a in naiven Huh-7 Zellen war anfangs trotz eines Aminosäureaustausches in NS5A, der bereits bei HCV Con1 als hochadaptive Mutation beschrieben wurde, nicht möglich. Eine stabile Replikation des Genotyp 1a HCV-Isolates H77 gelang erst nach Transfektion einer adaptierten Zelllinie (HuH-7.5) (11). Es handelt sich hier um eine HuH-7 Zelllinie, die nach Transfektion mit HCV-RNA von Con1 mit Interferon behandelt wurde. Transfektionsversuche zeigten, daß in diesen sogenannten ‚geheilten‘ Zellen bereits das Isolat HCV Con1 mit erhöhtem Replikationsniveau replizierte und demnach eine Adaptation der Zelllinie an das Replikon vorlag (12).

Die stabile Replikation eines weiteren HCV-Isolates des Genotyps 1b, HCV-BK, konnte nach Insertion der NS3-kodierenden Region des Isolates HCV Con1 in die Sequenz von HCV-BK erreicht werden. Sequenzvergleiche innerhalb von NS3 der beiden Isolate HCV Con1 und BK ergaben, daß eine AS an der Position 470 innerhalb des NS3-Proteins von HCV Con1, die bei HCV-BK nicht vorhanden war, zu einer erfolgreichen Replikation des Isolates HCV-BK in HuH-7 Zellen führt (40).

Die Etablierung eines Replikonsystems mit stabil replizierender HCV-RNA des Genotyps 2a wurde im Jahr 2003 publiziert (49). Im Gegensatz zu den bisher in Zellkultur replizierenden HCV-Isolaten, stammte das Isolat JFH-1, das für die Herstellung der HCV-Replikonkonstrukte herangezogen wurde, von einem Patienten, der an einer fulminanten Hepatitis-C erkrankt war. Nach Transfektion von

HuH-7 Zellen mit subgenomischen Abschnitten des Isolates JFH-1 (NS3-NS5B) konnte ohne zusätzliche adaptive Mutationen eine stabile Replikation unter G418 erreicht werden (49).

Nach Entwicklung einer Reihe von Replikonsystemen mit stabil replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV-Isolaten der unterschiedlichen Genotypen gelang im Jahr 2002 erstmals die Transfektion und erfolgreiche Selektion von Replikonkonstrukten, die neben den NSP (NS2-NS3) zusätzlich die Strukturproteine Core-E1-E2 einschließlich dem Protein p7 umfaßten. Transfektionsversuche mit der Wildtypkonsensussequenz von HCV Con1 führten anfangs zu keiner erfolgreichen Replikation in HuH-7 Zellen. Erst nach Insertion von adaptiven Mutationen konnte unter G418 in HuH-7 Zellen eine stabile Replikation dieses Replikonkonstruktes, das das gesamte HCV-Genom umfaßte, erreicht werden (80). Trotz der stabilen Replikation in HuH-7 Zellen und des erfolgreichen Nachweises von HCV-RNA im Überstand der Zellen fehlte jeder Hinweis auf eine Bildung und Sekretion von infektiösen Viruspartikeln. 2005 wurde die Etablierung eines Zellkultursystems mit replizierender HCV-RNA (Core- NS5B) verbunden mit der Bildung infektiöser Partikel beschrieben (106). Neben HuH-7 Zellen wurden weitere Zelllinien beschrieben, in denen eine Replikation von HCV-RNA des Isolates JFH-1 erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Neben der Transfektion von HepG2-Zellen, eine von Leberzellen abgeleitete Zelllinie, konnte nach Transfektion von IMY-N9 Zellen (eine Fusion von HepG2 Zellen und humanen Hepatozyten) unter G418 replizierende HCV-RNA nachgewiesen werden. Verglichen mit der Transfektion von HuH-7 Zellen war die Kolonienbildungseffizienz nach Transfektion dieser genannten Zelllinien allerdings geringer (20). Kürzlich gelang die Etablierung von Replikonsystemen mit replizierender HCV-RNA von Genotyp 2a in Zelllinien, die nicht von Hepatozyten abgeleitet sind. Neben HeLa Zellen, die von einem humanen Zervixkarzinom stammen, wurde eine erfolgreiche Replikation nach Transfektion von HEK 293-Zellen, einer embryonalen Nierenzelle, beschrieben (50).

### 3 Fragestellung

Vor einigen Jahren gelang die Etablierung eines Zellkultursystems mit autonom replizierenden subgenomischen Abschnitten des Hepatitis-C-Virus. Mit diesem Replikonsystem konnte die virale Replikation und Proteinexpression des HCV einschließlich der Wirkungsweise antiviraler Substanzen in Zellkultur genauer untersucht werden. Für die in HuH-7 Zellen replizierenden Isolate des Genotyps 1b und 1a stehen jedoch keine Informationen wie der Krankheitsverlauf, die Viruskinetik oder ein langfristiges Ansprechen auf die Therapie der Patienten, deren Isolate für die Generierung dieser Replikonkonstrukte verwendet wurden, zur Verfügung. Die erfolgreiche Etablierung eines Zellkultursystems mit replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV-RNA des Genotyps 3a wurde bis dato nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Etablierung eines Zellkultursystems mit stabil replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV-RNA des Genotyps 3a. Für die Generierung der Replikonkonstrukte wurden zwei Isolate von klinisch gut charakterisierten Patienten ausgewählt, wobei ein Patient nach Gabe von IFN- $\alpha$ /Ribavirin geheilt werden konnte, der andere Patient aber nicht vollständig auf die Therapie ansprach. Es sollte von jedem der beiden Isolate ein Zellkultursystem mit stabil replizierender HCV-RNA hergestellt werden. Diese Zellkultursysteme sollen genaue Untersuchungen hinsichtlich der viralen Replikation und der Proteinexpression des HCV ermöglichen. Die Ursachen der Sensitivität bzw. Resistenz von HCV-Isolaten gegenüber einer antiviralen Therapie sind noch nicht vollständig geklärt. Daher soll dieses Zellkulturmodell für vergleichende Untersuchungen mit replizierender HCV-RNA des Genotyps 1b zur Frage von Therapieresistenzmechanismen von antiviral wirkenden Substanzen gegenüber HCV in Zellkultur zur Verfügung stehen.

## 4 Material

### 4.1 Geräte und Einwegmaterialien

Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL, Karlsruhe
Analysenwaagen	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	H+PLabortechnik, Oberschleißheim
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus Instruments, Hanau
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Datenbank, EMBL	EMBL, Heidelberg
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Foto-Apparatur	Polaroid, Cambridge, England
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich
Mikrowellenofen	Hettachi, Eschborn
Petrischalen (Ø 10 cm)	Falcon, Heidelberg
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761, Essen
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Basic MCBB100	Sartorius, Göttingen
Quarzküvetten	Heraeus, Hanau
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Certomat U, B. Braun, Berlin
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Kapillar-Elektrophorese- Sequenzierautomat, 310 und 3100	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektralphotometer U-2000	Hitachi, Tokio, Japan
Sterilarbeitsbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products, Ca., USA



---

Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Rotilab®-Mini Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York, USA

## 4.2 Allgemeine Chemikalien

Agarose peqGold Universal	PeqLab, Erlangen
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyadenosintriphosphat-Lithium	Roche, Mannheim
Desoxyadenosintriphosphat-Natrium	Roche, Mannheim
Desoxycytidintriphosphat-Lithium	Roche, Mannheim
Desoxycytidintriphosphat-Natrium	Roche, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat-Lithium	Roche, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat-Natrium	Roche, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat-Lithium	Roche, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat -Natrium	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
Dimethyl-Pyrocarbonat (DMPC)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt

Glycerin	Roth, Karlsruhe
Geneticin (G418 Sulfat, Aminoglykosid)	Invitrogen, Karlsruhe
Hefe Extrakt	Sigma, Taufkirchen
HEPES (Puffersubstanz)	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid 25 mM	Perkin Elmer/ABI, Weiterstadt
3'-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Nukleotid-Mix dNTPs (250 µM je dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roche, Mannheim
PCR Reaction Buffer	Roche, Mannheim
Random Hexamere	Invitrogen, Karlsruhe
Reinstwasser	Braun, Melsungen
RNase freies Wasser (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Salzsäure	Riedel de Haen, Hannover
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Template Suppression Reagent	Perkin Elmer/ABI, Weiterstadt
Tris-Base	US Biochemical, Cleveland, USA
Trypton (Bakterienmedium)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20 (Detergens)	Sigma, Taufkirchen

### 4.3 Fertige Reagenzien-Sets

BigDye Terminator Cycle Kit 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
DyeEx 2.0. Spin Kit	Qiagen, Hilden
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
JETstar Plasmid Maxiprep Kit	Genomed, Löhne
QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

---

QIAquick Extaction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
TOPO XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 4.4 Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

### 4.4.1 Restriktionsendonukleasen

Folgende Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt/M) verwendet:

Afl II, AgeI, BamHI, BclI, BsiWI, EcoRI, EcoRV, FspI, KspI, MnlI, NsiI, PflmI, PstI, Sall, SmaI, PmeI, SpeI, SmaI, XhoI

### 4.4.2 Enzyme

Ampli Taq Gold-Polymerase®	Perkin Elmer, Weiterstadt
<i>Pfu-Turbo</i> DNA Polymerase (3'-5' Exonukleaseaktivität)	Stratagene, Heidelberg
Pwo DNA Polymerase (3'-5' Exonukleaseaktivität)	Roche-Applied-Systems
T7-RNA-Polymerase	Promega, Mannheim
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, Mannheim
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Gibco BRL, Karlsruhe,
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/M
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt/M

### 4.4.3 DNA-Längenstandards

Lambda DNA/Eco130I (Styl) Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

Fragmentlängen in Basenpaaren (bp): 421, 925, 1489, 1882, 2690, 3472, 4254, 6223, 7743, 19329

DNA-Längenstandard XIV (100-1500bp)  
Mannheim

Roche-Applied-Science,

Fragmentlängen in bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2642

## 4.5 Oligonukleotide

### 4.5.1 Primer für die Amplifikation der Konsensusprimerregion

3a-NS2-1s	cac cta gca gtg gcc act gaa cc
3a-NS2-1a	cca aga agg ccc cta gtt tgc tg
3a-NS2-2s	tac gac cac cta gcg cc
3a-NS2-2a	gcc gta gaa agc acc tgc ac
3a-3'NC-1a	tgg gcg gta cgc acc aag ac
3a-3'NC-1a	gga gtg tta tct tac cag ctc a
3a-3'NC-2s	tgg aga cat cgggcacgagc

### 4.5.2 Primer für die RT-PCR der HCV-Isolate 427 und 2879

Name	Sequenz (5'-3')	Lokalisation
3a-NS-427-1s	gct tgc gga gat att ctt tgc ggg ctg cc	2512 nach HCV K3a
3a-NS-2879-1s	gct tgc ggg gat atc ctc tgc ggg ctg cc	2511 nach HCV K3a
3a-NS-con-1a	tgg agt gtt atc tta cca gct c	2689 nach HCV K3a
3a-NS-con-3s	ggc cgt gag gtg ttg ttg gga cct gct gat g	2510 nach HCV K3a
3a-NS-427-4a	tca ccg agc tgg cag gag aaa gat gcc tac ccc tac	2509 nach HCV K3a
3a-NS-2879-4a	tca ccg agc tgg tag gag aaa aat gcc tac ccc tac	2508 nach HCV K3a

### 4.5.3 Sequenzierprimer für die HCV-Isolate 427 und 2879

Name	Sequenz (5'-3')
3a-NS-3s	ggc cgt gag gtg ttg ttg gga cct gct gat g
3a-NS-4s	gat cag gac ctc gtt ggg tgg cc
3a-NS-5s	gac aat tca act cct cct gc
3a-NS-6s	cat gcc caa gac gct act ag
3a-NS-7s	gtc ata cca aca aca gga gac g
3a-NS-8s	ctg cag ccc gct gag acc aca g
3a-NS-9s	tgc ttg aca cac ccc atc ac
3a-NS-10s	caa caa gct gtc att gag ccc ata g
3a-NS-11s	gtc ttg ctt gac atc ctg gca gg
3a-NS-12s	cac tat gtt ccc gag agc gat g
3a-NS-13s	gca ggg ccg cgt aca tgt gc
3a-NS-14s	atc act ttc atg gta ggg tt
3a-NS-15s	cct ctg aga gcc gaa act gat g
3a-NS-16s	tca ttc ccg tcc tcg aaa cc
3a-NS-17s	ata aca cca tgt agt gct gag g
3a-NS-18s	tat agt gcg aag gac gtt cg
3a-NS-19s	gaa cgt ctg ctg aag atg tg
3a-NS-20s	atc aag gcc aca gcg gct gc
3a-NS-21s	acc cgt gat gcc act act cc
3a-NS-22s	cac agt tac tct cca gta gag c
3a-NS-5a	tcg cgg gta acc aag tat aag tct gc
3a-NS-6a	tga tgc tgc ctg ggg gag ttg ctg tcg c
3a-NS-7a	tct caa tgg aaa agg tgg ggt cca ggc tg
3a-NS-8a	cag act tgt gac agt tag aga gaa ctc agc
3a-NS-9a	ctg ttg gca gcc acg cgc cat agc gcg c
3a-NS-10a	tgg agg gtt gta gtc tgg
3a-NS-11a	cga agg taa cct tcc tct gac gct gag
3a-NS-12a	ctcatt ctt cgc cat gat ggt ggt tgg
3a-NS-13a	ttc cac cct gat gtc ctg ttc agt gac
3a-NS-14a	gcc atc gct ctc ggc cac cac gac cag
3a-NS-15a	tgg cgc gca ctg ctc gtg ccc gat gtc

#### 4.5.4 Mutageneseprimer für die HCV-Isolate 427 und 2879

Name	Sequenz (5'-3')
2879-mut-s1	ggt atg tgc cct tcg ggg cat gtt gcg ggg atc ttt agg
2879-mut-a1	cct aaa gat ccc cgc aac atg ccc cga agg gca cat aac
2879-mut-s2	cca gac ttg agt tgc gtc tct tgg tcc acc gtt agt gac
2879-mut-a2	gtc act aac ggt gga cca aga gac gca act caa gtc tgg
2879-mut-s3	gct tct cag cgt cag aag aag gtc acc ttc gac aga ctg
2879-mut-a3	cag tct gtc gaa ggt gac ctt ctt ctg acg ctg aga agc
427-mut-s2	cag gca ata gcc cac cag ttc aag gaa aaa atc ctt gga ttg
427-mut-a2	caa tcc aag gat ttt ttc ctt gaa ctg gtg ggc tat tgc ctg
s2879conR1319H	ctg tga tga atg cca tgc cca aga cgc t
as2879conR1319H	agc gtc ttg ggc atg gca ttc atc aca g
s2879conD2740V	gga gat gat ctg gtc gtg gtg gtg gct gag
as2879conD2740V	ctc agc cac cac gac cag atc atc tcc
s2879conL1496M	cgg gcc gag gta gaa tgg gta cgt acc
as2879conL1496M	ggt acg tac cca ttc tac ctc ggc ccg
s2879conS2204I	caa gct cat ccg cca tcc aac tat cgg ctc
as2879conS2204I	gag ccg ata gtt gga tgg cgg atg agc ttg
s2879conS2204R	gca agc tca tcc gcc cgc caa cta tcg
as2879conS2204R	cga tag ttg gcg ggc gga tga gct tgc
s2879conK1846T	cta tag gcc tag gca cgg tct tgc ttg
s2879conK1846T	gaa gca aga ccg tgc cta ggc cta tag
s427conL1496M	cgg gcc ggg gta gga tgg gta cgt acc
as427 conL1496M	cgg tac gta ccc atc cta ccc cgg ccc g
s427conR2469K	gct tct cag cgc cag aag aag gtt acc ttc g
as427conR2469K	cga agg taa cct tct tct ggc gct gag aag c
s427conA2608S	gag gtg atg ggt agc gct tac gga ttc c
as427conA2608S	gag gtg atg ggt agc gct tac gga ttc c
s427conS2204I	gca agt tcg tcc gcc atc caa ctg tcg gct c
as427conS2204I	gag ccg aca gtt gga tgg cgg acg aac ttg c
s427conS2204R	gca agt tcg tcc gcc cgc caa ctg tcg

Name	Sequenz (5'-3')
as427conS2204R	cga cag ttg gcg ggc gga cga act tgc
s427conK1846T	gta tag gtc tgg gca cgg tct tgc ttg
as427conK1846T	caa gca aga ccg tgc cca gac cta tac
s-2879-NS3	gcc ccg atc aca gca tac acc cag c
a-2879-NS3	cgt tct cga acc tgc acc atg gta aac
a-EMCV-2879-NS3	gct ggg tgt atg ctg tga tcg ggg cca tgg tat tat cgt gtt ttt caa agg aaa acc

## 4.6 Bakterien

Stamm	Genotyp
<b>GM2163</b>	F <sup>-</sup> ara-14leuB6fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4rfbD1 rpsL136(Str <sup>R</sup> )dam13::Tn9(CamR) xylA5mtl-1thi-1 mcrB1 hsdR2
<b>Dh5α</b>	F <sup>-</sup> Φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> ,m <sub>k</sub> <sup>+</sup> )phoA supE44 λ <sup>+</sup> thi-1 gyrA96 relA1
<b>Top10</b>	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG

## 4.7 Zellen

HuH-7: humane Hepatoma-Zelllinie

HuH-7 Lunet: humane Hepatoma-Zelllinie mit Interferon vorbehandelt

## 4.8 Medien

### 4.8.1 Medien für die Bakterienkultur

Die aufgeführten Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für 20 Minuten bei 1.3 bar autoklaviert.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Medium

LB-Agar: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Medium, Zusatz von 7,5 g Agar.

LB-Selektionsmedien: Für die Herstellung von 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl eingewogen. Anschließend wurden die Reagenzien auf 1000 ml mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, unter ständigem Rühren aufgelöst und das Medium mit 0,1n NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Zur Herstellung von Selektionsmedien wurden dem LB-Medium nach Autoklavierung und Abkühlung auf 50°C Antibiotika zugesetzt (Ampicillin: 50 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml). Die Antibiotika wurden als Stammlösungen in tausendfacher Konzentration mit Wasser angesetzt, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Abhängig von der Antibiotikaresistenz des Plasmids wurde für die Selektion der Bakterien entweder Kanamycin oder Ampicillin in einer Menge von 50 µg/ml Endkonzentration zugesetzt.

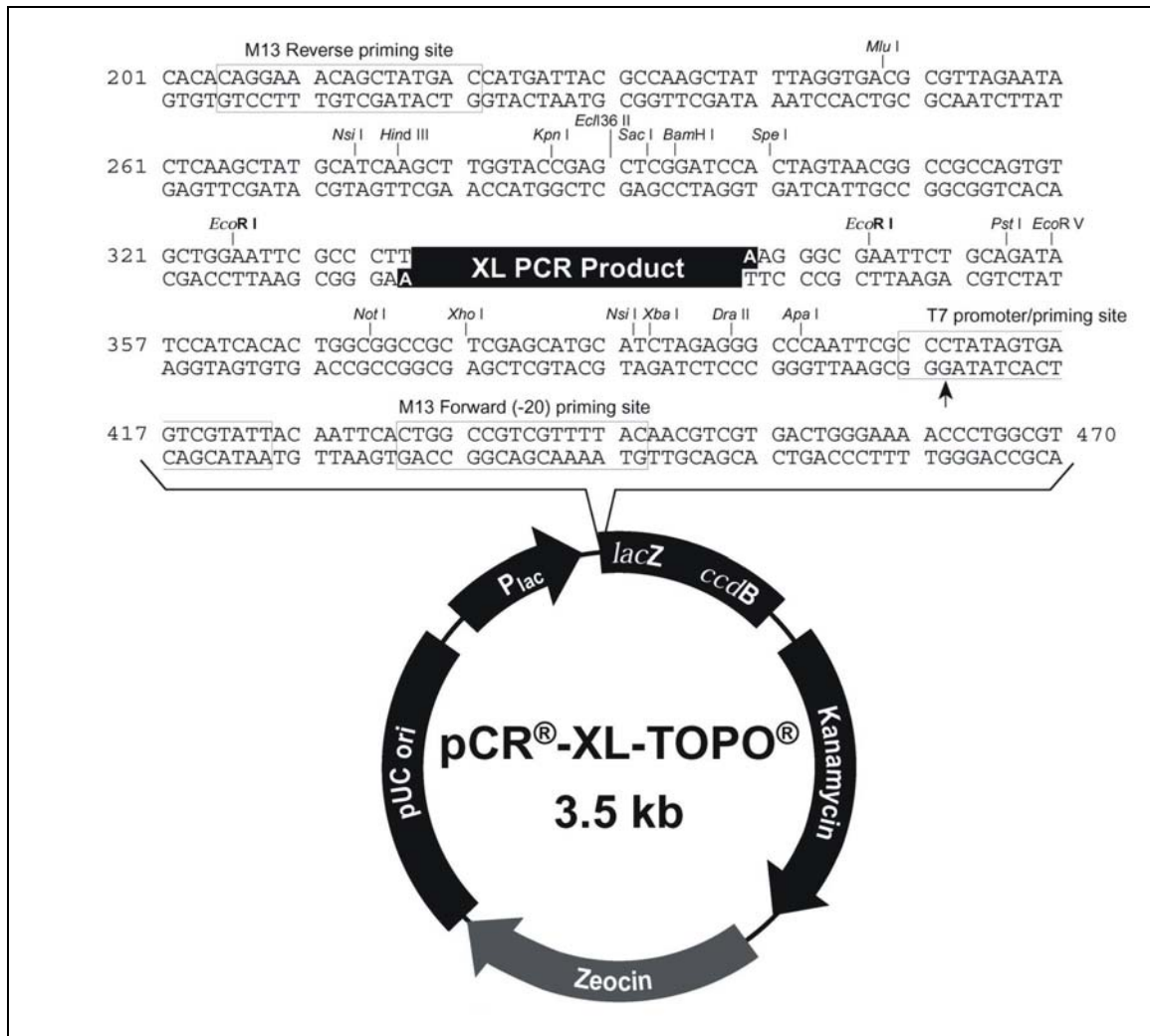
#### **4.8.2 Medium für die Zellkultur**

Standardmedium (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Karlsruhe): zu 500 ml DMEM wurden 50 ml Fötale Kälberserum (Gibco, Karlsruhe), 5 ml Penicillin/Streptomycin (PAA-Laboratories, Linz, Österreich) und 10 µl Glutamin (PAA-Laboratories, Linz, Österreich) zugesetzt.



## 4.9 Vektoren/Plasmide

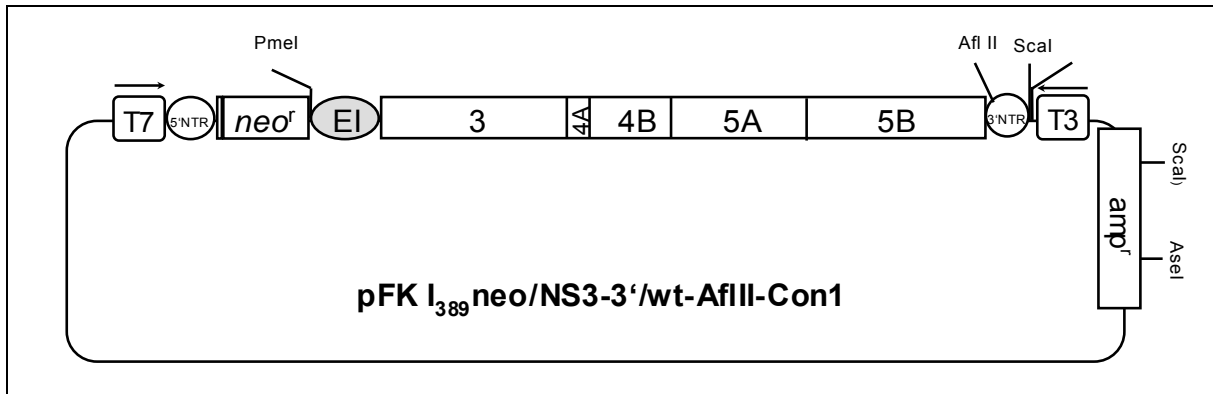
### 4.9.1 pCR®-XL-TOPO®



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vektors pCR®-XL-TOPO®, in den die Sequenz der NSP NS3-NS5B der beiden 3a-Isolate kloniert wurde.**

Für die Aufnahme der Fremd-DNA enthält der Vektor einen eingefügten DNA Abschnitt mit vielen Restriktionsschnittstellen (Multiple Cloning Site), und einen Überhang von einem Thyminrest. Die Vektorsequenz enthält die Primerbindungsstellen (M13 reverse priming site, M13 Forward priming site), um mittels PCR die Insertion des Amplifikats zu überprüfen.

### 4.9.2 pFK I389 neo/NS3-3'/wt-AflIII-Con1



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des pFK1-Vektors, eine Modifikation des pBR-Vektors.** Am äußeren 5'Ende befindet sich ein T7-Promotor (T7) für die *in vitro* Herstellung von RNA-Transkripten, gefolgt von einer HCV 5'nicht-translatierten Region (5'NTR) einschließlich der IRES für die Translation des Neomycinresistenzgens (G418). Ferner enthält der Vektor eine EMCV-IRES (EI; IRES des Encephalomyocarditisvirus) als Promotor für die Translation der Nichtstrukturproteine. Im Anschluß daran befinden sich die Nichtstrukturproteine NS3-NS5B, die originäre 3'nicht-translatierte Region (3'NTR) und ein T3 Promotor (T3). Zudem enthält der Vektor für die Selektion des Plasmids ein Ampicillinresistenzgen ( $amp^r$ ). Die Schnittstellen PmeI und AflIII dienten dazu mittels überlappender PCR die Sequenz der Nichtstrukturproteine der HCV 3a Isolate in den Vektor zu klonieren. Ferner war der Vektor für die Linearisierung vor Herstellung der RNA-Transkripte mit zwei Scal- und einer AseI-Schnittstelle ausgestattet.

## 4.10 Puffer und Lösungen

### 4.10.1 Puffer für die Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA mittels Agarosegel wurde mit TAE-Puffer gearbeitet.

Für die Gelelektrophorese wurde 1x TAE eingesetzt.

TAE (1x):    0,4 M Tris  
               0,2 M Na-Acetat (Trihydrat)  
               10 mM EDTA

Der Puffer wurde als 40x konzentrierte Vorratslösung angesetzt:

TAE(40x):    193,82 g Tris  
               65,62 g Na-Acetat (Trihydrat)  
               29,78 g EDTA

Die einzelnen Reagenzien wurden eingewogen und in 800 ml Aqua dest. unter ständigem Rühren aufgelöst. Anschließend wurde mit Essigsäure (Eisessig, 100%) der pH-Wert auf 8,3 eingestellt und auf 1 Liter mit Wasser aufgefüllt.

TBE-Puffer: 100 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein)

Ladungspuffer für Proben: 2 g Bromphenolblau, 60 g Saccharose, 2 mmol EDTA und 36 g Harnstoff in 100 ml Aqua bidest. lösen und autoklavieren  
50 µl Aqua (DMPC), 50 µl Glycerin, 10 µl Loading-Dye (Fermentas)

Kristallviolett: Für die Aufreinigung der PCR-Produkte vor Klonierung in den Topo<sup>®</sup> XL Vektor wurde mit Kristallviolett-puffer gearbeitet. Sowohl die Proben als auch das Gel wurden mit Kristallviolett-puffer angefärbt.

#### **4.10.2 Puffer und Lösungen für die Kompetenzinduktion von Bakterien**

TFB<sub>1</sub>: 30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin, pH-Werteinstellung mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8, Auffüllen mit Wasser auf ein Endvolumen von 50 ml.

TFB<sub>2</sub>: 10 mM Na-MOPS Puffer pH 7.0, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 15% Glycerin, Auffüllen auf ein Endvolumen von 50 ml.

Vor Herstellung der Puffer TFB<sub>1</sub> und TFB<sub>2</sub> wurde von jedem der benötigten Reagenzien eine Stocklösung hergestellt, wobei die Menge jedes einzelnen Reagenz auf 50 ml berechnet wurde. Die Reagenzien wurden getrennt voneinander eingewogen, mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt und sterilfiltriert. Kurz vor Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte die Vorbereitung der Puffer TFB<sub>1</sub> und TFB<sub>2</sub> durch das Vermengen der einzelnen Stocklösungen und das Auffüllen mit Aqua dest. auf 50 ml, wobei diese Puffer (TFB<sub>1</sub> und TFB<sub>2</sub>) vor Weiterverwendung wiederum sterilfiltriert wurden.

#### 4.10.3 Puffer und Reagenzien für den Northern-Blot

10x MOPS-Acetat-Puffer pH 7: 200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 20 mM EDTA

Ladepuffer (Stammlösung): 250 µl 100% Formamid, 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl 10x Mops, 50 µl 100% Glycerin, 10 µl 2,5 % Bromphenolblau, 57 µl Wasser (DMPC)

Laufpuffer: 1x MOPS -Acetat-Puffer

Waschpuffer: 0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,3% Tween 20

Maleinsäurepuffer: 0,1M Maleinsäure pH 7,5, 0,15M NaCl

Detektionspuffer: 0,1M Tris-HCl pH 9,5, 0,1M NaCl (pH 9,5)

Strippingpuffer: 50% Formamid, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5% SDS

Blocklösung: 1:10 verdünnt in Maleinsäurepuffer

SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Tri-Natriumcitrat

Labelingmix: Reagenz zur Herstellung der DIG (Digoxigenin) markierten Sonde

DIG-Easy Hyb: Granulat, das in 64 ml DMPC-Wasser aufgelöst wurde

CDP-Star: Chemoluminiszenz-Substrat für die alkalische Phosphatase

#### 4.10.4 Herstellung von RNase-freiem Wasser (DMPC-Wasser)

Für das Arbeiten mit RNA mußte um Kontaminationen zu vermeiden RNase-freies Wasser verwendet werden. Aus diesem Grund wurde das Wasser vor Verwendung mit DMPC (Materialteil) behandelt. Für die Herstellung von einem Liter 0,1% DMPC Wasser wurden 50 ml Aqua dest., 50 ml Ethanol (100%) und 1 ml DMPC vermischt und mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt. Der Ansatz wurde mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin autoklaviert.

#### 4.10.5 Puffer für die *in vitro* Transkription und Transfektion

5x RRL-Puffer: 80 mM HEPES pH 7,5; 12 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM Spermidin; 40 mM DTT

Cytomix: 120 mM KCl; 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6); 25 mM Hepes (pH 7,6); 2 mM EGTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt; vor Gebrauch wurde der Lösung 2 mM ATP (pH 7,6 titriert) und 5 mM Glutathion zugesetzt.

#### 4.11 Patientenisolat zur Generierung der Replikonstrukt

Von den Patienten, deren Isolate für die Generierung der in HuH-7 Zellen replizierenden Replikons verwendet wurden, fehlen klinische Daten, wie der Verlauf der Krankheit, ein Ansprechen auf die Therapie, oder die Kinetik der Virusinfektion. Aus diesem Grund wurden für die Herstellung der Replikonstrukt 2 Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 3a (Patient 2879 und 427), mit jeweils dauerhaftem (sustained virologic responder) bzw. unvollständigem (partial responder) virologischen Ansprechen auf die Therapie mit IFN- $\alpha$  ausgewählt (Abbildung 6).

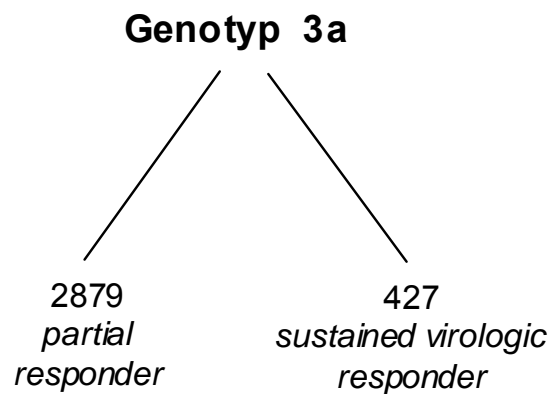


Abbildung 6: Auswahl der Patienten, deren Isolate für die Generierung der Replikonstrukt verwendet wurden.

## 5 Methoden

### 5.1 RNA-Isolierung

Für die Herstellung der Replikonstrukte mußte die HCV-RNA aus den ausgewählten Patienten isoliert werden. Als Ausgangsmaterial diente das Serum der Patienten. Nach Blutentnahme wurden die Proben so schnell wie möglich abzentrifugiert, oder bei 4 °C gelagert, um eine Hämolyse der Erythrozyten zu vermeiden. Die Zentrifugation erfolgte 10 Min. bei 3000 UpM. Das Serum wurde abpipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert, um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern. Um die HCV-RNA aus dem Serum zu isolieren, wurde der QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Durch Lyse (Puffer AVL) und Denaturierung wurden RNasen inaktiviert und die Virushülle aufgebrochen. Die freiwerdende virale RNA wurde an Silicagel-Membranen gebunden und anschließend eluiert. Für die Extraktion der HCV-RNA aus dem Serum der Patienten mußte dem Puffer AVL Carrier-RNA zugesetzt werden, die die Bindung der viralen RNA an der Säulchenmembran verbessert und die Degradation der RNA durch RNasen verringern soll. Der Puffer AVL wurde auf eventuell präzipitierte Carrier-RNA überprüft, und falls notwendig bei 80°C inkubiert. Es wurden 560 µl AVL Puffer zu 140 µl Serum pipettiert, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, um die Hepatitis-C-Viren zu lysieren. Anschließend erfolgten der Zusatz von 560 µl Ethanol (96-100%), und das Vortexen der Proben für ca 15 s. Es wurden 650 µl der Probenmenge auf eine QIAamp-Säule pipettiert und bei 8000 UpM für 1 Min. zentrifugiert. Die verbleibende Probenmenge wurde auf die Säule pipettiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Es erfolgte der Zusatz von 500 µl Ethanol-Waschpuffer (AW1) und die Zentrifugation der Proben bei 8000 UpM für 1 Min. Das Filtrat wurde anschließend verworfen. Nach Zusatz von 500 µl eines weiteren Ethanol-haltigen Waschpuffers (AW2) wurden die Proben bei 14000 UpM für 3 Min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und dieser Zentrifugationsschritt ein weiteres Mal wiederholt um Restalkohol zu entfernen. Zurückbleibendes Ethanol könnte die enzymatische Reaktion während der PCR hemmen. Eluiert wurde mit 60 µl Aqua dest. bei Raumtemperatur. Die Säulchen mit den Proben wurden 1 Min.

bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 UpM für 1 Min. zentrifugiert. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 5.2 DNA-Mini-Präparation

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte über eine Retransformation in DH5α *E.coli* Bakterien (5.8). Die Aufreinigung von geringeren Mengen Plasmid DNA (bis 20 µg) wurde mit dem Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Bakterien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei 4000 UpM 10 Min. abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer P1 vollständig aufgelöst. Nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer P2 erfolgte eine Inkubation von 5 Min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer N3 zugesetzt, und die Proben 10 Min. bei 13000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep-Säule pipettiert und abzentrifugiert. Es erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl Puffer PB und ein weiterer mit 750µl Puffer PE. Die DNA wurde mit 50 µl 60 °C warmen Elutionspuffer EB von der Säulchenmembran eluiert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch gemessen und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

## 5.3 DNA-Maxi-Präparation

Für die Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA im Milligrammbereich wurde mit dem JetStar Maxiplasmid Kit gearbeitet. Dafür wurden Bakterien aus 300 ml einer Übernachtskultur 10 Min. bei 4000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wurde dem Bakterienpellet 10 ml Resuspensionspuffer E1 zugesetzt und vollständig resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 10 ml Lysispuffer E2 zugesetzt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 10 ml Puffer E3. Die Proben wurden 10 Min. bei 15000 xg und 20 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mit 30 ml Lösung E4 equilibrierte Säule pipettiert und die gebundene Plasmid-DNA mit 60 ml Waschpuffer (E5) gewaschen. Nach Eluierung der DNA mit 15 ml Elutionspuffer E6 wurde diese mit 70% Isopropanol

gefällt. Die DNA wurde 30 Min. bei 13000 UpM und 4°C abzentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des Ethanols wurde das Pellet in 1 ml Wasser aufgelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 5.4 Agarosegelelektrophorese

Nach der Amplifikation (5.11) oder Restriktionsenzymverdau (5.6) erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht mittels Agarosegelelektrophorese. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration angefertigt. Zur Auftrennung von kleineren Fragmenten (ca. 200 bis 600 bp) wurden 1,5%ige Agarosegele eingesetzt. Für eine bessere Auftrennung sehr großer Fragmente wurde mit Agarosegelen gearbeitet, deren Agarosekonzentration 0,8-1% betrug. Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen. Es wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (Stammlösung: 230µg/ml) zugegeben und das Gel nach Abkühlen auf etwa 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Je nach Probenanzahl wurde ein Probenkamm mit 14-20 Taschen verwendet. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die mit 1,0x TAE-Puffer befüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt. Die Proben wurden mit 1/10 Vol. 10x Bromphenolblaumarker (4.10.1) versetzt (1 µl Probenpuffer, 5 µl Probe, 4 µl Wasser) und in die Geltaschen pipettiert. Ein Molekulargewichtsmarker (4.4.3) mit bekannten Fragmentgrößen wurde auf das Gel aufgetragen, um die Größe der unbekannt DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die DNA wurde ca. 1 Stunde mit einer Feldstärke von 5 V / cm<sup>2</sup> aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht (305 nm) sichtbar gemacht, mit einer Polaroidkamera durch einen orange-rot Filter fotografiert, und die Fragmentgrößen auf ihre Richtigkeit überprüft. Es besteht die Gefahr von Schäden an der DNA in Form von Mutationen durch das verwendete UV-Licht. Aus diesem Grund wurde nach erfolgter Amplifikation der NS3-NS5B Gene für die Aufreinigung der Amplifikate das Agarosegel anstatt mit Ethidiumbromid mit Kristallviolett (4.10.1) angefärbt. Dies ermöglichte ein Sichtbarmachen der PCR-Fragmente ohne Bestrahlung mit UV-Licht. Es mußte



allerdings eine ausreichende Menge an Amplifikat auf das Gel aufgetragen werden (mind. 200ng Amplifikat), um die Banden lokalisieren zu können.

## 5.5 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Die Wiedergewinnung der DNA nach der Amplifikation oder dem Restriktionsenzymverdau erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die Fragmente wurden über ein Agarosegel (5.4) aufgetrennt. Die für die weitere Klonierung erforderliche DNA wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Entsprechend dem Gewicht wurde die DNA mit 300  $\mu$ l QG Puffer pro 100 mg Gel versetzt und die Proben bei 50 °C ca. 10 Min. unter Schütteln inkubiert bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Der Ansatz wurde auf eine Säule aufgetragen, und 30-60 s bei 13000 UpM zentrifugiert (alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13000 UpM). Um alle Gelrückstände zu entfernen, wurden weitere 500  $\mu$ l Puffer QG auf die Säule pipettiert und abzentrifugiert. Abschließend wurde die DNA mit 750  $\mu$ l eines Ethanol-haltigen Waschpuffer PE gewaschen und mit 30  $\mu$ l Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) eluiert. Für die Eluierung wurde der Puffer EB auf 60°C erhitzt um die DNA besser abzulösen.

## 5.6 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Gewinnung von linearen DNA-Fragmenten für nachfolgende Klonierungen, und für die Analyse bereits klonierter Konstrukte, wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen enzymatisch gespalten. Ein Unit Restriktionsendonukleaseaktivität ist vom Hersteller definiert als die Enzymmenge, die 1  $\mu$ g DNA innerhalb 1h enzymatisch vollständig verdaut. Es wird angegeben, wie oft das entsprechende Enzym innerhalb der Sequenz des  $\lambda$ Phagen schneidet. Falls ein Enzym nur eine Schnittstelle innerhalb der  $\lambda$ Phagen DNA besitzt, werden von 1U Enzym 1/32 pmol DNA geschnitten. Wenn 1 $\mu$ g  $\lambda$ Phagen DNA einer Menge von 1/32 pmol entsprechen, sind 32 Units erforderlich, um 1pmol  $\lambda$ Phagen DNA zu schneiden. Entsprechend benötigt man für den Verdau von 1 pmol eines

Plasmidmoleküls mit einer Schnittstelle dieses Enzyms ebenfalls 32 U. Trug das Plasmidmolekül zwei Schnittstellen, so waren 64 U notwendig. Je nach Anzahl der Schnittstellen der zu verdauenden Proben-DNA mußte vorher die erforderliche Menge an Enzym berechnet werden. Der Ansatz für den Restriktionsenzymverdau (präparativer Verdau 100 µl, analytischer Verdau 15 µl) enthielt 3-5 µg DNA. Der Reaktionspuffer wurde in einer Konzentration von 1% hinzupipettiert. Die Proben wurden abhängig vom Enzym 1-2 h bei 37 °C bzw. 50°C inkubiert.

## 5.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligasen

Für die Ligation von DNA-Fragmenten (Inserts/Vektor) wurde mit der T4-DNA-Ligase gearbeitet. Diese Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Molekülen. Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden etwa 100 ng des linearisierten Vektors eingesetzt. Die Fragmente wurden in 2-3 fachem Überschuß dem Reaktionsansatz zugesetzt. Ferner enthielt der Ligationsansatz 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (400U/µl). Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C. Um die Religationsrate des Vektors zu verringern, wurde dieser nach dem Restriktionsenzymverdau mit 1 µl Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) 1 h bei 37°C inkubiert.

## 5.8 Kompetenzinduktion und Transformation von *E. coli*

Die Kompetenzinduktion der für die Klonierungen verwendeten Bakterien erfolgte mittels  $CaCl_2$ -Methode. Die Behandlung mit 2-wertigen Ionen (meist  $Ca^{2+}$ ) befähigt *E. coli*-Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase zur Aufnahme von DNA. Werden behandelte Bakterien mit zirkulärer, superhelikaler Plasmid-DNA inkubiert, kann eine Transformationseffizienz von ca.  $10^6$ - $10^8$  Transformanten pro µg DNA erreicht werden. Für die Herstellung der chemisch kompetenten Bakterien wurde eine Übernachtskultur (DH5α) in 5 ml sterilem LB-Medium bei 37°C unter Schütteln

inkubiert und nach 16 h wurden 100 ml steriles LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte  $(OD)_{600nm}$  von 0,5-0,8 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Bakterien bei 3000 UpM 10 Min. abzentrifugiert und in 20 ml Puffer TFB<sub>1</sub> (4.10.2) resuspendiert. Es folgte die Pelletierung der Bakterien bei 1500 UpM 5 Min. und deren Resuspendierung in 4 ml Puffer TFB<sub>2</sub> (4.10.2). Die kompetenten Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien mit Plasmid-DNA oder dem Ligationsansatz für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2 minütiger Hitzeschock der Bakterien bei 42°C und die Inkubation von 5 Min. auf Eis. Es wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und der Ansatz für 30 Min. bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Proben 2 Min. bei 7000 UpM abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Das Zellpellet wurde resuspendiert und abhängig von der Resistenz des Plasmides auf antibiotikahaltigem LB Agar (mit Kanamycin oder Ampicillin) ausplattiert.

## 5.9 Klonierung von PCR-Produkten

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten zu Sequenzierzwecken erfolgte mittels Topo-TA-Cloning-Kit in den Vektor pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe). Dieses Klonierungssystem arbeitet mit dem Prinzip, daß die Taq-Polymerase terminale Transferaseaktivität besitzt und unabhängig vom Amplifikat am 3' Ende ein einzelnes Adenosin anhängt. Entsprechend ist der linear vorliegende Vektor pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> am 3' Ende mit einem einzelnen Thymidin-Rest ausgestattet, über den das PCR Produkt in den Vektor ligiert werden kann. Das PCR Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt (5.5). Der Ligationsansatz enthielt 1 µl des Ligasemix mit der Vektor-DNA und 5 µl des PCR Produktes und wurde 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zusatz von Stopplösung beendete die Ligationsreaktion. Die Transformation erfolgte in superkompetenten *E. coli*, die vom Hersteller mitgeliefert wurden. Erhaltene Klone wurden mittels Restriktionsenzymverdau (5.6) und PCR (5.11) überprüft.

## 5.10 Ortsspezifische Mutagenese

Der Austausch von Mutationen zur Herstellung der Konsensusklone wurde zum Teil mit dem Site-directed mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam) durchgeführt. Für den Sequenzbereich der auszutauschenden Aminosäure wurden ein passender Sense- u Antisenseprimer synthetisiert, die beide komplementär zueinander waren. Die Primer hatten eine Länge von etwa 40 Basenpaaren, wobei sich die Position der auszutauschenden Aminosäure in der Mitte der Primersequenz befand. Im Verlauf einer PCR erfolgte nach Denaturierung der beiden Plasmidstränge, die Bindung und Elongation der beiden Primer (Tabelle 1 und 2).

Reagenzien	µl
10x Reaktionspuffer	5
Plasmid 50ng	variabel
Antisenseprimer (1µg)	9,7
Senseprimer (1µg)	9,7
dNTP Mix	1
Quicksolution	3
DEPC Wasser	variabel
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase	1
Gesamtvolumen	50

**Tabelle 1: Pipettierschema für die PCR zur ortsgerechten Plasmid-Mutagenese**

95°C	1 Min.	
95°C	50 s	15 Zyklen
60°C	50 s	15 Zyklen
68°C	20 Min.	15 Zyklen
68°C	7 Min	

**Tabelle 2: Temperaturbedingungen für die PCR zur ortsgerechten Plasmidmutagenese (Stratagene, USA)**

Von jedem Ausgangsplasmidstrang wurde ein neuer Komplementärstrang, der die jeweilige Punktmutation enthielt, synthetisiert. Als Enzym für die Amplifikation wurde eine Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität (*Pfu* Turbo DNA Polymerase) verwendet. Die amplifizierte Plasmid-DNA wurde zusammen mit dem Enzym *DpnI* 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Restriktionsenzym,

welches spezifisch nur methylierte DNA-Sequenzen schneidet. Es wurde ein Bakterienstamm verwendet, der die Plasmid-DNA methyliert. Die während der Amplifikation neugebildete Plasmid-DNA war jedoch nicht methyliert. Durch Zugabe dieses Enzyms (DpnI) zum PCR-Ansatz wurde so selektiv das Ausgangsplasmid, das die gewünschte Mutation nicht enthielt, geschnitten. Im Anschluß erfolgte die Transformation der Vektor-DNA in ultrakompetenten Bakterien (XL10-Gold®). Für jede Mutation mußte eine eigene PCR durchgeführt werden und die korrekte Insertion der Punktmutation mußte mittels Sequenzanalyse (5.13) bestätigt werden. Da im Verlauf jeder PCR-Runde das gesamte Plasmid, also auch der gesamte Sequenzabschnitt der HCV-NSP vollständig amplifiziert wurden, mußte anschließend das gesamte Genom der NSP NS2/3-NS5B (6000 bp) noch einmal vollständig sequenziert werden, um Mutationen, die im Verlauf der Amplifikationen entstanden sein könnten, auszuschließen.

### **5.11 Reverse Transkription und Amplifikation der cDNA (RT-PCR)**

Die Synthese von cDNA der aus dem Serum extrahierten HCV-RNA (5.1) erfolgte mit dem „Expand Reverse Transkriptase“ Kit (Roche, Mannheim). Die reverse Transkription wurde in zwei Schritten mit einem Gesamtvolumen von 20 µl (Tabelle 3) durchgeführt. Zu Beginn wurden 3 µl RNA mit 2 µl Antisenseprimer (Endkonzentration 20 pmol) 10 Min. bei 65°C inkubiert. Während dieses Schrittes erfolgte die Auflösung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA mit gleichzeitiger Primeranlagerung. Nach Inkubation wurde der Ansatz unverzüglich auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte der Zusatz von 4 µl 5x Expand RT Puffer, 3,5 µl RNase freies Wasser, 2 µl DTT (100mM), 4 µl dNTPs, 0,5 µl RNase Inhibitor (40U/µl) und 1 µl des Enzym Expand RT (Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus, 50U/µl). Die reverse Transkription erfolgte 1 Stunde bei 42°C mit nachfolgender Lagerung der Proben auf Eis. Im Anschluß wurde eine lange „nested“ PCR unter Verwendung des Expand Long Template PCR System® (Roche, Mannheim) durchgeführt. Sowohl für PCR I als auch für PCR II wurden zwei voneinander getrennte Ansätze vorbereitet. Ansatz 1 enthielt sowohl in PCR I sowie in PCR II den Sense- und Antisenseprimer in einer Endkonzentration von 15 pmol, ferner dNTPs

und RNase freies Wasser sowie unterschiedliche Mengen an cDNA. Ansatz 2 enthielt in PCR I und PCR II den 10x Expand PCR Puffer 3,  $MgCl_2$  in einer Endkonzentration von 3.5 mM, 1  $\mu$ l DMSO und der PCR Polymerase-Mix, eine Zusammensetzung aus *Taq* und *Tgo* Polymerase (3,5 U/ $\mu$ l) (Tabelle 4). Ansatz 1 wurde Ansatz 2 erst kurz vor Start der PCR zugesetzt (Tabelle 5). Im Anschluß an die PCR II wurde die korrekte Länge der Amplifikate mittels Elektrophorese (5.4) überprüft.

RT-1	$\mu$ l
HCV RNA (30 $\mu$ l Extr.)	3
äußerer Antisenseprimer (10 $\mu$ M)	2
Aqua dest. RNase-frei	0
Volumen RT-1	5
Inkubation: 65°C, 10 Min.	
RT-2	$\mu$ l
5x Expand RT Puffer	4
Aqua dest. RNase-frei	3,5
100mM DTT	2
20mM dNTP PCR Grade	4
RNase Inhibitor 40 U/ $\mu$ l	0,5
Expand RT 50 U/ $\mu$ l	1
Volumen RT-2	15,0
Gesamtvolumen	20,0
Inkubation: 42°C, 60 Min.	

**Tabelle 3: Protokoll für die Synthese der cDNA (RT-Schritt) zur Amplifikation des NSP-kodierenden Sequenzabschnittes NS3-NS5B**

PCR I	
Ansatz 1	µl
Aqua dest. RNase-frei	variabel
20mM dNTP	5
äußerer Senseprimer (10µM)	1,5
äußerer Antisenseprimer (10µM)	1,5
cDNA variabel	1-10µl
Volumen Ansatz 1	25

PCR II	
Ansatz 1	µl
Aqua dest. RNase-frei	12
20mM dNTP	5
innerer Antisenseprimer	1,5
innerer Senseprimer	1,5

PCR I	5
Volumen Ansatz 1	25

Ansatz 2	µl
Aqua dest. RNase-frei	16,75
10x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5
DMSO	1
Enzymmix 3,5 U/µl	0,75
Volumen Ansatz 2	25
Gesamtvolumen	50

Ansatz 2	
Aqua dest. RNase-frei	16,75
10x Expand PCR buffer 3	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5
DMSO	1
Enzymmix 3,5 U/µl	0,75

Volumen Ansatz 2	25
Gesamtvolumen	50

**Tabelle 4: Protokoll für die Amplifikation des NSP (NS3-NS5B) kodierenden Sequenzbereich.**

PCR I		
94°C	2 Min.	
94°C	10 s	10 Zyklen
53°C	30 s	10 Zyklen
68°C	6 Min.	10 Zyklen
94°C	10 s	20 Zyklen
53°C	30 s	20 Zyklen
68°C	6 Min+je20s	20 Zyklen

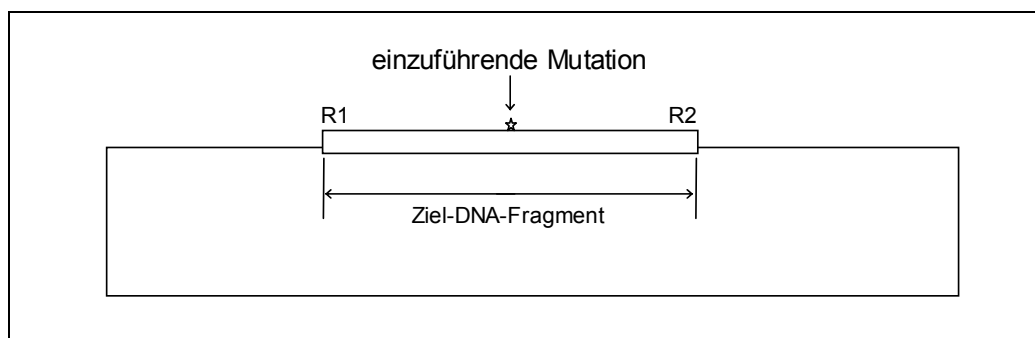
PCR II		
94°C	2 Min.	
94°C	10 s	10 Zyklen
62°C	30 s	10 Zyklen
68°C	6 Min.	10 Zyklen
94°C	10 sec	20 Zyklen
62°C	30 sec	20 Zyklen
68°C	6 Min+je20s	20 Zyklen

**Tabelle 5: Temperaturbedingungen für die Amplifikation des NSP-kodierenden Sequenzabschnittes der beiden HCV-Isolate 2879 und 427**

## 5.12 Die PCR-gestützte Mutagenese

Um einzelne Basenpaare auszutauschen, oder heterologe DNA-Sequenzen miteinander zu verbinden, wurde eine rekombinante „überlappende PCR“ ausgeführt (Abbildung 7). Dafür wurden zuerst zwei voneinander getrennte PCR-Ansätze (PCR 1 und PCR 2) durchgeführt (Abbildung 8). Sowohl für PCR 1 als auch für PCR 2 waren jeweils ein Mutageneseprimer und ein stromaufwärts (PCR 1) bzw. ein stromabwärts (PCR 2) liegender, flankierender Primer erforderlich. Die Mutageneseprimer, die für PCR 1 die Antisensesequenz und für PCR 2 die Sensesequenz enthielten, sind zueinander und zum Sequenzabschnitt im Bereich

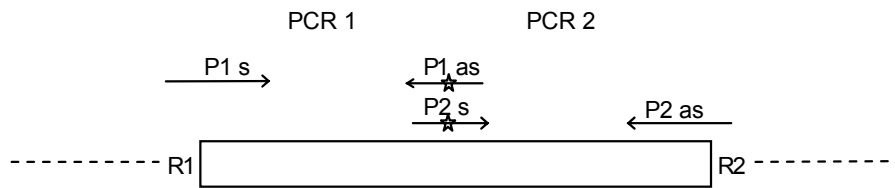
der auszutauschende Base komplementär. Durch den Einsatz der Mutageneseprimer, die in dem zu verändernden Sequenzbereich die gewünschte Nukleotidsequenz aufwiesen, kam es zu einer getrennten Amplifikation von zwei sich partiell überlappenden Sequenzabschnitten (Abbildung 9). Die DNA wurde 1/10 verdünnt in die PCR 1 und 2 eingesetzt (Tabelle 6 und 7). Die Länge der während der Amplifikation entstandenen Fragmente wurde mittels eines analytischen Agarosegels (5.4) kontrolliert und das PCR-Produkt über eine Säule aufgereinigt. Falls weitere unspezifische Amplifikate vorhanden waren, wurde das Fragment mit der erwarteten Größe über ein präparatives Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und aus dem Gel zurückgewonnen (5.5). Anschließend wurde PCR 3 (Abbildung 10) durchgeführt (Tabelle 8 und 9). In diese wurden die Amplifikate aus PCR 1 und 2, abhängig von der Fragmentgröße, in einer Menge von jeweils 1-3 µl eingesetzt. Während PCR 3 erfolgte die Hybridisierung der Fragmente aus PCR 1 und PCR 2 im Bereich der sich überlappenden Sequenzbereiche und die Auffüllung der beiden DNA-Stränge zu einem Amplifikationsprodukt. Es folgte die Aufreinigung des entstandenen Amplifikates über ein präparatives Gel. Das nun vorliegende PCR-Produkt wies die Mutation an der gewünschten Position auf (Abbildung 11).



**Abbildung 7: Plasmidvektor mit dem zu mutierenden Fragment.**

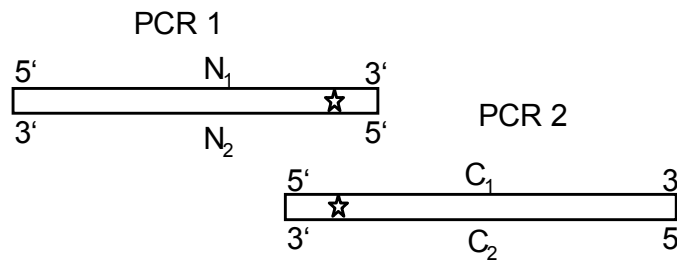
Das Fragment wird über die beiden Restriktionsschnittstellen R1 und R2 in den Vektor kloniert, wobei ★ der gewünschten Mutation entspricht.





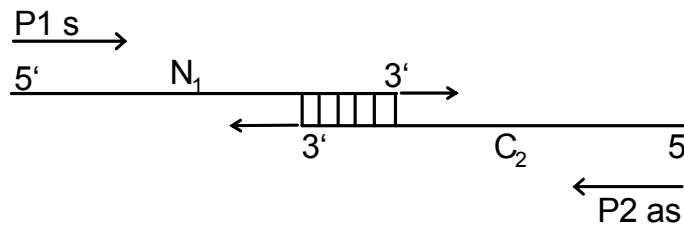
**Abbildung 8: Die Amplifikation mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren zwischen den Restriktionsschnittstellen R1 und R2.**

Die flankierenden Primer sind jeweils außerhalb der Restriktionsschnittstelle lokalisiert, bei den beiden inneren Primern handelt es sich um die Mutageneseprimer, die die gewünschte Mutation aufweisen.

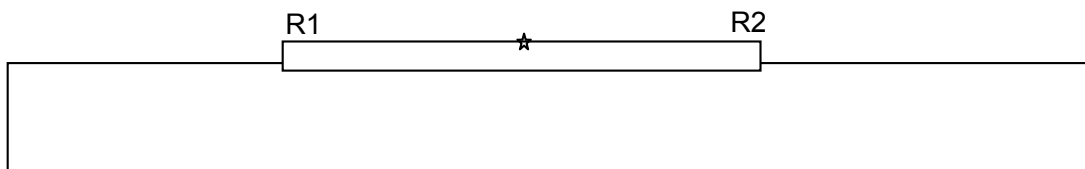


**Abbildung 9: Amplifikation der Regionen zwischen R1 und R2.**

Aus der Amplifikation des Sequenzabschnitts zwischen R1 und R2 gehen zwei unterschiedliche Fragmente hervor, die beide die gewünschte Mutation tragen. Die komplementären Stränge heißen N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>



**Abbildung 10: Denaturierung der beiden Stränge N1-N2 und C1-C2. Hybridisierung und Reamplifizierung der N<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> Paare.**



**Abbildung 11: Restriktion des PCR-Produktes an den Restriktionsschnittstellen R1 und R2 und Klonierung in einen entsprechenden Vektor, der ebenfalls an R1 und R2 geschnitten wurde.**

PCR 1	$\mu\text{l}$	PCR 2	$\mu\text{l}$
ABI-Puffer 10x	5	ABI-Puffer 10x	5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	4	MgCl <sub>2</sub> 25mM	4
Senseprimer	2	Antisenseprimer	2
Mutageneseprimer antisense	2	Mutageneseprimer sense	2
dNTPs 10mM	2	dNTPs 10mM	2
Aqua dest.	31	Aqua dest.	31
DMSO	1	DMSO	1
AmpliTa <sub>q</sub> Gold®	1	AmpliTa <sub>q</sub> Gold®	1
DNA (1/10)	2	DNA (1/10)	2
Gesamtvolumen	50	Gesamtvolumen	50

**Tabelle 6: Pipettierschema für PCR 1 und PCR 2.**

Sowohl für PCR 1 als auch für PCR 2 wurde eine Polymerase ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (AmpliTa<sub>q</sub> Gold® DNA Polymerase) verwendet.

95°C	12 Min.	
95°C	30 s	15 Zyklen
45°C	30 s	15 Zyklen
72°C	90 s	15 Zyklen
72°C	10 Min.	

**Tabelle 7: PCR-Bedingungen für PCR 1 und PCR 2.**

Es wurde eine möglichst geringe Anzahl von Zyklen durchgeführt, um das Auftreten von falsch gepaarten Nukleotiden durch die Taq Polymerase zu verringern. Die Dauer der Elongationszeit mußte an die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes angepaßt werden (1min/1kb)

Ansatz 1	$\mu\text{l}$
Aqua dest	9
dNTP 10mM	4
Antisenseprimer 10 $\mu\text{M}$	3
Senseprimer 10 $\mu\text{M}$	3
Amplifikat von PCR A	4
Amplifikat von PCR B	2
Volumen Ansatz 1	25
Ansatz 2	$\mu\text{l}$
Aqua dest	19,5
10x Buffer mit 20mM MgSO <sub>4</sub>	5
Pwo Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,5
Volumen Ansatz 2	25
Gesamtvolumen	50,0

**Tabelle 8: Pipettierschema der PCR 3.**

Für diese PCR wurde eine Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität verwendet (Proofreadingaktivität).

94°C	2 Min.	
94°C	15 s	15 Zyklen
45°C	30 s	15 Zyklen
72°C	2 Min.	15 Zyklen
72°C	7 Min.	

**Tabelle 9: Temperaturbedingungen für die PCR 3**

### 5.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der unterschiedlichen Klone erfolgte mit der Methode nach Sanger (Abbildung 12). Nach enzymatischer Synthese von DNA-Strängen, die an einem desoxygierenen mit einem Farbstoff markierten Nukleotid abbrechen, können über die Anregung durch einen Laser die synthetisierten unterschiedlich großen Fragmente detektiert werden. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye-System durchgeführt. Bei den modifizierten Nukleotiden handelt es sich um sogenannte 2',3'-Dideoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs) die am 3'C-Atom statt einer OH-Gruppe ein Wasserstoffatom gebunden haben. Dadurch wird im Verlauf der DNA-Synthese nach Einbau eines modifizierten Nukleotids die Verlängerung des DNA-Stranges abgebrochen, da die Bildung einer Phosphodiesterbindung am 3'C-Atom verhindert wird. Zusätzlich ist jedes der vier modifizierten Nukleotide mit einem spezifischen Farbstoff markiert, der nach Anregung durch einen Laser Licht von jeweils unterschiedlicher Wellenlänge aussendet. Der Reaktionsansatz für die enzymatische Synthese der unterschiedlich langen DNA-Fragmente enthält neben den modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden auch eine Taq-Polymerase. Der Anteil an modifizierten Nukleotiden verglichen zum Gesamtanteil an Nukleotiden beträgt etwa 1%.

Zu 4 µl Sequenziermix wurden 0,5 µl Primer und 4 µl Plasmid pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierungs-PCR wurde wie folgt durchgeführt: 2 Min. 95°C, 30 Zyklen mit 30 s 95°C (Denaturierung), 15 s 45°C (Primerbindung), 4 Min. 60°C (Elongation), mit anschließendem Abkühlen auf 4°C. Ein weiterer Reaktionsansatz wurde mit der halben Menge an ddNTPs durchgeführt, wobei zu 2 µl Sequenziermix, 0,5 µl Primer

und 2 µl Plasmid zupipettiert wurden und der Reaktionsansatz mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 12 µl aufgefüllt wurde. Die PCR-Bedingungen unterschieden sich nicht von oben genanntem Protokoll.

Um nach der Sequenzierungs-PCR die verbleibenden ddNTPs zu entfernen, wurde mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) gearbeitet. Über Gelfiltration mit zwei Zentrifugationsschritten wurden die während der Sequenz-PCR nicht eingebauten ddNTPs entfernt, da sie bei der nachfolgenden Analyse störten. Für die Aufreinigung der Proben wurden die Säulchen durch Zentrifugation bei 2700 UpM 3 Min. aktiviert. Die Proben der Sequenz-PCR wurden auf die trockene Säulchen pipettiert und diese ein weiteres Mal bei 2700 UpM 3 Min. lang zentrifugiert. Der Durchfluß konnte dann direkt für die Analyse der Nukleotidsequenz verwendet werden.

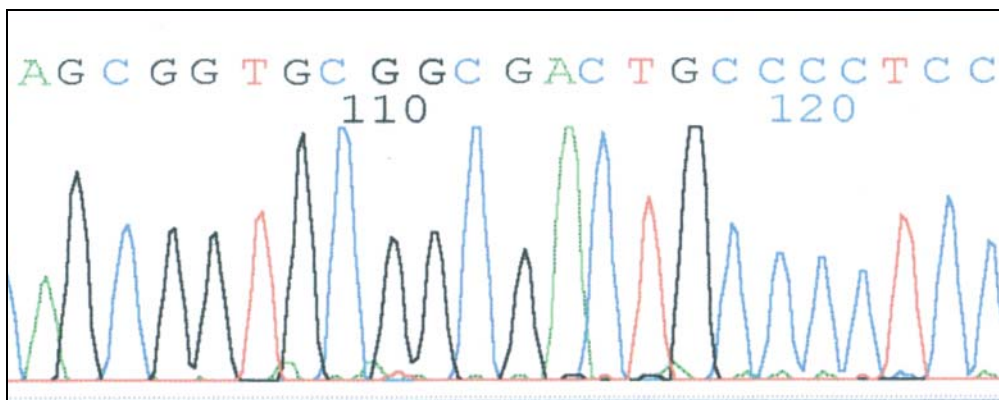


Abbildung 12: Sequenzanalyse der HCV NS-Gene für die Generierung der Konsensusklone

#### 5.14 Trypsinierung der Zellen nach G418-Selektion und Gesamt-RNA Präparation

Um die G418-resistenten Zellen auf HCV-RNA zu untersuchen, wurden diese bis zu einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  kultiviert. Nach Erreichen der oben genannten Zelldichte wurden die Zellen 1x mit PBS Lösung gewaschen und trypsinisiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Für die Präparation der Gesamt-RNA wurde das auf  $-80^\circ\text{C}$  gelagerte Zellpelett in 750 µl GITC (Guanidinisoithiocyanat)-Lösung resuspendiert, und die DNA geschert. Nach

Zugabe von 75  $\mu$ l 2 M NaAc (pH 4.0), 750  $\mu$ l wassergesättigtes saures Phenol und 150  $\mu$ l Chloroform wird der Ansatz kräftig vermischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben 15 Min. lang bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde der wäßrige Überstand (max. 750  $\mu$ l) abgenommen, die RNA durch Zusatz von Isopropanol pelletiert und für 15 Min. bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 200  $\mu$ l 80% Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet kurz getrocknet und die RNA in 30  $\mu$ l Aqua dest. (DEPC behandelt) gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der Proben photometrisch gemessen (5.15) und die RNA bei -80°C gelagert.

### 5.15 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der DNA bzw. RNA erfolgte durch spektrophotometrische Messungen der Adsorption (A) von isolierten Nukleinsäuren bei 260 nm. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Adsorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten durchgeführt. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gibt an, in wie weit die Lösung noch mit Phenol- oder Proteinresten verunreinigt ist. Es sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Für die Konzentrationsermittlung wurde von folgenden Richtwerten ausgegangen:

dsDNA: 1  $A_{260\text{nm}} \approx$  50  $\mu\text{g/ml}$

RNA: 1  $A_{260\text{nm}} \approx$  40  $\mu\text{g/ml}$

### 5.16 *In vitro* Transkription

Vor Herstellung der RNA-Transkripte über einen T7-Promotor erfolgte ein Doppelverdau der Plasmid-DNA mit AseI und ScaI. Neben einer Linearisierung des Konstruktes (AseI) wurde die HCV-Sequenz am exakten Ende der 3'NTR

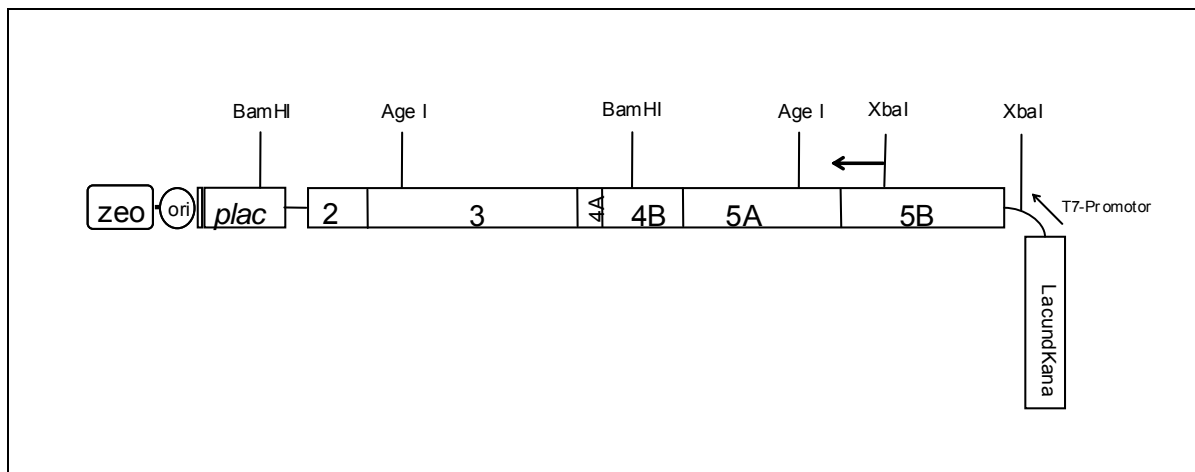
geschnitten (ScaI). Für den Restriktionsansatz wurden 5 µg des Plasmids eingesetzt. Der vollständige Restriktionsenzymverdau (5.6) der DNA-Fragmente wurde mittels Elektrophorese (5.4) überprüft. Die DNA wurde zweimal mit TE-gesättigtem Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1/10 Vol. NaAc und 2,5 Vol. 100% Ethanol zugesetzt. Die DNA wurde 30 Min. bei -80 °C gefällt und 15 Min. bei 13000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und die DNA in 50 µl Aqua dest. gelöst. Der Transkriptionsansatz setzte sich aus 20 µl 5xRRL Puffer (4.10.5), 12,5 µl NTPs (25mM) und 2,5 µl RNasin (1U/µl) zusammen und wurde auf 50 µl mit RNase-freiem Aqua dest. aufgefüllt. Die gesamten 50 µl der gelösten DNA wurden für die Herstellung der RNA-Transkripte eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 2 µl T7-RNA-Polymerase (15U/µl) bei 37°C 2 h inkubiert. Es wurden weitere 1 µl T7-RNA-Polymerase zugesetzt und es folgte eine zweite Inkubation für 2 h bei 37°C. Durch Zugabe von 7,5 U RNase-freier DNase und 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die verbleibende Plasmid-DNA verdaut. Der letzte Schritt sollte vor allem dazu dienen, residuale Plasmid-DNA zu entfernen und auf diese Weise eine Integration von DNA in das Genom der transfizierten Zellen zu verhindern. Nach dem letzten Inkubationsschritt erfolgte die Aufreinigung der *in vitro* Transkripte. Dem Ansatz wurden 60 µl 2 M Na Acetat pH 4,7, 400 µl (2/3 Vol) wassergesättigtes Phenol zugesetzt und mit Aqua dest. auf 600 µl aufgefüllt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Die Proben wurden 10 Min. bei 4°C und 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurde das gleiche Volumen Chloroform zugesetzt und nach kräftigem Vortexen 3 Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Die RNA aus dem Überstand wurde mit 100% Isopropanol gefällt, wobei die Menge an Isopropanol mindestens die 0,7 fache Menge des Überstandes, der abgenommen wurde, betragen mußte. Nach Fällung der RNA wurde diese ein weiteres Mal 15 Min. bei 13000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl Aqua dest. gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die richtige Länge der RNA mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese (5.18) überprüft.

## 5.17 Sondenherstellung und Austestung für den Northern-Blot

Sowohl für die Herstellung der Sonde als auch für die Northern-Blot-Analyse wurde mit dem DIG Northern Starter (Roche, Mannheim) gearbeitet. Für die Herstellung der Sonde wurde ein Nukleotidtriphosphatmix (Labelingmix) verwendet. Dieser Labelingmix bestand aus einem Gemisch von Nukleotidtriphosphaten, von denen die Uridintriphosphate eine Digoxigenin(DIG)-Markierung aufwiesen. Die Detektion der hybridisierten Sonde erfolgte mittels spezifischem Antikörper gegen die DIG-Markierung, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war (Antidigoxigenin AP). Durch Inkubation des Blots mit einem für die alkalische Phosphatase spezifischen Chemiluminiszenzsubstrat (CDP-Star) kann der spezifisch gebundene Antikörper sichtbar gemacht werden.

Bei HCV handelt es sich um ein RNA-Virus mit positiver Orientierung. In einer mit HCV infizierten Zelle überwiegt RNA mit positiver Orientierung im Gegensatz zu RNA mit negativer Orientierung. Daher wurde für den Nachweis der HCV-Sequenz in den HuH-7 Zellen eine Sonde mit negativer Orientierung hergestellt. Da es sich bei diesem Replikon um HCV-RNA des Genotyps 3a handelte, wurde eine Sonde hergestellt, die spezifisch für diesen Genotyp war. Für die Herstellung der Sonde wurde mit dem Konstrukt TOPO NS2/NS3-NS5B-2879-con gearbeitet. Dieser Vektor ist am 3' Ende mit einem T7-Promotor ausgestattet, über den die HCV-Sequenz in RNA umgeschrieben wurde. Da sich jedoch in diesem Konstrukt die Konsensussequenz der NSP in 3'-5' Orientierung befand, mußte vor Herstellung der Sonde die 3a-Konsensussequenz in 5'-3' Orientierung in den Vektor kloniert werden, sodaß im Verlauf der Transkription über den T7-Promotor eine Sonde mit negativer Orientierung hergestellt werden konnte. Die geeignete Länge einer Sonde für die Hybridisierung beträgt etwa 200-1000 Nukleotide. Für die Herstellung einer Sonde in 5'-3' Orientierung wurde ein Sequenzbereich innerhalb der Konsensussequenz mit geeigneter Länge in den Topo XI Vektor kloniert (Abbildung 13). Für die Herstellung von RNA-Transkripten wurden 6 µg des Plasmids am 5' Ende mit Agel linearisiert (5.6). Vor Herstellung der Sonde mußte die DNA phenolysiert werden. Die Phenolysierung der Sonde erfolgte durch Zusatz von Phenol-Chloroform im Verhältnis 1:1 zum Restriktionsenzymverdau (200 µl Phenol- Chloroform zu 200 µl Restriktionsansatz) und die Zentrifugation bei 13000 UpM für 3 Min. Anschließend

wurde der Überstand abgenommen und es wurden erneut 200 µl Phenol-Chloroform zugesetzt gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 UpM, 3 Min.). Für die Fällung der DNA wurde der gesamte Überstand abgenommen, 0,1 Vol 3M NaAc und 2,5 Vol an 100% Ethanol zugesetzt. Die DNA wurde ½ Stunde bei -80°C präzipitiert und bei 13000 UpM 10 Min. pelletiert.



**Abbildung 13: Vektor für die Herstellung der Sonde für die Northern-Hybridisierung.**

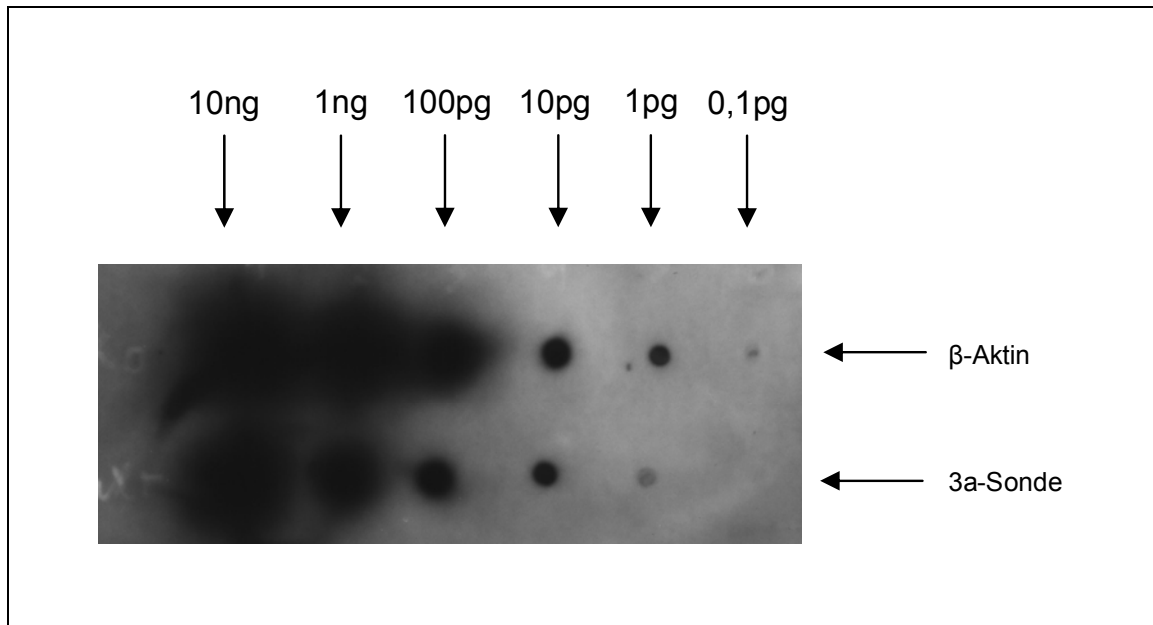
Im Verlauf der Umklonierung wurde für die Generierung des Vektors das Konstrukt pCR XL TOPO NS2/NS3-NS5B-2879-con mit BamHI und XbaI enzymatisch verdaut, wobei diese Enzyme in oben genanntem Konstrukt zweimal schnitten. Eine der beiden BamHI Schnittstellen befand sich im vorderen Bereich des Vektors und eine weitere im NS4B Gen. Schnittstellen für XbaI waren im Konstrukt ebenfalls doppelt vorhanden, am Beginn von NS5B und im hinteren Bereich des Vektors. Durch geeigneten Restriktionsenzymverdau des Plasmids pCR XL TOPO NS2/NS3-NS5B-2879-con mit BamHI und XbaI wurde der Sequenzbereich zwischen der BamHI Schnittstellen im NS4B Protein und der XbaI Schnittstelle am Beginn des NS5B Proteins in 5'-3' Orientierung in den Vektor kloniert. Die Lokalisation der Sonde ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, und ein weiteres Mal (13000 UpM, 5 Min.) zentrifugiert. Abschließend wurde der gesamte Restalkohol entfernt, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 10 µl Aqua dest. gelöst. Für die Reaktion wurden 1 µg DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 4 µl Labelingmix, 4 µl Transkriptionspuffer und 2 µl T7-RNA-Polymerase zusammen. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurden 2 µl DNase hinzupipettiert und 15 Min. bei 37 inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgte mit 2 µl 0,2 M EDTA Lösung (pH 8.0).

Um die Effizienz der Sonde zu überprüfen, erfolgte die Verdünnung der RNA-Transkripte in 10er Schritten bis zu einer Konzentration von 0,1 pg/µl. Von jeder



Verdünnung wurden 1µl auf eine Membran aufgetragen und 30 Min. bei 120°C gebacken. Die Membran wurde 30 Min. mit Block-Lösung inkubiert und weitere 30 Min. mit dem Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Verdünnung 1:10000) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen jeweils für 30 Min. erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit einem Detektionspuffer bei pH 9,5. Die Membran wurde in eine Filmkassette gelegt, mit CDP-Star Lösung beschichtet und 5-20 Min. belichtet (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Dot-Blot Analyse zur Überprüfung der Effizienz der für den Nachweis von Replikon-RNA hergestellten Genotyp-3a-spezifischen Sonde.**

In der oberen Reihe wurde eine Sonde gegen β-Aktin (Roche, Mannheim) zur Kontrolle in einer Verdünnungsreihe von 10 ng bis 0,1 pg auf die Membran aufgetragen. In der unteren Reihe vergleichend dazu die Genotyp 3a spezifische Sonde gegen das NS5B Gen in denselben Verdünnungen. Von jeder Verdünnung wurden 1µl auf die Membran aufgetragen. Die Zahlen über der Abbildung geben die Mengen der beiden Sonden, die auf die Membran aufgetragen wurden an. Die Detektion der Signale erfolgte wie unter 5.18 beschrieben.

Für die Hybridisierung des Neomycinresistenzgens wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde gearbeitet. Der Transkriptionsansatz zur Herstellung von Sonden enthielt 4µl 5x Transkriptionspuffer (Promega); 2µl 100 mM DTT; 0,5 µl rRNasin (Promega, 20U); je 1mM ATP/UTP/GTP; 10µM CTP; 0,5 µg DNA; 50 µCi -α<sup>32</sup>P]-CTP; 1µl T7-oder T3-RNA-Polymerase (Promega, 40U/µl) in einem Gesamtansatz von 20µl. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert, danach 1U DNase RQ (Promega) zugegeben und weitere 30 Min. bei 37°C gehalten. Die Transkripte wurden aufgereinigt und in die Hybridisierung eingesetzt.

## 5.18 Northern-Blot zum Genotyp-spezifischen Nachweis der HCV-RNA

Für den Northern-Blot wurde ein Formaldehydgel vorbereitet. Es wurden 1g Agarose in 10 ml 10x MOPS-Acetat-Puffer und 75 ml mit DMPC behandeltes Aqua dest. (4.10.4) eingewogen und unter kurzem Aufkochen in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen der Agarose auf 60°C und Zusatz von 10 ml Formaldehyd, erfolgte das Gießen der Agarose. Die Proben wurden mit 2-3 fachem Volumen an Ladepuffer versetzt und das RNA-Puffer Gemisch 10 Min. bei 65°C denaturiert und unverzüglich auf Eis gelagert. Der gesamte Probenansatz wurde auf das Gel aufgetragen, wobei vermieden werden sollte, daß die Menge an Gesamt-RNA mehr als 1µg beträgt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Acetat-Laufpuffer (4.10.3) mit 4V/cm. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel in mit DMPC behandeltem Aqua dest. gespült und zweimal für 15 Min. in 20x SSC gewaschen. Das Blotten erfolgte für 8 Stunden in 20 fachem SSC Puffer (Abbildung 15).

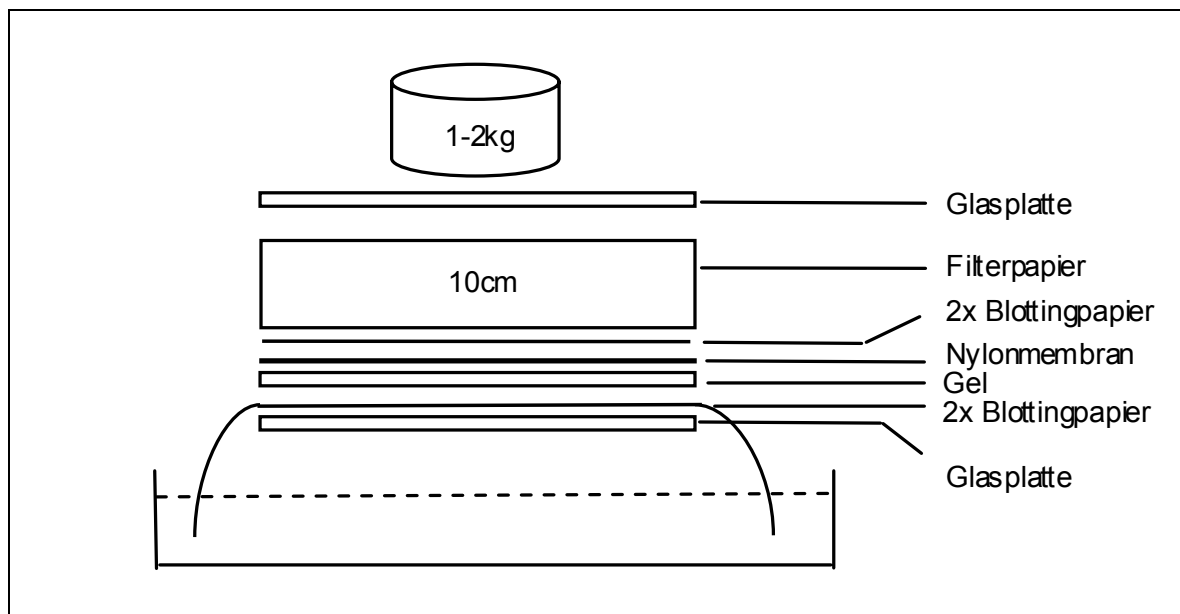


Abbildung 15: Aufbau der Apparatur für das Blotten der RNA für den Northern-Blot

Anschließend wurde die Nylonmembran bei 120°C 30 Min. lang gebacken. Für die Prähybridisierung, um alle unspezifischen Bindungen abzusättigen, wurde die Membran in einem Hybridisierungsbeutel (Roche, Mannheim) mit 10-15 ml DIG-Easy Hyb Prähybridisierungslösung (4.10.3) 30 Min. in einem 68°C warmen

Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Es mußte darauf geachtet werden, daß der Hybridisierungsbeutel dicht verschlossen und vollständig mit Wasser bedeckt war. Ferner war es wichtig, daß sich in diesem Hybridisierungsbeutel keine Luftblasen befanden, da sonst die Membran nicht vollständig mit Prähybridisierungslösung bedeckt war. Für die anschließende Hybridisierung mußte die DIG-markierte RNA Sonde 5 Min. gekocht (95°C) und sofort in Eiswasser überführt werden. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen. Für die folgende Hybridisierung wurde dieselbe Lösung, mit der die Prähybridisierung erfolgte, in den Hybridisierungsbeutel gefüllt, wobei bei diesem Schritt die Sonde zugesetzt werden mußte. Die Hybridisierung der im Hybridisierungsbeutel eingeschweißten Membran erfolgte über Nacht bei 68°C in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln. Es mußte wieder darauf geachtet werden, daß der Hybridisierungsbeutel dicht verschlossen war. Nach der Hybridisierung wurde die Membran bei Raumtemperatur in 2x SSC mit 0,1% SDS gewaschen, wobei die folgenden Waschschrte auf dem Schüttler durchgeführt wurden. Es folgten 2 weitere Waschschrte 15 Min. bei 68°C in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS unter ständigem Schütteln im Wasserbad. 1-2 Min. wurde mit Waschpuffer (Maleinsäure und NaCl) und weitere 30 Min. mit 100 ml Block-Lösung gewaschen, um alle unspezifischen Bindungen abzusättigen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Antikörper gegen die DIG markierte Sonde, der gleichzeitig mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war (Antidigoxigenin AP) und der spezifisch an die hybridisierte Sonde band. Anschließend erfolgten 2 weitere Waschschrte für jeweils 15 Min. mit Waschpuffer, und ein 5 minütiger Waschschrte mit Detektionspuffer (pH 9,5). Abschließend wurde die Membran in eine Entwicklerkassette zwischen 2 Plastikfolien gelegt und mit CDP-Star (Roche, Mannheim), das Chemiluminiszenzsubstrat für die Alkalische Phosphatase, beschichtet und 5-20 Min. belichtet.

### **5.19 RNA-Transfektion und Passage der transfizierten Zellen**

Die Transfektion der RNA-Transkripte erfolgte mittels Elektroporation. Für die Vorbereitung der Zellen wurden HuH-7 Zellen (Monolayer) mit 1x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden mit DMEM versetzt und bei

---

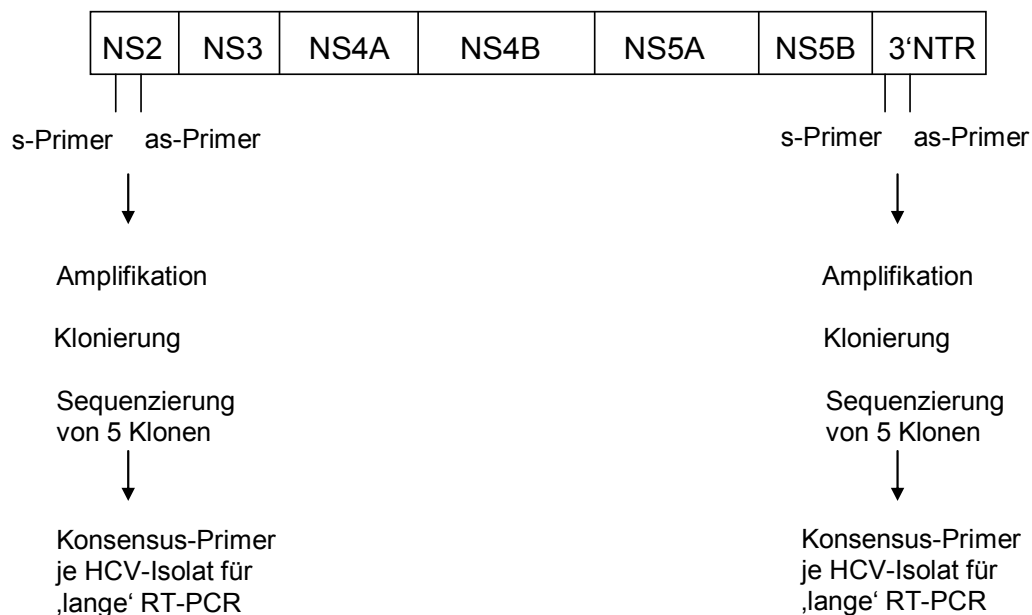
400 xg für 5 Min. sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Cytomix (4.10.5) resuspendiert. Für die Transfektion der HuH-7 Zellen wurden  $4 \times 10^6$  Zellen mit  $1 \mu\text{g}$  RNA gemischt. Der Reaktionsansatz wurde in eine  $0,4 \times 0,4$  cm Küvette (Biorad, München) pipettiert und die Zellen wurden bei  $960 \mu\text{F}$  und  $270$  Volt mit dem Elektroporator (Biorad, München) elektroporiert, wobei die Pulszeit  $20$  ms betrug. Nach Elektroporation wurden die Zellen unmittelbar in  $8$  ml DMEM mit  $1,25\%$  DMSO transferiert und auf  $3 \times 10$  cm Platten verteilt. Nach  $24$  Stunden wurde mit der Selektion der Zellen unter G418 begonnen. Die Zellen wurden durch Zugabe des Antibiotikums zum Nährmedium mit jeweils  $1000 \mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$ ,  $250 \mu\text{g/ml}$  Geneticin selektioniert. Ein Mal pro Woche wurde das Medium gewechselt, da das Antibiotikum bei  $37^\circ\text{C}$  eine Woche lang stabil war. Bei Bildung von Kolonien wurden diese mit Trypsin von der Platte gelöst, bis zu einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen weiterkultiviert und mittels RT-PCR (5.11) und Northern-Blot (5.18) analysiert

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Die Amplifikation des NS3-NS5B HCV-Genomabschnittes der Isolate 427 und 2879

#### 6.1.1 Herstellung spezifischer Primer

Für die Herstellung der Replikonkonstrukte mit replizierenden subgenomischen Abschnitten des HCV mußte der gesamte Sequenzabschnitt von NS3 bis NS5B der Isolate 2879 und 427 amplifiziert werden (5.11). Dabei handelt es sich um eine Sequenz mit einer Länge von ca. 6000 Nukleotiden. Eine direkte Amplifikation dieses langen Sequenzabschnittes war nur mit einer speziellen „langen RT-PCR“ möglich.



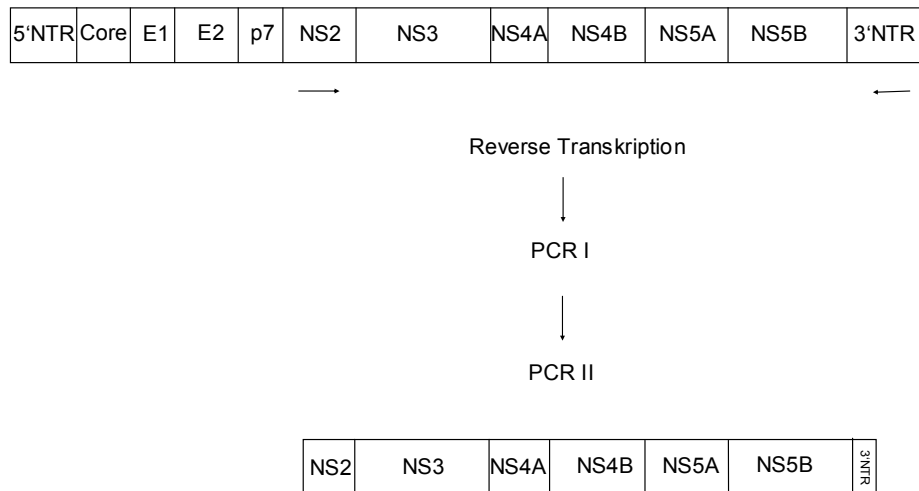
**Abbildung 16: Herstellung der Konsensusprimer.**

Für die Herstellung der Konsensusprimer für die RT-PCR zur Amplifikation des NSP kodierenden Abschnittes NS3-NS5B der Isolate 427 und 2879 wurde jeweils ein Abschnitt innerhalb von NS2 bzw. 3'NTR unter Verwendung eines Antisense (as)- bzw. Sense (s)-Primers amplifiziert. Das Amplifikat wurde kloniert und von jeweils 5 Klonen erfolgte die Analyse der Nukleotidsequenz. Nach Sequenzvergleich der analysierten Klone wurde die Konsensussequenz innerhalb der Region (NS2 bzw. 3'NTR), in denen die Primer für die RT-PCR binden, ermittelt.

Für die Amplifikation der NSP-kodierenden Region mußten spezifische Primer hergestellt werden, die im Bereich von NS2 und NS5B/3'NTR hybridisierten. Aus diesem Grund wurde von beiden Isolaten zunächst der Sequenzbereich von NS2 bzw. der 3'NTR, in denen die Primer für die RT-PCR binden sollten, amplifiziert und kloniert (Abbildung 16). Es wurde von jedem der beiden Isolate die Nukleotidsequenz von 5 Klonen der oben genannten Sequenzabschnitte analysiert und deren Konsensussequenz ermittelt. Auf Basis dieser Konsensussequenz bzw. ihrer vollständig konservierten Bereiche wurden jeweils zwei spezifische Sense- und Antisenseprimer für die Amplifikation des gesamten HCV NS3 bis NS5B Abschnitts in einer ‚nested‘ PCR generiert.

### **6.1.2 Etablierung der „langen RT-PCR“**

Nach Generierung der Konsensusprimer (4.5.2) für die RT-PCR erfolgte die Amplifikation des NSP-kodierenden Sequenzbereiches der HCV-Isolate 2879 und 427 (Abbildung 17). Da die genaue Primerbindungssequenz aufgrund des Auftretens einer Vielzahl von unterschiedlichen Quasispezies innerhalb eines Patienten nicht bekannt war, wurden verschiedene Primersequenzen ausgetestet. Ferner mußten für eine erfolgreiche Amplifikation neben der Verwendung der passenden Primer weitere Parameter der PCR optimiert und an die HCV-Sequenzeigenschaften angepaßt werden. Problematisch war das Auftreten von Sekundärstrukturen innerhalb komplementärer Sequenzabschnitte der zu amplifizierenden HCV-RNA. Notwendig erwies es sich vor Synthese der cDNA die RNA und den Antisenseprimer bei 65°C 10 Min. lang zu inkubieren und der Reaktion DMSO zuzusetzen. So konnten Sekundärstrukturen innerhalb des HCV-Genoms reduziert werden. Ein weiterer kritischer Punkt dieser RT-PCR war beispielsweise eine optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration. Bei der Amplifikation solcher langer Sequenzabschnitte ist für die Ermittlung der Konsensussequenz der NS3-NS5B-Region eine möglichst niedrige Fehlerrate beim Nukleotideinbau durch die Polymerase erwünscht. Daher wurde für die Synthese der DNA eine Polymerase verwendet, die eine 3'-5' Exonukleaseaktivität aufwies, um nicht komplementär eingebaute Nukleotide korrigieren zu können.

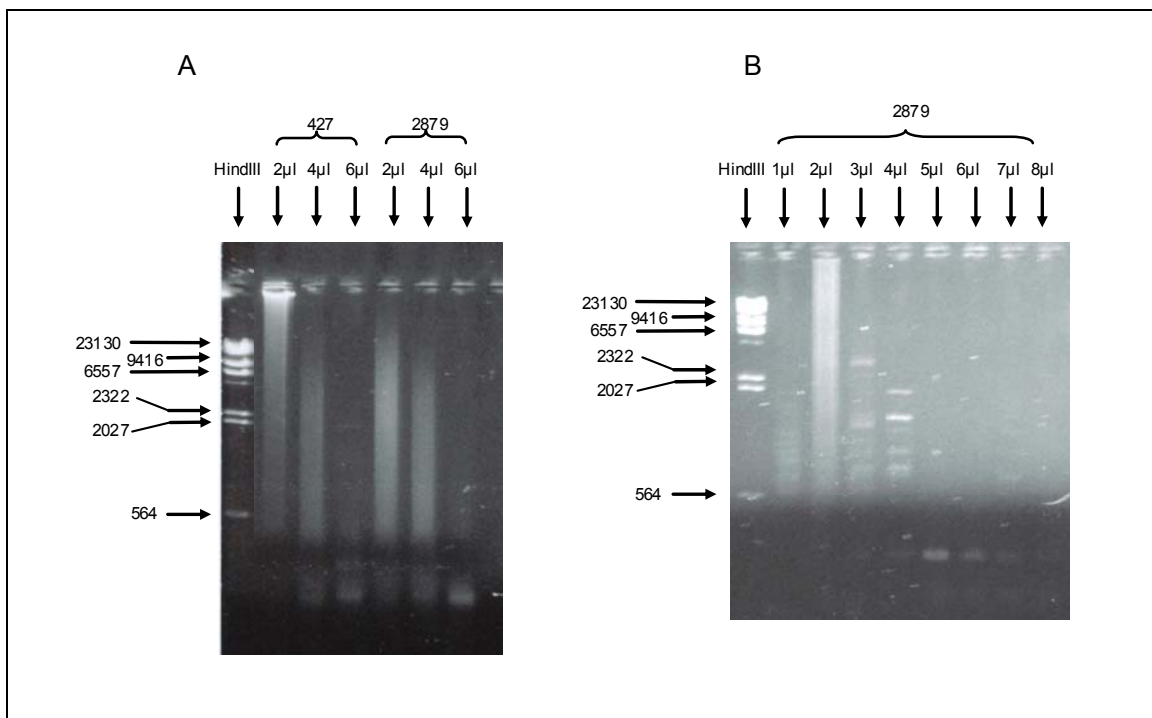


**Abbildung 17: Amplifikation des NSP-kodierenden Genomabschnittes.**

Für die Synthese der cDNA während der reversen Transkription wurde der Antisenseprimer eingesetzt. Die Amplifikation des gesamten HCV-Genomabschnitts NS3-NS5B erfolgte unter Verwendung von Sense- bzw. Antisenseprimer, die auf Basis der Konsensussequenz innerhalb der NS2- bzw. 3'NTR-Region hergestellt wurden.

Das verwendete Temperaturprogramm für die cDNA-Synthese und PCR (5.11) mußte nach folgenden Kriterien optimiert werden:

Neben der Generierung der Primer auf Basis der Konsensussequenz mußte die Temperatur ermittelt werden, die eine spezifische Bindung der Primer an die Zielsequenz ermöglichte. Die Elongationszeit mußte an die Länge der zu amplifizierenden Fragmente angepaßt werden. Da die Aktivität der Polymerase aufgrund der wiederholten Denaturierung während der PCR abnimmt, wurde die Elongationszeit in der 2. Hälfte der PCR pro Zyklus um 20 s verlängert, um die vollständige Synthese der langen PCR-Fragmente zu gewährleisten. Vor Optimierung der einzelnen PCR-Bedingungen wurden neben unspezifischen zu kurze Amplifikate synthetisiert. Ebenso führte sowohl bei Isolat 2879 als auch bei Isolat 427 der Einsatz unterschiedlicher cDNA-Volumina (1-8µl) in die PCR I zu keiner vollständigen Amplifikation des NSP-kodierenden Genomabschnittes (Abbildung 18).

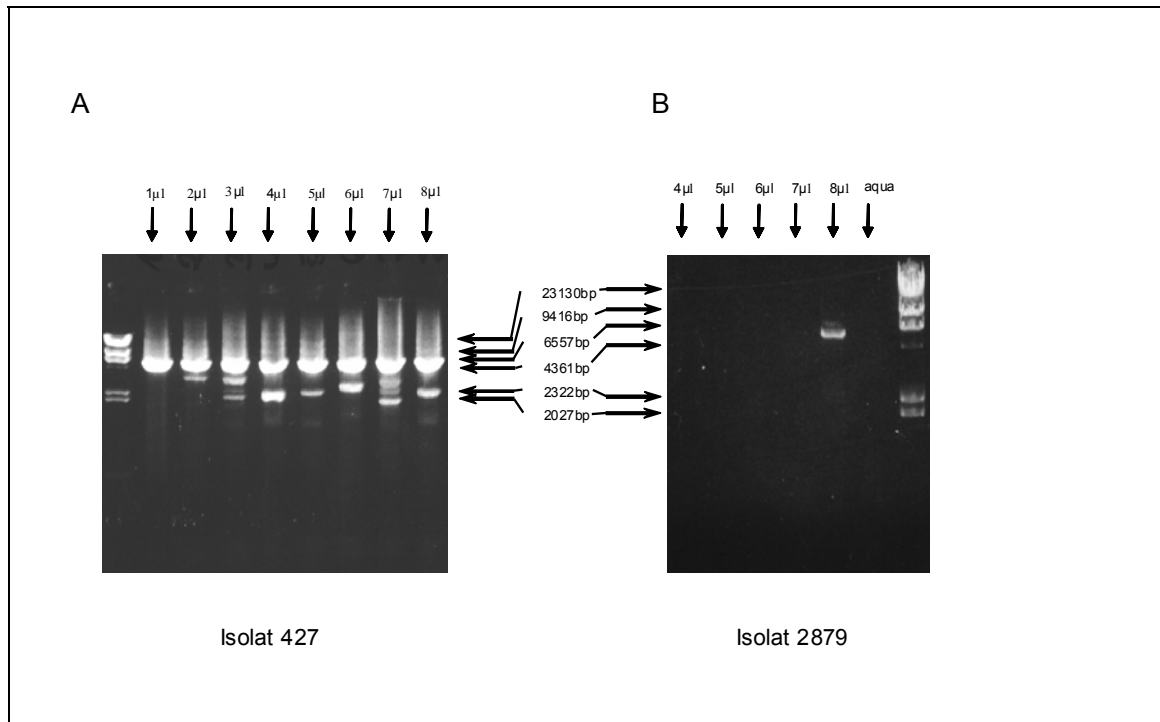


**Abbildung 18: Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate (NS3-NS5B) aus der RT-PCR der HCV-Isolate 2879 und 427.**

3 µl des Amplifikates wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x TBE Puffer bei 90 Volt für 1h. Die aus dem Serum extrahierte RNA wurde unverdünnt in der reversen Transkription eingesetzt. A bzw. B zeigt das Agarosegel für die Amplifikation des die NSP (NS3-NS5B) kodierenden Sequenzbereiches der Isolate 427 und 2879. Die Zahlen über den Spuren bezeichnen die Mengen an cDNA, die in die PCR I transferiert wurden. Weitere PCR-Bedingungen sind unter 5.11 angegeben. Die Pfeile auf der linken Seite der beiden Bilder kennzeichnen die Fragmentgrößen des DNA-Molekulargewichtsstandards, der zur Größenbestimmung aufgetragen wurde.

Erst durch Reduktion der eingesetzten, aus dem Patientenserum extrahierten HCV-RNA gelang die vollständige Amplifikation des NSP-kodierenden Sequenzabschnittes der HCV-Isolate 427 und 2879. Bei Isolat 427 führte der Einsatz unterschiedlicher Mengen an cDNA, die in die PCR I eingesetzt wurden, zu einer Amplifikation des gesamten NSP-kodierenden Sequenzbereiches (Abbildung 19). Für eine erfolgreiche Amplifikation des NSP-kodierenden Sequenzbereiches von Isolat 2879 wurden die Primer von Isolat 427 verwendet. Für die RT-PCR des Isolates 2879 wurde die aus dem Serum extrahierte RNA-Menge ebenfalls reduziert. Wie bei Isolat 427 erfolgte eine Titrierung der cDNA. Im Gegensatz zu Isolat 427 führte lediglich der Einsatz von 8 µl cDNA in der PCR I zu einer Amplifikation des gesamten zu amplifizierenden Sequenzabschnittes (Abbildung 19).





**Abbildung 19: Elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate aus der RT-PCR der HCV-Isolate 427 und 2879.**

3µl des Amplifikates wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x TBE Puffer bei 90 Volt für 1h. Für die reverse Transkription wurde die eingesetzte RNA-Menge reduziert. A bzw. B zeigt das Agarosegel für die Amplifikation des die NSP (NS3-NS5B) kodierenden Sequenzbereiches der Isolate 427 und 2879. Die Zahlen über den Spuren bezeichnen die Mengen an cDNA, die in die PCR I transferiert wurden (5.11). Die Pfeile in der Mitte kennzeichnen die Fragmentgrößen des DNA-Molekulargewichtsstandards, der zur Größenbestimmung aufgetragen wurde.

## 6.2 Sequenzierung der Isolate 427 und 2879 und Ermittlung der Konsensussequenzen

Agrund der hohen Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerase besteht die Möglichkeit, daß es während der Replikation zur Synthese replikationsdefekter HCV-RNA kommt. Zudem besteht während der Amplifikation langer Sequenzbereiche die Möglichkeit des Einbaus nicht komplementärer Nukleotide durch die DNA-Polymerase. Ziel ist also, die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, daß der Herstellung der Replikonkonstrukte replikationsdefiziente Sequenzen zugrunde gelegt werden. Dazu wurde der amplifizierte Bereich NS3-NS5B in den Vektor pCR®-XL-Topo® ligiert (Abbildung 4). Von beiden Isolaten 427 und 2879 wurden 4 Klone ausgewählt und deren Sequenz analysiert. Es wurden

Senseprimer basierend auf der 3a-Prototypsequenz im Abstand von 300 bp generiert, wobei sich die zu sequenzierenden Abschnitte überlappten (4.5.3). Für die Sequenzbereiche, die mit den jeweiligen Senseprimer nicht erfolgreich sequenziert werden konnten, wurden entsprechende Antisenseprimer ebenfalls auf Basis der 3a-Prototypsequenz synthetisiert (4.5.3). Die Nukleotidsequenz des HCV-Genomabschnitts NS3-NS5B wurde für alle vier Klone beider HCV-Isolate in die Aminosäuresequenz übersetzt (Abbildung 20).

427-1	QTFLGTTVGGVMWTVYHGAGSRTLAKHPALQMYTNVDQDLVGPAPP
427-2	--F-----AK-----S-----
427-3	--L-----AT-----N-----
427-4	--F-----TK-----N-----
427con	QTFLGTTVGGVMWTVYHGAGSRTLAKHPALQMYTNVDQDLVGPAPP

**Abbildung 20: Vergleich eines Sequenzabschnittes der 4 sequenzierten Klone am Beispiel von Isolat 427 (427-1 bis 427-4) einschließlich der ermittelten Konsensussequenz (427con).** Nach vollständiger Analyse der Nukleotidsequenz des gesamten Genomabschnittes NS3-NS5B der 4 Klone des 3a-Isolates 427 erfolgte deren Translation in die Aminosäuresequenz und die Ermittlung der Konsensussequenz. Bei einer Aminosäureabweichung innerhalb der Sequenz eines Klons von der Konsensussequenz wurde die AS gewählt, die bei allen übrigen 3 Klonen übereinstimmte. Bei Übereinstimmung von jeweils zwei Aminosäuren wurde für die Herstellung des Konsensusklones 427con1 eine der beiden übereinstimmenden AS per Zufall bzw. auf Grundlage von Prototypsequenzen ausgewählt. Ebenso wurde zur Ermittlung der Konsensussequenz des HCV-Isolates 2879 verfahren (2879con1).

Die Aminosäuresequenzen der 4 Klone beider HCV-Isolate wurden miteinander verglichen und die entsprechende Konsensussequenz ermittelt. Bei Abweichung einer AS bei einem der 4 Klone entschied man sich für die AS der 3 übrigen Klone als Konsensusaminosäure. Bei 2 identischen AS bei 2 Klonen wurde die AS für den Konsensusklon per Zufall ausgewählt, bzw. erfolgte die Auswahl der Konsensusaminosäure nach Sequenzvergleich mit anderen in Zellkultur replizierenden Isolaten bzw. mit den jeweiligen Prototypsequenzen.

### 6.2.1 Herstellung des Konsensusklons 2879con1

Nach Vergleich der Aminosäuresequenzen der 4 Klone von HCV-Isolat 2879 wurde von jedem dieser Klone die Anzahl der AS innerhalb des HCV-Polyproteins (NS3-NS5B) eruiert, die nicht der Konsensusaminosäure entsprachen. Tabelle 10

gibt eine Übersicht über die Anzahl der AS innerhalb der NSP-Sequenz NS3-NS5B der unterschiedlichen Klone von Isolat 2879, die von der Konsensusaminosäure abwichen.

2879 Klon1	3 AS Abweichungen
2879 Klon2	8 AS Abweichungen
2879 Klon3	5 AS Abweichungen
2879 Klon4	7 AS Abweichungen

**Tabelle 10: Übersicht über die Anzahl der AS der einzelnen sequenzierten Klone von Isolat 2879, die nicht der Konsensusaminosäure entsprechen.**

Da Klon 1 die geringste Anzahl an Aminosäureabweichungen aufwies, wurde dieser Klon für weitere Klonierungsarbeiten zur Herstellung des Konsensusklons ausgewählt (Tabelle 10). Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die AS, die nicht der Konsensusaminosäure entsprechen einschließlich deren Lokalisation innerhalb des Polyproteins.

	Aminosäure HCV-Protein		AS-Position	
Mutation Nr.1	Arginin	→ Histidin	1176	NS3
Mutation Nr.2	Prolin	→ Serin	2404	NS5A
Mutation Nr.3	Arginin	→ Lysin	2471	NS5B

**Tabelle 11: Überblick über die einzelnen AS, die nicht der Konsensusaminosäure des HCV-Isolates 2879 entsprechen.**

Neben der Position der Aminosäuren ist deren Lokalisation innerhalb des HCV-Polyproteins angegeben. Die genauen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die 3a-Prototypsequenz K3a.

Innerhalb der NSP-Sequenz des Isolates 2879 war der Austausch der AS, die nicht der Konsensusaminosäure entsprechen, notwendig, da sich diese in folgenden funktionell wichtigen Sequenzbereichen befanden (Tabelle 11). Eine der AS (Arginin), die nicht der Konsensusaminosäure entsprach, war an der Position 1176 innerhalb der Proteasedomäne lokalisiert. Eine weitere von der Konsensussequenz abweichende AS (Prolin) befand sich im C-terminalen Abschnitt des NS5A-Proteins an der Aminosäureposition 2404. Die dritte AS

(Arginin), die nicht der Konsensusaminosäure entsprach, war im NS5B-Protein, der RNA-abhängigen RNA-Polymerase lokalisiert. Dieser Sequenzbereich ist u. a. an der Bindung der RNA beteiligt (83). Die kodierenden Sequenzen innerhalb des HCV-Genoms wurden durch eine ortsgerichtete Mutagenese (5.10) so verändert, daß sich die Aminosäureaustausche R1176H (NS3), P2404S (NS5A), R2471K (NS5B) ergaben. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die AS, die für die Generierung des Konsensusklones des Isolates 2879 ausgetauscht werden mußten. Für den Austausch der drei AS wurde mit dem Konstrukt TOPO NS2/NS3-NS5B-2879 Klon 1 gearbeitet. Aufgrund der Amplifikation der gesamten NSP-kodierenden Sequenz während der PCR-Mutagenese kann es auch in übrigen Teilen des Genoms zum Einbau von nicht komplementären Nukleotiden kommen. Daher mußte nach Austausch der letzten AS die gesamte Sequenz von NS3-NS5B mittels Sequenzierung bestätigt werden. Nach Fertigstellung der Konsensussequenz von Isolat 2879 im TopoXL-Vektor mußte diese für weitere Experimente in den Vektor pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/Con1 kloniert werden. In mehreren Klonierungsschritten wurde die NSP-kodierende Sequenz HCV Con1 gegen die Konsensussequenz des Isolates 2879 ersetzt. Für die Umklonierung der Konsensussequenz des Isolates 2879con mußte in einer PCR (5.12) am 5'Ende der Anfangsabschnitt von NS3 der Konsensussequenz mit dem 3'Ende der EMCV IRES des Vektors verbunden werden. Am 3'Ende war das Konstrukt pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/Con1 mit einer AflII-Schnittstelle ausgestattet, über die die Konsensussequenz des Isolates 2879 in den Vektor kloniert werden konnte. Aus diesem Grund wurde das 3'Ende von NS5B der Konsensussequenz (Isolat 2879) amplifiziert, wobei ein Antisenseprimer generiert wurde, der eine AflII Schnittstelle aufwies. Über diese Schnittstelle konnte das 3'Ende von NS5B der Sequenz 2879con in den Vektor kloniert werden.

### **6.2.2 Herstellung des Konsensusklons von HCV-Isolat 427con1**

Nach Vergleich der ermittelten Konsensussequenz mit den analysierten Klonen von Isolat 427 wurde für die Herstellung des Konsensusklones Klon 2 ausgewählt. Dieser wies, verglichen mit den verbleibenden drei Klonen, die geringste Anzahl an AS, die nicht der Konsensusaminosäure entsprach, auf. Tabelle 12 gibt einen

Überblick über die Anzahl der AS, die innerhalb der einzelnen Klone nicht mit den jeweiligen Konsensusamino­säuren übereinstimmen.

---

427 Klon1	15 AS Abweichungen
427 Klon2	8 AS Abweichungen
427 Klon3	23 AS Abweichungen
427 Klon4	14 AS Abweichungen

---

**Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl der von der Konsensussequenz abweichenden AS der einzelnen sequenzierten Klone von Isolat 427.**

Für die Herstellung des Konsensusklones des Isolates 427 mußten eine AS im NS3-Protein, drei AS im NS4B-Protein und vier weitere AS innerhalb des NS5B-Proteins ausgetauscht werden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die AS, die für die Generierung des Konsensusklones von Isolat 427 ausgetauscht werden mußten, einschließlich deren Lokalisation innerhalb des HCV-Polyproteins. Wie bei Isolat 2879 befanden sich die AS, die nicht der Konsensusamino­säure entsprachen, innerhalb funktionell wichtiger Sequenzbereiche. Eine AS war innerhalb der Proteasedomäne des NS3-Proteins lokalisiert. Die Protease katalysiert zusammen mit dem Kofaktor NS4A die Abspaltung der NSP NS4A bis NS5B (29). Drei weitere AS, die nicht den jeweiligen Konsensusamino­säuren entsprachen, waren innerhalb des NS4B Proteins lokalisiert. Da die Funktion von NS4B bei HCV wie auch bei anderen Vertretern der Familie *Flaviviridae* noch weitgehend unbekannt ist, war nicht abschätzbar, wie sich eine fehlerhafte Aminosäuresequenz innerhalb dieses Bereiches auf die Replikationsfähigkeit der Replikon-RNA auswirkt. Ebenso erfolgte der Austausch von AS, die nicht der Konsensusamino­säure entsprachen, innerhalb des NS5B-Proteins. Einige dieser AS waren in hochkonservierten Sequenzabschnitten lokalisiert. Mutationen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz in diesen hochkonservierten Bereichen führen, haben eine unterschiedlich stark inhibierende Auswirkung auf die katalytische Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase bis hin zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms (59, 83). Für die Herstellung der Konsensussequenz wurde mit einer ortsgerichteten Mutagenese in Form einer überlappenden PCR und Restriktionsenzymverdau gearbeitet (5.12).

	Aminosäure		AS-Position	HCV-Protein	
Mutation Nr.1	Serin	→	Asparagin	1104	NS3
Mutation Nr.2	Serin	→	Phenylalanin	1729	NS4B
Mutation Nr.3	Arginin	→	Glutamin	1774	NS4B
Mutation Nr.4	Serin	→	Prolin	1824	NS4B
Mutation Nr.5	Threonin	→	Asparagin	2454	NS5B
Mutation Nr.6	Cystein	→	Serin	2523	NS5B
Mutation Nr.7	Glutaminsäure	→	Lysin	2574	NS5B
Mutation Nr.8	Cystein	→	Tyrosin	2896	NS5B
Deletion		→	Leucin	3006	NS5B

**Tabelle 13: Übersicht über die AS von Klon 2 des Isolates 427, die nicht der Konsensusaminosäure entsprechen.**

Neben der Position der Aminosäuren ist deren Lokalisation innerhalb des HCV-Polyproteins angegeben. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die 3a-Prototypsequenz K3a.

Es wurde eine Klonierungsstrategie erstellt, die die Generierung des Konsensusklons mit gleichzeitiger Umklonierung des Isolates in das Konstrukt pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/2879con ermöglichte. Als Vektor diente das bei der Umklonierung des Konsensusklons 2879 in den pFK-Vektor entstandene Konstrukt pFK I<sub>389</sub>neo/NS3-3'/2879con. Um innerhalb der Sequenz von Klon 2 nicht alle acht AS, die von der Konsensussequenz abweichen, austauschen zu müssen, wurde aus den vier analysierten Klonen jeweils derjenige Sequenzabschnitt ausgewählt, der der Konsensussequenz entsprach. Im Verlauf der einzelnen Klonierungsschritte wurden drei Amplifikationen durchgeführt. An der Aminosäureposition 1729 erfolgte über eine Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese der Austausch der AS Serin gegen die AS Phenylalanin. Eine weitere PCR war notwendig, um das 5'Ende von NS3 der Konsensussequenz 427 mit der EMCV-IRES des Vektors zu verbinden. Ferner mußte wie bereits bei Isolat 2879 am 3'Ende von NS5B über eine PCR eine AflII-Schnittstelle in die Konsensussequenz des Isolates 427 eingefügt werden, um diese in den Vektor pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/427con ligieren zu können. Die Eliminierung der Deletion am äußersten 3'Ende von NS5B erfolgte zusammen mit der Verbindung von NS5B der Konsensussequenz (2879) mit der 3'NTR des Vektors.

### 6.2.3 Herstellung weiterer Konstrukte der Isolate 2879 und 427

Nach Generierung der Konsensusklone der HCV-3a-Isolate 2879 und 427 erfolgte ein Sequenzvergleich mit den in Zellkultur replizierenden subgenomischen HCV-Isolaten unterschiedlicher Genotypen bzw. mit deren jeweiligen Prototypsequenzen. Bei beiden Isolaten 427 und 2879 zeigten sich an einzelnen Aminosäurepositionen, besonders in funktionell wichtigen Bereichen der Helikase sowie der RNA-abhängige RNA-Polymerase Abweichungen der Aminosäuresequenz von allen übrigen in Zellkultur replizierenden Isolaten der unterschiedlichen Genotypen. Die Sequenzanalyse der NSP NS3-NS5B von vier Klonen des Isolates 2879 zeigte an der Aminosäureposition 1319 im NS3-Protein in jeweils zwei Klonen eine identische AS. Bei der Ermittlung der Konsensussequenz für Isolat 2879con1 wurde in diesem Fall die Konsensusaminosäure Arginin per Zufall ausgewählt. Es handelt sich hier jedoch um ein konserviertes und funktionell wichtiges Aminosäuremotiv der Helikasedomäne (DECH Motiv) (51). Zudem war innerhalb dieses Sequenzbereiches an dieser Aminosäureposition bei allen übrigen Genotypen ein Histidin anzutreffen. Daher erfolgte in weiteren Klonierungsarbeiten der Austausch des ursprünglich im Konsensusklon 2879con1 vorhandenen Arginin zu einem Histidin. Neben den beschriebenen Austauschen im NS3-Protein wurden von Isolat 2879 und 427 Konstrukte generiert, die innerhalb der RNA-abhängigen RNA-Polymerase weitere Aminosäureaustausche enthielten. Bei Isolat 2879 erfolgte eine Aminosäuresubstitution im NS5B-Protein im Bereich eines konservierten Aminosäuremotivs, des sogenannten GDD-Motivs. Es handelt sich um einen hochkonservierten Bereich innerhalb des ebenso hochkonservierten als Motiv C bezeichneten Sequenzabschnittes (81). Für dieses GDD-Motiv konnte eine wichtige Funktion bei der Bindung von Nukleotiden nachgewiesen werden (83). Wie bei Isolat 2879 wurde die Konsensussequenz des Isolates 427 mit der Sequenz der in Zellkultur replizierenden HCV-Isolate verglichen.

**Patient 2879**

pFK-neo-2879con1	Wildtyp HCV-3a 2879con
pFK-neo-2879con1-R1846T	Adaptive Mutation in NS4B
pFK-neo-2879con1-S2204R	Adaptive Mutation in NS5A
pFK-neo-2879con2 (D2740V)	Mutation in NS5B, GDD-Motiv
pFK-neo-2879con3 (D2740V+R1319H)	Mutation in NS3, Walker B Motiv DECH
pFK-neo-2879con3-R1846T	Adaptive Mutation in NS4B
pFK-neo-2879con3-S2204R	Adaptive Mutation in NS5A
pFK-neo-2879con3-L1496M	Adaptive Mutation NS3 Helikase, Motiv VI
pFK-neo-2879con3-S2204R+L1496M	Kombination der adaptiven Mutationen NS4B und NS3
pFK-neo-2879con3-S2204I+L1496M	Kombination der adaptiven Mutationen NS4B und NS3

**Patient 427**

pFK-neo-427con1	
pFK-neo-427con1-R1846T	Adaptive Mutation in NS4B
pFK-neo-427con1-S2204R	Adaptive Mutation in NS5A
pFK-neo-427con1-S2204R-L1496M	Kombination der adaptiven Mutationen NS4B und NS3
pFK-neo-427con2-(R2469K und A2608S)	Wildtyp 427con2 mit Entfernung von 2 Mutationen in NS5B mit inhibitorischer Wirkung auf die RNA-abhängigen RNA-Polymerase
pFK-neo-427con2-R1846T	Adaptive Mutation in NS4B
pFK-neo-427con2-S2204R	Adaptive Mutation in NS5A
pFK-neo-427con2-S2204I	Adaptive Mutation in NS5A
pFK-neo-427con2-S2204I+L1496M	Kombination der adaptiven Mutationen NS3 und NS4B
pFK-neo-427con2-S2204R+L1496M	Kombination der adaptiven Mutationen NS3 und NS4B

**Tabelle 14: Überblick über die im Verlauf der Klonierungsarbeiten generierten Replikonkonstrukte, die in Zellkultur getestet wurden.**

Es erfolgte ein Austausch von zwei AS innerhalb des NS5B-Proteins, die die Funktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase beeinträchtigen könnten. Die lediglich in der Konsensussequenz von Isolat 427 vorhandenen AS Arginin wurde an der Position 2469 gegen die AS Lysin, welche bei allen anderen Isolaten der unterschiedlichen in Zellkultur replizierenden Genotypen anzutreffen war,



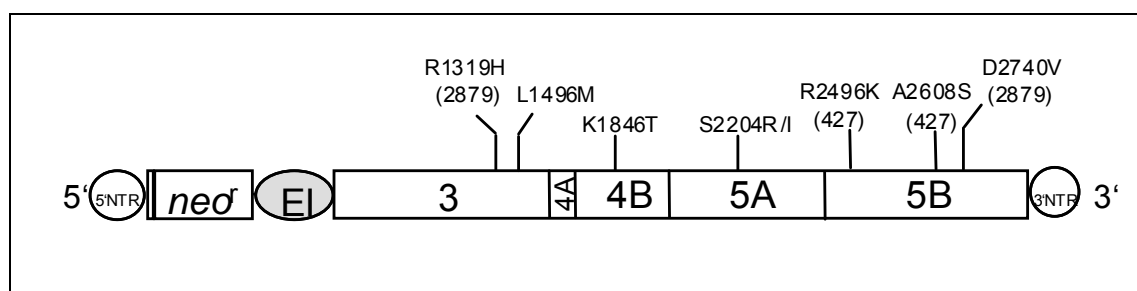
ausgetauscht. Ein weiterer Aminosäureaustausch erfolgte an Position 2608, da die AS Alanin an dieser Position nicht mit der AS Lysin der übrigen Isolate übereinstimmte (s. dazu auch Tabelle 14).

### **6.3 Herstellung von Replikonstrukten mit adaptiven Mutationen**

Sequenzanalysen der in Zellkultur replizierenden subgenomischen HCV-RNA des Isolates HCV Con1 zeigten, daß es unter Selektionsdruck mit G418 zum Auftreten von Mutationen gekommen war, die die Replikation in unterschiedlichem Ausmaß verstärken. Diese Mutationen können in allen NS-Genen nachgewiesen werden, wobei auffällig war, daß sie vermehrt in NS3 und im Zentrum von NS5A auftreten (10, 61). Neben Einzelmutationen wurden Mutationen beschrieben, die in Kombination miteinander zu einer Erhöhung der Replikationseffizienz in Zellkultur führen (61). Als nächster Schritt erfolgte die Herstellung von Replikonstrukten der beiden Isolate 427 und 2879, die als adaptiv beschriebene Mutationen enthielten (Tabelle 14). Zum einen wurde ein Genotyp-3a-Replikonstrukt generiert, welches den Aminosäureaustausch S2204R im NS5A-Protein enthielt, da dieser Austausch bereits bei der Etablierung eines Zellkultursystems mit replizierenden subgenomischen Abschnitten eines Genotyp-1a-Isolates zu einer stabilen Replikation in HuH-7 Zellen führte (11). Neben dem Aminosäureaustausch im NS5A-Protein wurde im Bereich von NS4B (K1846T) eine weitere als adaptiv beschriebener Austausch, der die Replikationseffizienz der HCV Con1 Sequenz in Zellkultur um ein Vielfaches erhöhte, eingefügt (61).

Bei dem in Zellkultur replizierenden Isolat HCV-BK wurde innerhalb der Helikasedomäne an der Position 1496 ein Aminosäureaustausch beschrieben, der die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur verstärkt (40). Da dieser Aminosäureaustausch bereits bei Isolat HCV-BK zu einer erhöhten Replikation in den transfizierten Zellen führte, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese Replikonstrukte der Isolate 427 sowie 2879 hergestellt, die diesen Austausch (L1496M) aufwiesen. Diese Adaptationsmutation ist unmittelbar im Anschluß an einen ebenfalls hochkonservierten Sequenzbereich der Helikase lokalisiert, dem

eine wichtige Funktion bei der Bindung der RNA zugeschrieben wird (17). Die Aminosäuresequenz der Isolate 427 und 2879 enthielt an dieser Position die AS Leucin, die des Isolates HCV Con1b ein Methionin. Daher erfolgte innerhalb der Sequenzen der beiden Isolate 427 und 2879 der Austausch der AS Leucin gegen die AS Methionin. Weitere Replikonstrukte der Isolate 2879 und 427 wurden generiert, die an der Position 2204 die AS Isoleucin enthielten, da diese AS bereits bei Isolat HCV Con1b als adaptiv beschrieben wurde. Zwei weitere Konstrukte wurden hergestellt, in denen der Aminosäureaustausch L1496M jeweils mit dem Austausch K1846T und S2204R/I bei Isolat 2879 und mit dem Austausch R1846T und S2204R bei Isolat 427 kombiniert wurden. In Abbildung 21 sind die Aminosäuren, die innerhalb der Konsensussequenzen der beiden Isolate 2879 und 427 ausgetauscht wurden, schematisch dargestellt.

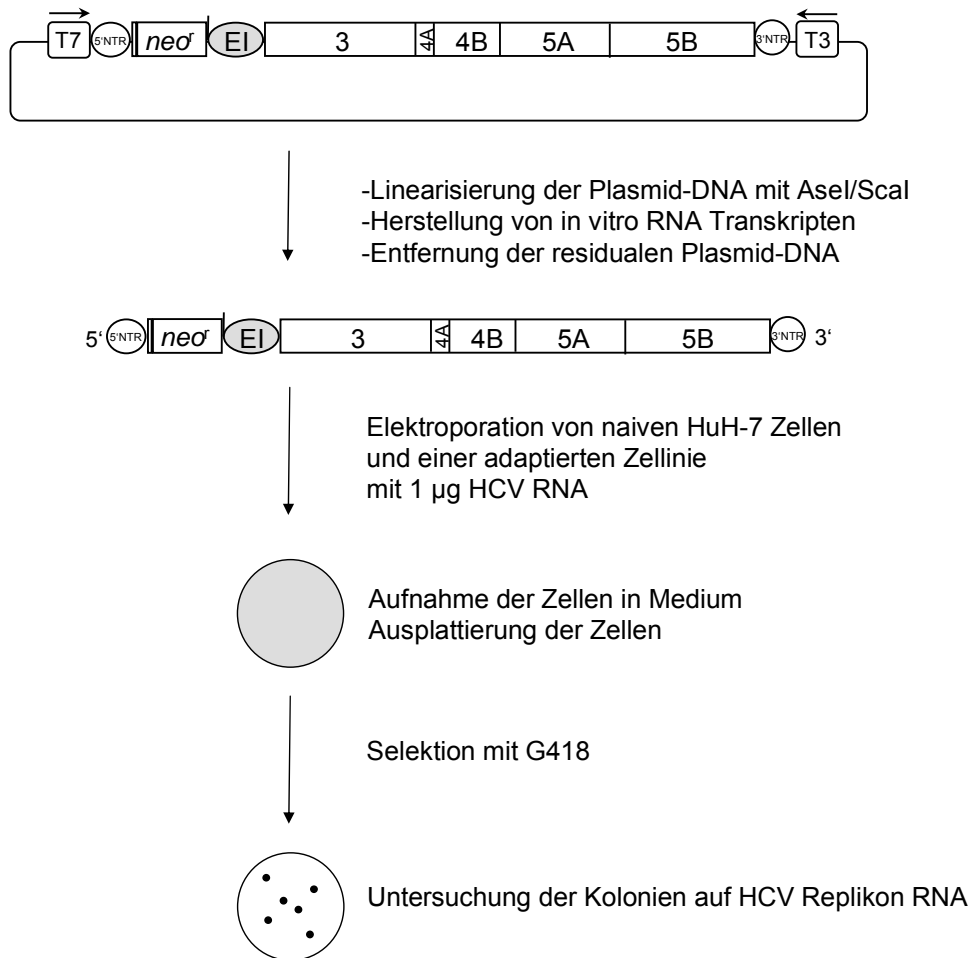


**Abbildung 21: Lokalisation der Aminosäuren, die innerhalb der Konsensussequenzen der beiden Isolate 2879 und 427 ausgetauscht wurden.** Die Aminosäureaustausche L1496M, K1846T und S2204R/I wurden bereits bei in Zellkultur replizierenden Isolaten als adaptiv beschrieben. Die Aminosäureaustausche R1319H (2879), R2496K (427), A2608S (427) und D2740V(2879) erfolgten nach Vergleich der unterschiedlichen in Zellkultur replizierenden Isolate der einzelnen Genotypen.

## 6.4 Transfektion und Untersuchung der Zellen auf replizierende HCV-RNA des Genotyps 3a

Nach Fertigstellung der DNA-Konstrukte auf Basis der Konsensussequenz beider Isolate erfolgte die Herstellung von *in vitro* Transkripten für die Transfektion von HuH-7 Zellen. Dafür wurden die Plasmid-Konstrukte mit *Asel* linearisiert und mit *Scal* am exakten Ende der 3'NTR geschnitten, aufgereinigt und für die Synthese der RNA-Transkripte mit T7-Polymerase inkubiert. Ferner wurden die *in vitro*

hergestellten RNA-Transkripte durch DNase-Verdau von Plasmid-DNA befreit und aufgereinigt (5.16).



**Abbildung 22: Versuchsablauf zur Transfektion selektionierbarer subgenomischer HCV Replikon-RNA in HuH-7 Zellen.**

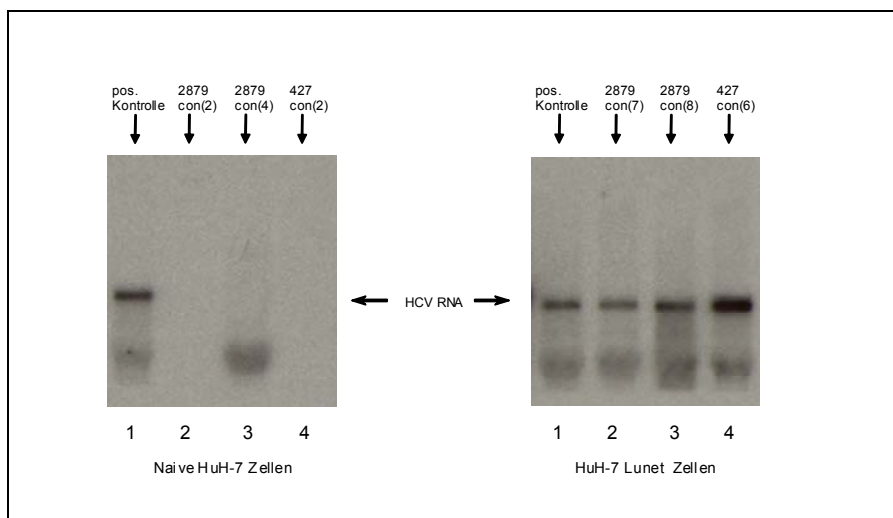
Nach Linearisierung der Plasmid-DNA erfolgte über den T7-Promotor die Herstellung von RNA-Transkripten (5.16) und die Elektroporation von HuH-7 Zellen sowie einer adaptierten Zelllinie (5.19). Selektion der Zellen mit G418 und Untersuchung der Zellklone auf HCV-RNA (5.18).

Für die Transfektion der HuH-7 Zellen wurden 1µg *in vitro* Transkripte eingesetzt. Bei allen Transfektionsexperimenten wurde neben Replikonkonstrukten der beiden Isolate 427 und 2879 (Tabelle 14) eine Negativkontrolle transfiziert (5.19). Es handelte sich um eine replikationsdefiziente Deletionsmutante mit einer Deletion von 10 AS im aktiven Zentrum der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (NS5B). Als Positivkontrolle wurden HCV-RNA-Transkripte der Wildtypsequenz sowie der adaptierten Sequenz von HCV Con1 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 22

schematisch dargestellt. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Elektroporation in Medium (DMEM) überführt und durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an Geneticin (G418) selektioniert (5.19). In den Zellen, in denen HCV-RNA erfolgreich replizierte, kam es über eine Expression des Neomycinresistenzgens zu einer Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber Geneticin. Zellen, in denen es zu keiner Replikation der HCV-RNA kam, starben unter Geneticin ab. Die Elektroporation der HuH-7 Zellen mit den RNA-Transkripten der Konstrukte von Isolat 2879con1 und 427con1 wurde einige Male wiederholt, wobei es in allen Fällen zu einem mehr oder weniger schnellen Absterben der Zellen innerhalb der ersten Wochen nach der Elektroporation kam. Es konnte davon ausgegangen werden, daß keine Replikation der Genotyp 3a HCV-RNA in diesen Zellen stattfand. Bei den Elektroporationsansätzen mit den Replikonstrukten des Genotyps 1b war nach etwa 3-4 Wochen das Wachstum resistenter Klone zu beobachten. Bei den Ansätzen mit dem Wildtyp-Replikon ohne adaptive Mutationen bildeten sich wenige resistente Klone aus. Bei den Transfektionsansätzen mit dem adaptierten Replikon des Genotyps 1b kam es zur Bildung einer Vielzahl von Kolonien unter Selektion mit G418. Weitere Elektroporationsansätze wurden mit Replikonstrukten 2879con1 und 427con1 durchgeführt, die jeweils eine adaptive Mutation in NS4B bzw. NS5A getrennt voneinander enthielten. Zum Vergleich wurden neben den adaptierten Replikons die Wildtyp RNA 2879con1 und 427con1 transfiziert. Neben einer naiven HuH-7 Zelllinie wurde für die Transfektionen mit einer adaptierten Zelllinie gearbeitet. Es handelt sich um HuH-7 Zellen (HuH-7 Lunet), die mit dem Replikon HCV Con1 transfiziert worden waren und aus denen anschließend replizierende HCV-RNA mittels Interferon- $\alpha$  eliminiert worden war. Untersuchungen zeigten, daß in diesen sogenannten ‚geheilten‘ Zellen die Replikon-RNA aufgrund von bisher unbekanntem Adaptationsmechanismen mit erhöhter Effizienz repliziert (32).

Nach wiederholten Transfektionsversuchen war bei einigen Ansätzen der adaptierten Zelllinie nach anfänglichem Absterben der Zellen innerhalb der ersten Wochen eine erfolgreiche Selektion von HuH-7 Zellen unter G418 möglich. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl der Kolonien wurden diese durch Trypsinierung von der Platte gelöst und bis zu einer Zellzahl von  $10^6$  Zellen weiter

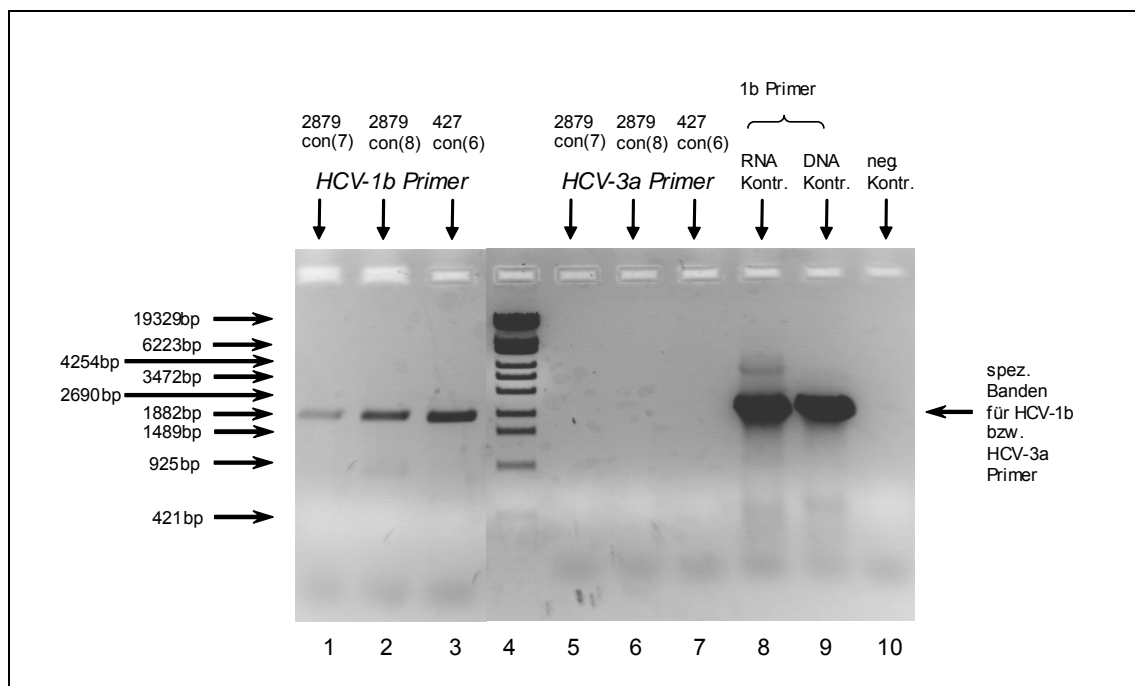
kultiviert (5.19). Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und nach Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte die Untersuchung auf HCV-RNA im Northern-Blot. Für die Northern-Hybridisierung wurde mit einer Sonde gearbeitet, die spezifisch an das Neomycinresistenzgen hybridisierte. Bei zwei von vier Ansätzen konnte im Northern-Blot HCV-RNA nachgewiesen werden. Bei Isolat 427 zeigte sich bei der Northern-Hybridisierung von zwei Ansätzen nur in einem Fall ein positives Ergebnis.



**Abbildung 23: Überprüfung der unter Selektion gewachsenen Kolonien auf HCV-RNA.**

Die Northern-Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde, die spezifisch an das Neomycinresistenzgen hybridisiert. Das linke Bild zeigt das Ergebnis der Northern-Hybridisierung der G418 resistenten Zellklone der naiven HuH-7 Zellen. Auf Spur 1 wurde die Positivkontrolle aufgetragen, auf Spur 2, 3 und 4 die unterschiedlichen Zellklone, die auf HCV-RNA untersucht wurden. Das rechte Bild zeigt die Northern-Hybridisierung der Zellklone der adaptierten Zelllinie. Auf Spur 1 wurde wiederum die Positivkontrolle aufgetragen, auf Spur 2, 3 und 4 die Gesamt-RNA der Zellklone aus der adaptierten Zelllinie, die unter G418 gewachsen waren.

Da für den Nachweis der HCV-RNA eine Sonde gewählt wurde, die spezifisch an das Neomycinresistenzgen hybridisierte, konnte es sich bei der im Northern-Blot nachgewiesenen HCV-RNA sowohl um HCV-RNA des Genotyps 1b als auch des Genotyps 3a handeln (Abbildung 23). Daher wurde für eine Differenzierung zwischen diesen beiden Genotypen eine RT-PCR mit 1b- bzw. 3a-spezifischen Primer durchgeführt. Es konnten nur bei der Amplifikation mit 1b-spezifischen Primern Banden nachgewiesen werden (Abbildung 24).



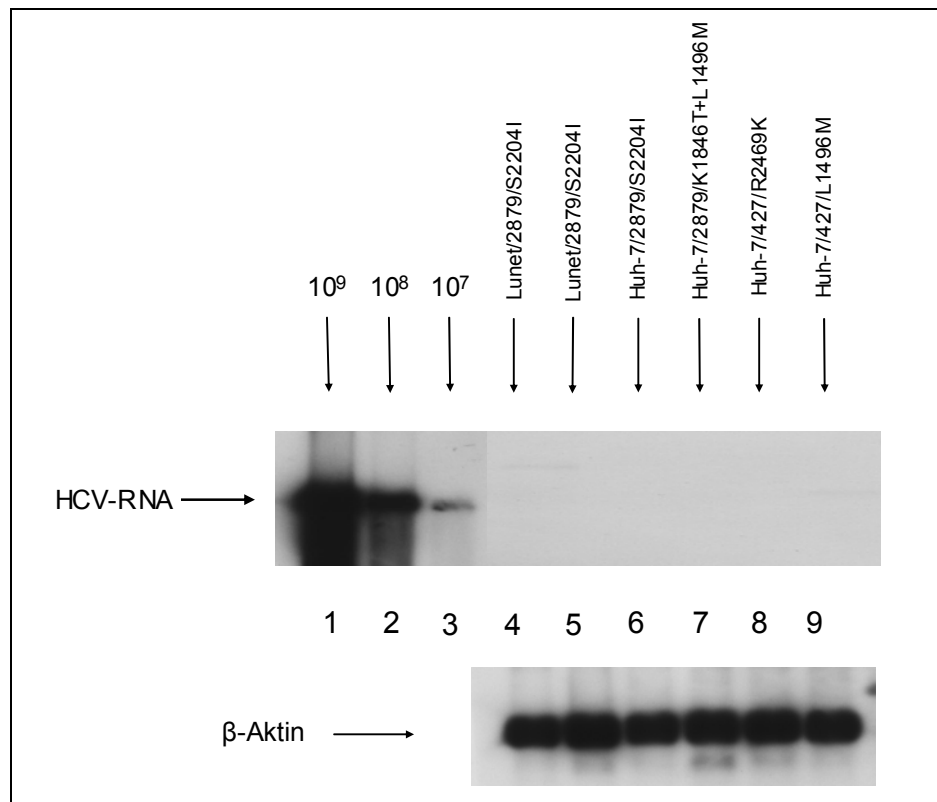
**Abbildung 24: Genotypspezifische Analyse der Gesamt-RNA aus den unter G418-selektionierten Zellklonen.**

Die Amplifikation erfolgte mit Genotyp 1b (Spur 1-3) und 3a (Spur 5-7) spezifischen Primern (4.5.1). Bei den Banden in Spur 8 und 9 handelt es sich um die RNA bzw. DNA Positivkontrolle mit 1b-spezifischen Primern, die Spur 10 enthält die Negativkontrolle. Die Pfeile auf der linken Seite der Abbildung kennzeichnen die Fragmentgrößen des DNA-Molekulargewichtsstandards, der zur Größenbestimmung aufgetragen wurde.

Weitere Elektroporationsansätze erfolgten mit den im Verlauf der Klonierungsarbeiten hergestellten Replikonkonstrukten. Diese Konstrukte enthielten Mutationen, die bei weiteren in Zellkultur replizierenden Isolaten als adaptiv beschrieben wurden (siehe auch Tabelle 14). Naive HuH-7 Zellen sowie eine adaptierte Zelllinie wurden mit  $1\mu\text{g}$  RNA-Transkripten elektroporiert. Als Negativkontrolle wurde die Deletionsmutante von HCV Genotyp 1b elektroporiert. Um die Effizienz der Elektroporation zu überprüfen, wurden Zellen mit einem bereits in Zellkultur etabliertem Replikonkonstrukt transfiziert (HCV Con1). Nach drei Wochen unter G418 Selektion kam es bei den Zellen, die mit den Genotyp 3a Replikonkonstrukten transfiziert wurden, zur Bildung von Kolonien (Tabelle 15). Die Zellen wurden bis zu einer Zellzahl von  $10^6$  weiterkultiviert. Die Gesamt-RNA wurde aus den selektionierten Zellen extrahiert und mittels Northern-Blot auf HCV-RNA getestet.

Konstrukt	Anzahl der Kolonien	
	HuH-7	HuH-7 Lunet
pFK-neo-2879con3-R1846T+L1496M		1
pFK-neo-2879con3-S2204R+L1496M	1	
pFK-neo-2879con3-S1496M	1	1
pFK-neo-2879con3-S2204I		1
pFK-neo-427con2		5
pFK-neo-427con2+K1846T	1	
pFK-neo-427con2+S2204R	1	2

**Tabelle 15: Anzahl der Kolonien, die sich nach der Transfektion der Zellen pro  $\mu\text{g}$  *in vitro* Transkripten gebildet haben.**



**Abbildung 25: Northern-Blot Analyse der Gesamt-RNA aus selektionierten Zelllinien.** Der Nachweis replizierender HCV-Replikon-RNA im Northern-Blot erfolgte mit einer Genotyp-3a-spezifischen Sonde (5.18). In den Spuren 1, 2 und 3 wurden als Kontrolle jeweils  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  HCV-Kopien *in vitro* transkribierter subgenomischer Replikon-RNA aufgetragen. Auf den Spuren 4-9 wurde die aus den Zellen extrahierte Gesamt-RNA aufgetragen. Auf der linken Seite wurde die Position der subgenomischen HCV-RNA mit einem Pfeil markiert. Zudem erfolgte die Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für  $\beta$ -Aktin.

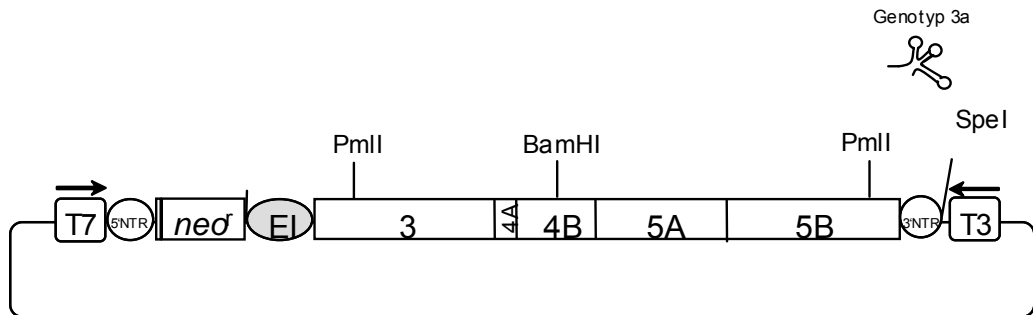
Für die Northern-Hybridisierung wurde mit einer Genotyp-3a-spezifischen Sonde, mit Bindung im Bereich des Gens-NS5B, gearbeitet. Parallel erfolgte die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde spezifisch für  $\beta$ -Aktin. Aus Abbildung 25 geht hervor, daß aufgrund einer effizienten Extraktion der RNA aus den unterschiedlichen Zellklonen die  $\beta$ -Aktin Hybridisierung ein starkes Signal ergab. In keinem der untersuchten Klonen konnte HCV-spezifische RNA nachgewiesen werden (Abbildung 25). Die Ursache für den fehlenden Nachweis von HCV-RNA in den Zellen mittels Northern-Hybridisierung könnte in einem zu geringen Replikationsniveau der replizierenden HCV-RNA liegen. Andererseits aber besteht die Möglichkeit, daß es über eine Integration des Neomycinresistenzgens in das Genom der Zelle zu einer Resistenzausbildung der HuH-7 Zellen gegenüber Geneticin gekommen ist.

## **6.5 Herstellung von Replikonkonstrukten mit der 3'NTR des Genotyps 3a**

Bei der Herstellung der Replikonkonstrukte von Isolat 427 und 2879 wurde von dem Konstrukt HCV I389neo/NS3-3'/Con1 ausgegangen, wobei die NSP-kodierende Region (NS3-NS5B) des HCV Con1 gegen die der jeweiligen Genotyp-3a-Konsensussequenzen ausgetauscht wurde. Folglich enthielten die nach der Umklonierung entstandenen Konstrukte neben den NSP von Genotyp 3a die originäre 5'NTR bzw. 3'NTR von HCV Con1 (Genotyp 1b). Da nicht bekannt war, inwieweit sich die Kombination der kodierenden Region mit der 3'NTR eines anderen Genotyps auf die Replikationseffizienz der HCV-RNA auswirkt, wurde die ursprünglich im Konstrukt pFKI<sub>389</sub>neo/NS3-3'/427con vorhandene 3'NTR von Genotyp 1b mit der 3'NTR von Genotyp 3a ersetzt. Dafür mußte die 3'NTR aus dem Patientenserum des Isolates 427 amplifiziert werden. Aufgrund der ausgeprägten Sekundärstrukturen im Bereich der 3'NTR gestaltete sich die Amplifikation dieses Abschnittes als äußerst schwierig. Trotz der initialen Denaturierung der RNA bei 95°C für 5 Min, um auf diese Weise die Sekundärstrukturen aufzubrechen, konnte die 3'NTR des Isolates 427 nicht erfolgreich amplifiziert werden. Es wurde daher versucht, diese Region aus weiteren Seren von Patienten mit einer HCV-Infektion des Genotyps 3a zu



amplifizieren. Nur in einem Fall gelang die erfolgreiche Amplifikation der 3'NTR aus dem Patientenserum. Für die Ligation der 3'NTR von Genotyp-3a in den Vektor wurde eine Schnittstelle (PmlI) am 3'Ende der NS5B kodierenden Region des Isolates 427 gewählt. Da es sich hier um keine Einzelschnittstelle handelte, wurde für die Herstellung des Vektors eine Schnittstelle (BamHI) innerhalb des NS3-Gens verwendet.



**Abbildung 26: Herstellung eines Replikonkonstruktes, das neben den NSP des Isolates 427 die 3'NTR eines Genotyp-3a-Isolates enthielt.** Die 3'NTR wurde aus dem Serum eines Patienten mit einer HCV-Infektion von Genotyp 3a amplifiziert und über eine PmlI- am 3'Ende von NS5B und über eine SpeI-Schnittstelle am 3'Ende der 3'NTR in den Vektor ligiert.

Am 3' Ende der 3'NTR erfolgte die Insertion des Fragments über eine SpeI Schnittstelle in den Vektor. Für die Amplifikation wurde ein Senseprimer generiert, der am Ende des NS5B-Gens gebunden wurde. Der Primer enthielt die für die Klonierung wichtige PmlI-Schnittstelle, wobei die Primersequenz hinter dieser Schnittstelle der Konsensussequenz entsprach. Ein Antisenseprimer wurde komplementär zum äußersten Ende der 3'NTR hergestellt. In einem Ligationsschritt wurden der Vektor und die beiden Fragmente miteinander verbunden (Abbildung 26). Die erfolgreiche Insertion der 3'NTR von Genotyp 3a wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Nach Fertigstellung des Konstruktes, welches die 3'NTR von Genotyp 3a enthielt, wurden RNA-Transkripte generiert. Für die Transfektion wurden 1µg *in vitro* Transkripte mittels Elektroporation in naive HuH-7 Zellen und in eine adaptierte Zelllinie transfiziert. Nach 3-4 Wochen unter Selektion mit G418 konnten keine Zellen selektioniert werden, in denen HCV-RNA von Genotyp 3a erfolgreich replizierte.

## 7 Diskussion

Die in den letzten Jahren entwickelten Hepatitis-C-Virus Replikonsysteme umfassen die Genotypen 1a/1b sowie 2a (11, 49, 64). Die für die Herstellung der Genotyp 1a/b Replikons verwendeten Isolate sind klinisch nicht charakterisiert. Das kürzlich entwickelte Zellkultursystem mit replizierender HCV-RNA eines Genotyp-2a-Isolates stammt von einem Patienten mit einer fulminant-akuten Hepatitis-C. Eine fulminante Hepatitis ist allerdings bei einer akuten Hepatitis C ein sehr seltenes Ereignis. Darüber hinaus weist die in HuH-7 Zellen replizierende HCV-Sequenz des Genotyps 2a große Unterschiede zu der 2a-Prototypsequenz auf. Die Etablierung eines Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA eines Isolates des Genotyps 2a, das von einem Patienten mit einer chronischen Hepatitis stammte und im wesentlichen der HCV 2a Prototypsequenz entsprach, ist bisher nicht gelungen. Die erfolgreiche Replikation eines Isolates des Genotyps 3a sowie weiterer Genotypen (4-6) in Zellkultur wurde bis dato nicht beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Zellkultursystems mit replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV-RNA des Genotyps 3a aus Isolat klinisch charakterisierter Patienten. Im ersten Schritt der Arbeit erfolgte die Etablierung der „langen“ RT-PCR für die Amplifikation des gesamten NSP-kodierenden Abschnittes der HCV-3a-Isolate 427 und 2879 einschließlich der Ermittlung sowie Herstellung der entsprechenden Konsensussequenz. Nachfolgend wird die Generierung der unterschiedlichen Replikonkonstrukte basierend auf der Konsensussequenz einschließlich der Insertion weiterer Mutationen in die kodierende Region einzelner NSP beschrieben. Der nächste Schritt umfaßte die Transfektion von Zellen mit den hergestellten Konstrukten sowie die Untersuchung der Zellklone auf das Vorhandensein von replizierender HCV-RNA. Abschließend erfolgte die Herstellung eines Replikonkonstrukts, das die 3'NTR eines Genotyp-3a-Isolates enthielt. Dieses Replikonsystem sollte später für vergleichende Untersuchungen der beiden in Zellkultur replizierenden HCV 3a Isolate untereinander zur Verfügung stehen. Insbesondere sollten hiermit Resistenzmechanismen einer IFN-Therapie im Vergleich zu HCV-Isolaten des Genotyps 1b in Zellkultur untersucht werden.

## 7.1 Auswahl der Patienten für die Herstellung der einzelnen Replikonkonstrukte

Mit Ausnahme des Genotyps 2a steht für die in den letzten Jahren entwickelten Replikonsysteme der unterschiedlichen Genotypen (Subtypen) keine Information der jeweiligen HCV-Isolate bezüglich Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber einer IFN-basierten Therapie im Patienten zur Verfügung. Es sind somit keine vergleichenden Studien möglich. Daher war zu Beginn dieser Arbeit die Auswahl der geeigneten Patienten, deren Isolate für die Herstellung dieser Replikonkonstrukte verwendet wurden, ein wichtiger und neuer Ansatz. Es wurden jeweils ein Patient, der erfolgreich behandelt werden konnte, und ein Patient, der unvollständig auf die Therapie ansprach, ausgewählt. Von beiden Patienten standen genaue Informationen bezüglich des klinischen Verlaufs der Infektion, sowie der Viruskinetik unter Therapie zur Verfügung. Beide Patienten zeigten eine Viruslast in einer Größenordnung von  $10^6$  IU/ml HCV-RNA im Blut vor Therapiebeginn. Bei dem Patienten, der auf die Therapie ansprach, konnte nach zwei Wochen keine HCV-RNA im Serum mehr nachgewiesen werden ( $<50$  IU/ml), wogegen bei dem Patient, der unvollständig auf die Therapie ansprach, nach 2-wöchiger Behandlung eine Viruslast von  $2,7 \times 10^5$  IU/ml HCV-RNA gemessen werden konnte.

Anhand von klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, daß Patienten mit einer HCV-Genotyp 2 oder 3 Infektion etwa doppelt so häufig (ca. 80%) auf die Therapie ansprechen, wie Patienten mit einer HCV-Genotyp-1b-Infektion (42, 116). Zudem wurde gezeigt, daß sich die Ansprechrate der Patienten mit einer HCV-Infektion von Genotyp 2 und 3 auf eine Therapie sowohl bei einer Verkürzung von 48 auf 24 Wochen als auch bei einer festen Dosis von 800 mg Ribavirin pro Tag, im Vergleich zur körperrgewichtsadaptierten Dosis nicht verschlechterte (42, 116). Es wird vermutet, daß bei einer Infektion mit dem Genotyp 3a das Vorhandensein einer fortgeschrittenen Leberzirrhose ein negativer Prediktor für das Ansprechen auf die Therapie mit IFN- $\alpha$ /Ribavirin sein könnte. Deshalb erfolgte die Auswahl der Patienten nicht auf der Grundlage des dauerhaften Ansprechens, sondern anhand

der Viruskinetik in der Frühphase der Therapie, durch die am besten die Sensitivität der HCV Isolate gegenüber IFN- $\alpha$  widergespiegelt wird.

## 7.2 Herstellung der Konsensusklone und Transfektion von Wildtyp RNA-Konstrukten

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase vieler RNA-Viren überprüft den Einbau komplementärer Nukleotide in das Genom nicht, weshalb fehleingebaute Nukleotide nicht korrigiert werden. So konnte bei Polioviren eine Fehlerrate der Polymerase von ca.  $10^{-4}$  nachgewiesen werden (109, 110). Im Patienten wurde für das HCV eine Fehlerrate von  $1,9 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotidposition pro Jahr berechnet (54, 76). Dies kann während der Synthese neuer HCV-RNA Moleküle zu einer Anhäufung deletärer Mutationen innerhalb der viralen RNA und somit zur Generierung eines defekten HCV-Genoms führen. Die Amplifizierung der RNA aus dem Serum der Patienten erfolgte mittels RT-PCR. Für die RT-PCR wurde eine Reverse Transkriptase und ein Gemisch aus *Taq*- und *Tgo*-Polymerase verwendet. Die Fehlerrate der Reversen Transkriptase liegt bei  $10^{-4}$ , die des *Taq*/*Tgo*-Gemisches nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) bei  $3-15 \times 10^{-4}$ . Mutationen, die eventuell in der RT-PCR entstehen, könnten als nicht konservierte Austausche innerhalb des RNA-Genoms zur Entstehung einer replikationsdefizienten Sequenz führen.

Um die Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase des HCV sowie den möglichen Einbau nicht komplementärer Basen während der RT-PCR zu berücksichtigen, wurde die Aminosäuresequenz der NSP NS3-NS5B von vier Klonen analysiert und die Konsensussequenz ermittelt. Die Methode der Generierung eines Konsensusklones beider Genotyp-3a-Isolate wurde angewandt, da das gleiche Vorgehen bereits bei der Etablierung eines Zellkultursystems mit replizierender subgenomischer HCV-RNA des Isolates HCV Con1 beschrieben wurde, welches nach Transfektion in Zellkultur replizierte (64). Nach erfolgreicher Amplifikation des NSP-kodierenden Abschnittes des HCV wurde von jedem Isolat die Aminosäuresequenz von vier Klonen analysiert und daraus die Konsensussequenz ermittelt. Bei Isolat 2879 wurde mit Klon 3 weitergearbeitet, da

dieser Klon eine Abweichung von lediglich 3 AS im Vergleich mit der Konsensussequenz aufwies. Bei Isolat 427 besaß der Klon 2 die geringste Anzahl an AS (8 AS), die nicht der Konsensusaminosäure entsprachen. In beiden Isolaten waren die von der Konsensussequenz abweichenden AS in funktionell wichtigen Bereichen lokalisiert. Sowohl bei Isolat 2879 als auch bei Isolat 427 mußte für die Herstellung der Konsensussequenz eine AS innerhalb der Proteasedomäne des NS3 Proteins ausgetauscht werden. Mutationen innerhalb des für die NS3-Protease kodierenden Abschnittes wirken sich möglicherweise störend auf die Prozessierung der NSP NS4A-NS5B aus. Bei Isolat 2879 wurde eine von der Konsensussequenz abweichende AS innerhalb des NS5A-Proteins gefunden. Bei NS5A handelt es sich um ein Phosphoprotein, für das zwei unterschiedliche Phosphorylierungsformen beschrieben wurde: Eine Form mit geringer Phosphorylierung sowie eine stark phosphorylierte Form (48). Mutationsanalysen zeigten, daß v.a. Serinreste im Zentrum von NS5A essentiell für die Hyperphosphorylierung des NS5A-Proteins sind (100). Da vor Herstellung der Konsensusklone nicht genau bekannt war, ob weitere Serinreste eine wichtige Rolle bei der Hyperphosphorylierung von NS5A spielen und inwieweit sich der Grad der Phosphorylierung auf die Replikation der viralen RNA auswirkt, wurde mittels PCR Mutagenese an der Position 2404 die AS Prolin gegen ein Serin, der Konsensusaminosäure ausgetauscht. Drei AS, die nicht der Konsensussequenz des Isolates 427 entsprachen, befanden sich innerhalb des NS4B-Proteins. Zwei dieser drei AS waren innerhalb vermutlicher Transmembrandomänen lokalisiert. Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich bei NS4B um ein stark hydrophobes Protein mit einer Anzahl an 4-5 Transmembrandomänen handelt, die das Protein in den Membranen des ER verankert (65). Zudem induziert das NS4B-Protein vermutlich die Bildung membranöser Strukturen („membranous web“) im Bereich des ER, wo die Replikation der HCV-RNA stattfindet (24). Bei Isolat 427 war eine der AS, die nicht der Konsensusaminosäure entsprach, im carboxyterminalen Bereich des NS5B-Proteins lokalisiert. Es handelt sich hier um einen hydrophoben Abschnitt. Untersuchungen konnten zeigen, daß dieser Abschnitt eine wichtige Rolle für die Verankerung des NS5B-Proteins in Membranen des ER sowie für die virale Replikation in Zellkultur spielt (57, 75).

Transfektionsversuche mit den hergestellten Replikonstrukten auf Basis der Konsensussequenz führten zu keiner erfolgreichen Selektion resistenter Zellen unter G418. Ein Grund für die fehlende Bildung von Kolonien unter G418-Selektion könnte in der Transfektion replikationsdefekter Konstrukte liegen. Trotz Herstellung von Replikonstrukten der HCV-Isolate 427 und 2879 auf Basis der Konsensussequenz kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere Mutationen innerhalb des Genoms in mindestens drei bzw. in allen Klonen enthalten waren, und daher bei der Ermittlung der Konsensussequenz nicht berücksichtigt wurden. Diese Mutationen hätten möglicherweise die Herstellung replikationsdefekter RNA-Konstrukte zur Folge gehabt. Eine weitere Ursache für die fehlende Bildung von Kolonien unter G418 könnte in einem zu geringen Replikationsniveau der HCV-RNA liegen. Aufgrund einer zu geringen Replikation der viralen RNA verbunden mit einer schwachen Expression des Resistenzgens könnte die Ausbildung von Kolonien unter G418 unterblieben sein.

### **7.3 Analyse der HCV-Replikons hinsichtlich ihrer Replikationskompetenz**

Anhand von Sequenzanalysen des in HuH-7 Zellen replizierenden Isolates HCV Con1 konnte das Auftreten konservierter Mutationen nachgewiesen werden, die die Replikation in unterschiedlichem Maße verstärken (53, 61, 62). Diese adaptiven Mutationen wurden in allen NS-Genen nachgewiesen. Als nächster Schritt in der vorliegenden Arbeit erfolgte daher die Insertion von als adaptiv beschriebenen Mutationen in die Konsensussequenzen der beiden Isolate 427 und 2879. Im Falle einer nur schwachen Replikation der HCV-RNA, welche die Ausbildung resistenter Kolonien unter G418 verhindert, sollte mit den als adaptiv beschriebenen Mutationen ein erhöhtes Replikationsniveau der Genotyp-3a-Konstrukte erreicht werden. Es wurden zwei Mutationen getrennt voneinander in die Konsensussequenzen der beiden Isolate 427 und 2879 inseriert. Eine der beiden Mutationen, die auf Proteinebene zum Aminosäureaustausch K1846T führt, hat nachweislich den stärksten Einfluß auf die Replikationseffizienz der HCV-RNA von HCV Con1 in Zellkultur als Einzelmutation (61). Ein weiterer Aminosäureaustausch

wurde im NS5A-Protein an Position 2204 (S2204I/R) durchgeführt. Dieser Austausch ermöglichte eine erfolgreiche Replikation eines Genotyp-1a-Isolates in Zellkultur. Der Austausch an dieser Position war also zwischen unterschiedlichen HCV-Subtypen übertragbar (11). Neben Einzelmutationen wurden Mutationen beschrieben, die in Kombination miteinander die Replikationsstärke der HCV-RNA in Zellkultur beeinflussen. So kann durch eine Insertion von zwei Mutationen in NS3 (E1202G, T1280I) kombiniert mit einer Mutationen innerhalb von NS4B (K1846T) die Replikation um ein Vielfaches verstärkt werden (61). Der Mechanismus der Zellkulturadaption durch Mutationen in den unterschiedlichen NSP sowie deren synergistische Wirkung ist bisher jedoch noch ungeklärt. Eine Reihe von zelladaptiven Mutationen, die seit der Etablierung des ersten beschriebenen Replikons identifiziert wurden, befindet sich im Zentrum von NS5A. NS5A kodiert für ein Phosphoprotein, mit einem MG von 56kDa, das in infizierten bzw. transfizierten Zellen in einer grund- und hyperphosphorylierten Form (p56 und p58) auftritt (48). Untersuchungen zeigten, daß das NS5A-Protein v.a. im Bereich von Serinresten phosphoryliert ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß drei konservierte Serinreste an den Aminosäurepositionen 2197, 2201 und 2204 eine wichtige Rolle bei der Hyperphosphorylierung des NS5A-Proteins spielen (100). Interessanterweise sind einige der in Zellkultur identifizierten adaptiven Mutationen, die zu einer Verstärkung der Replikation der HCV-RNA führen innerhalb von NS5A v. a. im Bereich von Serinresten lokalisiert (10, 61). Zudem treten zwei dieser adaptiven Mutationen an den für die Hyperphosphorylierung wichtigen Aminosäurepositionen 2197 und 2204 auf. Appel et al. konnten eine negative Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsgrad des NS5A-Proteins und dem Replikationsniveau der HCV-RNA in Zellkultur zeigen. Das Auftreten adaptiver Mutationen innerhalb von NS5A, die zu einer Verstärkung der Replikation führen, war gleichzeitig mit einer Reduktion der NS5A-Phosphorylierung verbunden (3). Daneben konnte gezeigt werden, daß adaptive Mutationen innerhalb weiterer NSP (NS4B, NS5B) eine Reduktion der Hyperphosphorylierung von NS5A zur Folge haben. Die genaue Wirkung der NS5A-Phosphorylierung auf die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise hat der Phosphorylierungsgrad des NS5A-Proteins über eine veränderte Interaktion dieses

Proteins mit zellulären bzw. viralen Proteinen direkte Auswirkung auf die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur. Evans et al. konnten eine Interaktion von NS5A mit dem Protein Human vesicle-associated membrane protein-associated protein A (hVAP-A) nachweisen, wobei die Interaktion zwischen NS5A und hVAP vom Phosphorylierungsgrad des NS5A-Proteins abhängig ist. Adaptive Mutationen (K1846T, S2204I), die mit einer Reduktion der NS5A-Hyperphosphorylierung einhergingen, führten zu einer vermehrten Bindung zwischen NS5A und hVAP-A. Die Hyperphosphorylierung des NS5A-Proteins hingegen verhindert eine Interaktion zwischen NS5A und hVAP-A, verbunden mit einer negativen Auswirkung auf die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur (28).

Neben NS5A sind weitere virale Proteine (NS3, NS4B, NS5B) an der Zellkulturadaptation von HCV-Replikonstrukten beteiligt (61). Das Auftreten adaptiver Mutationen könnte über eine Konformationsänderung einzelner viraler Proteine zu einer direkten Verstärkung der enzymatischen Aktivität führen. Zudem könnte eine veränderte Proteinstruktur Auswirkungen auf die Interaktion zwischen einzelnen Proteinen haben, was wiederum mit einer Verstärkung der Replikation der HCV-RNA in Zellkultur verbunden sein könnte. Für die in dieser Arbeit hergestellten Replikonstrukte wurde eine als adaptiv beschriebene Mutation innerhalb von NS5A (S2204I/R) gewählt. Da nach Insertion dieser Mutation in die Konsensussequenz der beiden Isolate 427 und 2879 keine stabile Replikation in Zellkultur erreicht wurde, könnten weitere Mutationen innerhalb von NS5A ausgewählt werden, die bei HCV Con1 als Einzelmutation die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur verstärken. Zudem besteht die Möglichkeit, Replikonstrukte der Genotyp-3a-Isolate mit einer unterschiedlichen Anzahl von Mutationen, die in Kombination miteinander bei HCV Con1 als hochgradig replikationsverstärkend beschrieben wurden, herzustellen (61).

Da nach Insertion von zwei als adaptiv beschriebenen Mutationen in die Konsensussequenz der beiden Isolate 427 und 2879 keine Replikation der transfizierten RNA Konstrukte nachgewiesen werden konnte, erfolgte als nächster Schritt ein Sequenzvergleich der in Zellkultur replizierenden Isolate der unterschiedlichen Genotypen bzw. Prototypsequenzen. Auf diese Weise sollten innerhalb NSP-kodierender Sequenzen weitere auf die Replikation möglicherweise



inhibitorisch wirkende Mutationen, die bei der Herstellung der jeweiligen Konsensusklone nicht berücksichtigt wurden, eliminiert werden. Daher wurden Replikonstrukte hergestellt, in denen abweichende AS vor allem innerhalb funktionell wichtiger Regionen ausgetauscht wurden.

Im NS3-Protein des Isolates 2879 erfolgte ein Austausch an der Aminosäureposition 1319 innerhalb eines unter den verschiedenen HCV-Genotypen vollständig konservierten Sequenzbereiches der Helikasedomäne. Es handelt sich hier um das sogenannte ‚Walker B Motiv‘, das an der Bindung der für die Helikaseaktivität essentiellen  $Mg^{2+}$ -Ionen beteiligt ist (51). Die im Isolat 2879 vorhandene AS Arginin konnte weder innerhalb der einzelnen Prototypsequenzen noch innerhalb der NS3-Sequenzen der in Zellen replizierenden Isolaten der unterschiedlichen Genotypen nachgewiesen werden. So war an dieser Aminosäureposition sowohl innerhalb der Genotyp 1b-Prototypsequenz HCV-J als auch in der Genotyp 3a-Prototypsequenz HCV K3a ein Histidin lokalisiert. Dieselbe AS war auch in den in Zellkultur replizierenden Isolaten HCV-con1, HCV-BK, HCV-N (Genotyp 1b) sowie innerhalb des Isolates HCV-H77 (Genotyp-1a) vorhanden. Innerhalb der Protease- sowie Helikasedomäne sind weitere, für die enzymatische Funktion wichtige konservierte Sequenzbereiche beschrieben. Mutationen innerhalb dieser Region führen zu einer verminderten enzymatischen Aktivität bzw. zur vollständigen Hemmung der Enzyme (17). Weitere Mutationen innerhalb der in dieser Arbeit hergestellten Konsensussequenzen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz innerhalb funktionell wichtiger Bereiche der Proteasedomäne führen, hätten möglicherweise negative Auswirkungen auf die korrekte Prozessierung des Polyproteins in die unterschiedlichen NSP. Aminosäureaustausche aufgrund von Mutationen innerhalb funktionell wichtiger Bereiche des für die Helikase kodierenden Sequenzbereiches würden sich negativ auf die Replikation der HCV-RNA auswirken.

Zusätzliche Aminosäureaustausche innerhalb der Konsensussequenz der beiden HCV-Isolate 427 und 2879 erfolgten innerhalb der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Bei Isolat 2879 handelte es sich hier um einen hochkonservierten Sequenzabschnitt im Bereich des ebenfalls konservierten Aminosäuremotives GDD, Bestandteil des Sequenzmotivs C (81). Mutationen in diesem Bereich führen

zu einer verminderten Aktivität bis hin zu einer vollständigen Inhibierung des Enzyms (83). Neben Motiv C wurden innerhalb NS5B weitere 4 konservierte und für die enzymatische Funktion wichtige Sequenzmotive beschrieben (Motiv A, B, C, D, E und F) (59, 63, 81). Mutationsanalysen in diesen Bereichen zeigten einen unterschiedlich stark inhibitorischen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der Polymerase (83). Bei Isolat 427 erfolgte der Austausch einer AS innerhalb eines Sequenzabschnittes, der bei der Bindung der RNA Matrize für die Synthese neuer RNA Stränge eine wichtige Rolle spielt (83).

Die im Verlauf der Klonierungsarbeiten hergestellten Replikonkonstrukte wurden in naive HuH-7 Zellen sowie in eine adaptierte Zelllinie (HuH-7 Lunet) transfiziert. Die Kolonien, die sich unter G418 bildeten wurden weiterkultiviert und auf HCV-RNA des Genotyps 3a untersucht. Mittels Northern-Hybridisierung konnte jedoch keine HCV-RNA des Genotyps 3a nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die Resistenz der Zellen gegenüber G418 bei fehlendem Nachweis von HCV-RNA könnte in der Integration von residualer Plasmid-DNA in das Genom der Zelle liegen.

Trotz der Generierung der Konsensusklone für die HCV-Isolate 427 und 2879 nach Vergleich von vier sequenzierten Klonen sowie des Austausches zusätzlicher Mutationen innerhalb konservierter und funktionell wichtiger Sequenzabschnitte kann das Vorhandensein weiterer Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Mutationen innerhalb des kodierenden Bereiches, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, haben möglicherweise Auswirkung auf die korrekte Faltung der einzelnen viralen Proteine. Bei Proteinen mit enzymatischer Funktion könnte dies die Funktionalität des Enzyms negativ beeinflussen. Zudem hätte eine veränderte Struktur einzelner Proteine möglicherweise einen negativen Effekt auf eine Interaktion zwischen viralen und zellulären Proteinen. Mit Ausnahme des NS3-Proteins besitzen die einzelnen NSP eine unterschiedliche Anzahl hydrophober Sequenzbereiche, die der Verankerung der Proteine in den Membranen des rauen ER dienen. Mutationen innerhalb dieser Transmembrandomänen würden sich u. U. auf die Verankerung der Proteine und somit auf die Bildung des für die Replikation wichtigen Replikationskomplexes negativ auswirken.

## 7.4 Verwendung einer adaptierten Zelllinie für die Transfektion der RNA-Konstrukte

Neben naiven HuH-7 Zellen wurde eine adaptive Zelllinie (HuH-7 Lunet) mit den generierten RNA-Transkripten des Genotyps 3a transfiziert. Es handelt sich um HuH-7 Zellen, die die Replikation subgenomischer HCV-RNA bereits erfolgreich unterstützten, und in denen das Replikon durch Behandlung mit Interferon-2 $\alpha$  eliminiert wurde. Nach Transfektion dieser ‚geheilten‘ HuH-7 Zellen mit HCV RNA des Genotyps 1b führen in einem höheren Prozentsatz der Zellen zu einer Replikation der HCV-RNA (32). Die Ursache für die erhöhte Permissivität dieser Zelllinie ist bisher noch nicht geklärt. Von Blight et al. wurde eine adaptierte Zelllinie (HuH-7.5) beschrieben, in der nach erneuter Transfektion von HCV-RNA bei einem erhöhten Prozentsatz der Zellen eine Replikation stattfindet (12). Bei diesen Zellen konnte ein Defekt innerhalb des Signalweges der angeborenen Immunität nachgewiesen werden. Anhand von Sequenzanalysen wurde eine Punktmutation innerhalb des ‚sensor retinoic acid inducible gene‘ (RIG-I) gefunden. Bei RIG-I handelt es sich um eine zelluläre Helikase, die durch doppelsträngige RNA wie z. B. HCV-RNA aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (Interferonregulierender Faktor 3) verbunden mit dessen Translokation in den Zellkern. Durch Bindung von IRF-3 am IFN- $\beta$ -Promotor erfolgt die Induktion von Typ-1-Interferonen. Die in diesen Zellen nachgewiesene Mutation innerhalb von RIG-I verhindert die Phosphorylierung von IRF-3 einschließlich dessen Translokation in den Zellkern (97).

Nach Transfektion dieser adaptierten Zellen (HuH-7 Lunet) mit HCV-RNA des Genotyps 3a konnte nach einem Transfektionsansatz HCV-RNA des Genotyps 1b nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte in einer Transfektion einer nur unvollständig geheilten Zelle liegen, in der es zu einer erneuten Replikation der ursprünglich in den Zellen vorhandenen HCV-RNA des Genotyps 1b gekommen ist.

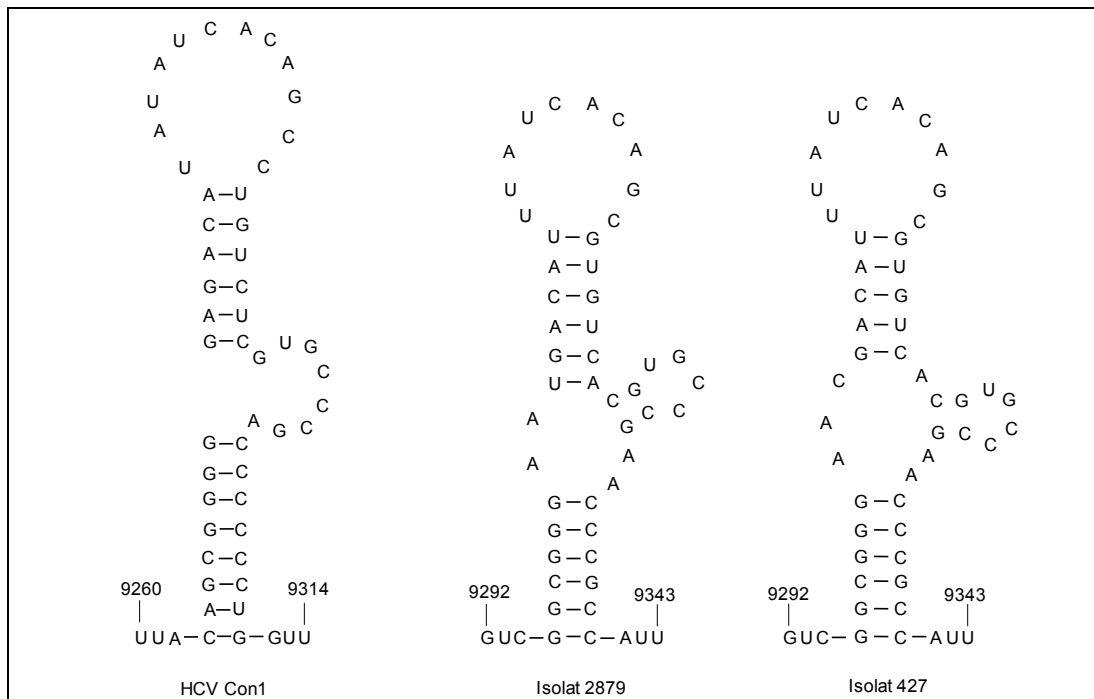
## **7.5 Die Bedeutung von RNA-Elementen in den NTRs sowie den kodierenden Bereichen für die Replikation der HCV-RNA**

Die Transfektion der hergestellten Replikonkonstrukte der beiden Isolate 427 und 2879 basierend auf der Konsensussequenz führte zu keiner erfolgreichen Replikation der HCV-RNA in Zellkultur. Nach Insertion von als adaptiv beschriebenen Mutationen konnten ebenfalls keine Zellen selektioniert werden, in denen HCV-RNA des Genotyps 3a erfolgreich repliziert. Die in dieser Arbeit hergestellten Replikonkonstrukte enthielten neben der NSP-kodierenden Region des Genotyps 3a die nicht-translatierten Sequenzen (3'NTR, 5'NTR) des Isolates HCV Con1 (Genotyp 1b). Es gibt Hinweise auf eine für die Replikation der HCV-RNA möglicherweise essentielle Interaktion viraler Proteine mit den nicht-kodierenden Regionen des HCV. Von Huang et al. konnte eine Bindung aufgereinigten NS5A-Proteins an subgenomische Replikon-RNA innerhalb der 3'NTR nachgewiesen werden (46). Neben dem NS5A-Protein spielen möglicherweise weitere virale Proteine durch Interaktion mit den nicht-translatierten Regionen eine wichtige Rolle bei der Replikation der HCV-RNA. Zudem ist nicht bekannt, ob eine mögliche Interaktion zwischen viralen Proteinen und den nicht-translatierten Regionen des HCV genotypspezifisch ist. Da die in dieser Arbeit hergestellten Replikonkonstrukte die kodierende Region (Genotyp 3a) und die nicht-translatierten Sequenzen (Genotyp 1b) unterschiedlicher Genotypen enthielten, könnte dies ein weiterer Grund für eine fehlende Replikation der HCV-RNA in Zellkultur sein. Daher wurde ein Konstrukt hergestellt, welches sowohl die NSP-kodierende Region als auch die 3'NTR des Genotyps 3a enthielt. Da die 3'NTR des Isolates 427 aus dem Serum nicht erfolgreich amplifiziert werden konnte, wurde für die Amplifikation dieser Region ein weiteres Isolat des Genotyps 3a ausgewählt. Der für die Amplifikation der 3'NTR verwendete Senseprimer wies hinter der Schnittstelle (PmlI) am 3'Ende der NS5B-kodierenden Region die Konsensussequenz des Isolates 427 auf. Die Sequenz innerhalb dieses Bereiches war somit von der Primersequenz vorgegeben. Der Antisenseprimer, der an seinem 5'Ende die für die Ligation erforderliche Schnittstelle (SpeI) enthielt, wurde komplementär zum 3'Ende der konservierten Region innerhalb der 3'NTR

generiert. Somit war die Sequenz des C-terminalen Abschnittes von NS5B und der 3'Bereich der X-Sequenz durch den entsprechenden Primer definiert. Der verbleibende Abschnitt der 3'NTR war von der Sequenz des aus dem Patientenserum amplifizierten Isolates vorgegeben. Transfektionsversuche dieses generierten Replikonkonstruktes führten ebenfalls zu keiner erfolgreichen Replikation von HCV-RNA des Genotyps 3a in Zellkultur.

Von unterschiedlichen Arbeitgruppen wurde am 3'Ende der NS5B-kodierenden Region mit Hilfe eines RNA-Sekundärstruktur-Vorhersageprogramm eine Anzahl von RNA-Strukturen vorausgesagt. Analysen ergaben in diesem Bereich 3 potentielle RNA-Elemente, die als NS5BSL3.1, NS5BSL3.2, NS5BSL3.3. bezeichnet werden (45, 104). Untersuchungen zur Bedeutsamkeit dieser RNA-Elemente für die Replikation des HCV in Zellkultur führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Lee et al. konnten sowohl für die RNA-Struktur NS5BSL3.1 als auch für das RNA-Element NS5BSL3.2 eine essentielle Funktion für die Replikation der viralen RNA in Zellkultur nachweisen (56). Eine Strukturveränderung dieser RNA-Elemente (NS5BSL3.1, NS5BSL3.2) durch Mutationen verhindert die Ausbildung von Kolonien nach Transfektion von HCV-RNA. Hingegen konnte von You et al. sowie von Friebe et al. lediglich für die RNA-Struktur NS5BSL3.2 eine essentielle Funktion für die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur gezeigt werden. Nukleotidsubstitutionen innerhalb der RNA-Strukturen NS5BSL3.1 und -SL3.3 haben keinen Effekt auf die Replikation der HCV-RNA. Mutationen, die die Basenpaarung und somit die Sekundärstruktur von NS5BSL3.2 zerstören, führen zu einer vollständigen Hemmung der Replikation von HCV-RNA in Zellkultur (32, 114). NS5BSL3.2 bildet einen Stem sowie eine Schleife von 12 Nukleotiden. Zusätzlich enthält dieses RNA-Element im Bereich des Stems eine Bulge-Struktur von 8 Nukleotiden. Deletionen sowie Punktmutationen innerhalb der Sequenz, die die Ausbildung des Loop sowie des Bulge verändern, führen zu einem Verlust der Replikationskompetenz der RNA-Konstrukte in Zellkultur. Neben der Bedeutsamkeit der Loop-Struktur von NS5BSL3.2 konnte für die Bulge-Region eine wichtige Funktion für die HCV-Replikation nachgewiesen werden. Eine Deletion von drei Nukleotiden innerhalb der Bulge-Sequenz führt zu einem Verlust der Replikationskompetenz der HCV-RNA in Zellkultur (32). Jedoch kann nach

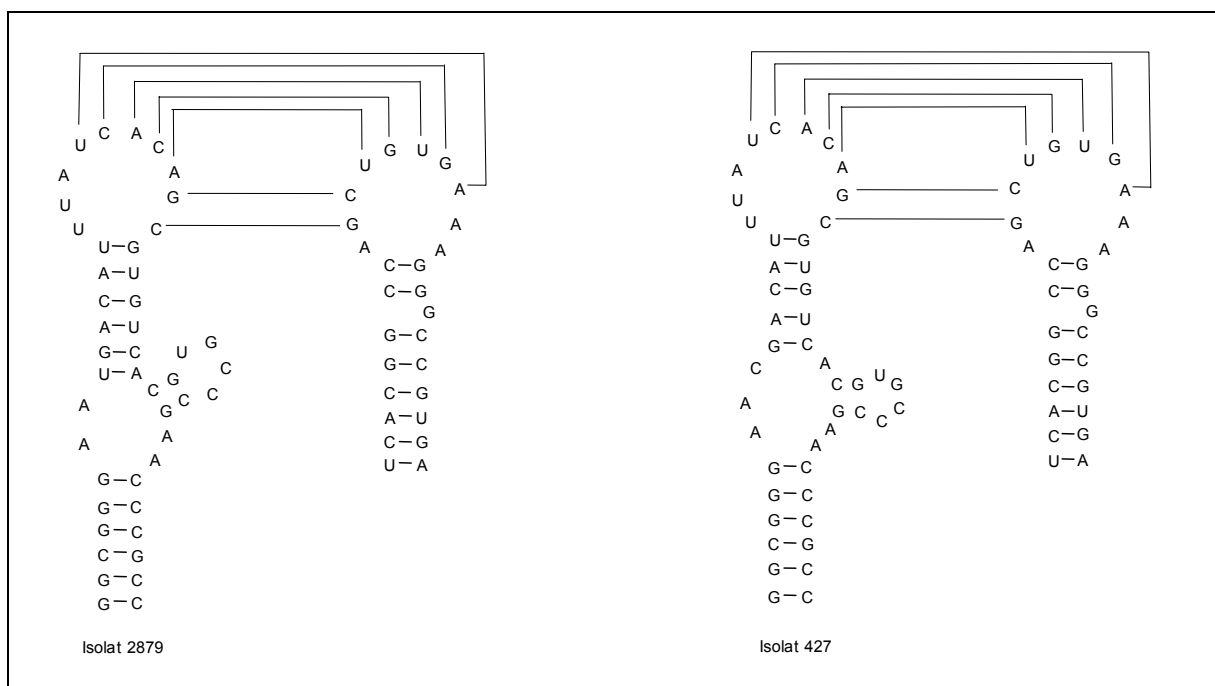
Zerstörung der Sekundärstruktur von NS5BSL3.2 in der NS5B-Region durch eine Insertion der intakten RNA-Elemente NS5BSL3.1-3.3 in die variable Region der 3'NTR die Replikation des defekten Replikons wiederhergestellt werden. Darüber hinaus führt lediglich die Insertion der Struktur NS5BSL3.2 in die variable Region der 3'NTR zu einer Komplementation der RNA-Replikation, die allerdings 10-15 fach niedriger ist als die des Ausgangsreplikons (32). Nachdem die bisherigen Versuche zur Etablierung eines Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA der beiden Isolate 427 und 2879 auf Basis der Konsensussequenz ergebnislos verliefen, wurde nach weiteren Ursachen gesucht, die die Replikation der HCV-RNA des Genotyps 3a in Zellkultur verhindern. Da für das RNA-Element NS5BSL3.2 innerhalb der NS5B-kodierenden Region des Genotyps 1b eine essentielle Rolle bei der Replikation bestätigt wurde, erfolgte eine Analyse dieser RNA-Struktur innerhalb der Sequenzen der Isolate 427 sowie 2879 mit dem Sekundärstruktur-Vorhersageprogramm „mfold“ (119). Abbildung 27 zeigt die vorhergesagte Struktur des RNA-Elementes NS5BSL3.2 von HCV Con1 sowie den Isolaten 427 und 2879. Im Vergleich zu Isolat HCV Con1 weisen die Isolate 427 und 2879 eine deutlich veränderte Ausbildung der Bulge-Struktur auf.



**Abbildung 27: Vorhergesagte Sekundärstruktur des RNA-Elementes NS5BSL3.2. Angegeben sind die Strukturen und die Nukleotidsequenzen von HCV Con1 und den Isolaten 427 und 2879.**

Die veränderten Strukturen innerhalb des für die Replikation essentiellen RNA-Elementes wirken sich möglicherweise störend auf die RNA-Replikation der Isolate 427 und 2879 aus. Die veränderte RNA-Struktur NS5BSL3.2 innerhalb von NS5B kann daher als weitere Ursache für eine fehlende Replikation der Genotyp-3a-Konstrukte in Betracht gezogen werden.

Strukturanalysen ergaben komplementäre Sequenzmotive zwischen dem RNA-Element NS5BSL3.2 und der Struktur SL2 innerhalb der konservierten Region der 3'NTR (X-Sequenz). Diese Sequenzmotive liegen im einzelsträngigen Bereich. Mutationen, die die Komplementarität innerhalb der Sequenzmotive unterbrechen, führen zu einem Verlust der viralen RNA-Replikation in Zellkultur (32). Wurde die Komplementarität zwischen beiden RNA-Strukturen durch Mutationen mit veränderter Primärsequenz wiederhergestellt, konnte eine Replikation der HCV-RNA in Zellen nachgewiesen werden, wobei die Effizienz deutlich unter der des Wildtyp-Replikons lag. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen den RNA-Strukturen NS5BSL 3.2 und SL2, sowie die Bedeutsamkeit dieser Interaktion für die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur.



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der beiden RNA-Elemente NS5BSL3.2 und XT-SL2 von Isolaten 427 und 2879.** Die komplementären Sequenzmotive sind durch Linien angedeutet.

Analysen der in dieser Arbeit hergestellten Konsensussequenzen der beiden Isolate 427 und 2879 konnten das Vorhandensein der für die Replikation essentiellen Komplementarität zwischen den RNA-Elementen NS5BSL 3.2 und SL2 bestätigen (Abbildung 28). Übertragen auf die in der vorliegenden Arbeit generierten Replikonstrukte, die neben den NSP des Genotyps 3a die ursprünglich im Vektor vorhandene 3'NTR des Genotyps 1b enthalten, könnte versucht werden, durch eine Insertion der intakten RNA-Elemente NS5BSL3.1- 3.3 in die variable Region der 3'NTR eine Replikation der HCV-RNA in Zellkultur zu erreichen. Zudem kann mittels Punktmutationen die Primärsequenz innerhalb der NS5B-kodierenden Regionen der beiden Isolate 427 und 2879 so verändert werden, daß die für die Replikation essentiellen Sekundärstrukturen wiederhergestellt werden.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich weitere bis dato unbekannte für die Replikation essentielle RNA-Elemente innerhalb der NSP-kodierenden Region der beiden Isolate 427 und 2879 befinden. Die Herstellung der Konsensussequenzen erfolgte auf Grundlage der Aminosäuresequenz. Somit wurden Mutationen auf Nukleinsäureebene, die zu keiner Änderung der AS führten, nicht berücksichtigt. Diese Mutationen hätten möglicherweise über eine veränderte Ausbildung funktionell wichtiger RNA-Strukturen eine negative Auswirkung auf die Replikation der HCV-RNA in Zellkultur.

## **7.6 Replikationsmodelle bei Vertretern aus den Familien *Flaviviridae* und *Togaviridae***

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen für eine Reihe von RNA Viren mit positiver Orientierung Replikonsysteme zur Verfügung. Die ersten Replikonsysteme wurden bei Sindbis- sowie Semliki Forest Virus, beides Vertreter der Familie *Togaviridae*, beschrieben, die auch zur Genexpression in eukaryontischen Zellen genutzt werden (79). Die in den letzten Jahren etablierten Replikonsysteme der unterschiedlichen Viren stellen ein wichtiges und nützliches Modell für die Untersuchung molekularbiologischer Aspekte der jeweiligen Viren in Zellkultur dar. Zudem bieten diese zellkulturbasierten Testsysteme die Möglichkeit der Selektion



neu synthetisierter Substanzen bezüglich ihrer antiviralen Effektivität. Die Transfektion von Zellen mit viraler RNA, die die Gesamtheit der viralen Gene umfaßt, ermöglicht die Untersuchung der Replikation sowie Translation bis hin zur Bildung der Virionen und deren Ausschleußung aus der Zelle. Aufgrund der Bildung infektiöser Viruspartikel ist ein solches System u.U. nur begrenzt einsetzbar, da das Arbeiten mit diesem System eine erhöhte Sicherheitsstufe erfordert und somit weniger praktikabel wäre. Im Unterschied dazu wurden die Gene, die für die Strukturproteine kodieren aus dem von uns produzierten subgenomischen Replikon deletiert, sodaß es sich hier um kein infektiöses System handelt.

Aufgrund der engen Verwandtschaft zu HCV und der seit einigen Jahren zur Verfügung stehenden Replikationsmodelle wurden eine Reihe von vergleichenden Untersuchungen unter Verwendung von Zellkultursystemen mit replizierender RNA unterschiedlicher Vertreter der Genera Pestivirus und Flavivirus durchgeführt. So wurde parallel zum HCV die antivirale Wirkung von IFN- $\alpha$  bzw. Ribavirin an Replikationsmodellen mit replizierender viraler RNA der Bovinen Virusdiarrhoe sowie des Gelbfiebervirus untersucht (14, 22). Auch bei diesen Viren konnte ein additiver Effekt dieser beiden Substanzen in Zellkultur nachgewiesen werden. Ferner wurde die Entwicklung antiviral wirkender Substanzen beschrieben, die die virale Polymerase und somit die Synthese viraler RNA von BVDV hemmen, jedoch ohne Wirkung auf die virale Replikation von Viren anderer Virusfamilien sind (4). Zudem konnte nach Zugabe von Aminosucker-Derivaten in Zellkultur ein inhibitorischer Effekt auf die Bildung und Sekretion von Viren der Bovinen Virus Diarrhoe nachgewiesen werden. Durch eine Bindung an die  $\alpha$ -Glukosidase I und II des ER blockieren sie die Abspaltung von 3 Glukoseresten neu synthetisierter Polypeptide und verhindern auf diese Weise die Interaktion mit den Chaperonen des ER (118). Es kommt somit zu keiner korrekten Faltung der Proteine im ER.

## **7.7 Strategien zur Herstellung eines Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA des Genotyps 3a**

Für die erfolgreiche Etablierung eines Zellkultursystems mit replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV Genotyp 3a werden weitere Strategien überlegt.

### **1. Generierung von Replikonkonstrukten, die neben dem NSP-kodierenden Abschnitt die nicht-translatierten Regionen des Genotyps 3a enthalten**

Eine für die Replikation u.U. essentielle Interaktion viraler Proteine mit den nicht-translatierten Regionen 5'NTR und 3'NTR des HCV wurde bereits in Kapitel 7.5 erwähnt. Nicht bekannt ist, ob diese Interaktion genotypspezifisch ist. Es ist daher naheliegend, Replikonkonstrukte der beiden Isolate 427 und 2879 herzustellen, die neben der NSP-kodierenden Region die 3'NTR sowie die 5'NTR des Genotyps 3a enthalten.

### **2. Wiederherstellung bzw. Insertion der RNA-Strukturen NS5BSL 3.1 bis 3.3 in die variable Region der Genotyp 3a Replikonkonstrukte**

Auf die Bedeutung von RNA-Elementen innerhalb der NS5B-kodierenden Region wurde bereits im Kapitel 7.5 näher eingegangen. Bei den in dieser Arbeit hergestellten Replikonkonstrukten könnte versucht werden durch Insertion der NS5B-Elemente in die variable Region eine Replikation der HCV-RNA in Zellkultur zu erreichen. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit der Wiederherstellung der für die Replikation essentielle RNA-Struktur NS5BSL3.2 innerhalb der NS5B-kodierenden Region. Durch eine Insertion stiller Punktmutationen könnten die veränderten RNA-Elemente der beiden Isolate 427 und 2879 wiederhergestellt werden, ohne dabei die kodierende Sequenz zu verändern.

### **3. Herstellung von Replikonkonstrukten der Isolate 427 und 2879 mit weiteren als adaptiv beschriebenen Mutationen**

Für die Etablierung eines Replikonsystems mit replizierender HCV-RNA des HCV-Genotyps 3a können weitere Mutationen ausgewählt werden, die bei HCV Con1 in

Zellkultur als adaptiv beschrieben wurden. Es besteht die Möglichkeit der Insertion von Mutationen innerhalb von NS5A, die als Einzelmutationen die Replikation in Zellkultur in unterschiedlichem Maß verstärken. Zudem können Mutationen ausgewählt werden, die in Kombination miteinander das Replikationsniveau der HCV-RNA in Zellkultur erhöhen.

#### **4. Herstellung von Replikonkonstrukten des Genotyps 1b, die unterschiedliche Proteinanteile des Genotyps 3a enthalten**

Eine erfolgreiche Replikation von Replikonkonstrukten des Genotyps 1b, die das NS5A Protein des Genotyps 3a enthalten, wurde bereits publiziert (55). Weitere Ansätze könnten in der Herstellung von Replikonkonstrukten des Genotyps 1b, die weitere NSP (NS3, NS4A, NS4B, NS5B) des Genotyps 3a enthalten, bestehen.

## 8 Zusammenfassung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein umhülltes Virus aus der Familie der *Flaviviridae*. Es besitzt eine RNA mit positiver Orientierung. Das Genom enthält ca. 9600 Nukleotide, die für ein einziges Polyprotein mit einer Länge von ca. 3000 AS kodieren. An beiden Seiten des Genoms befindet sich jeweils eine nicht-translatierte Region (5'NTR, 3'NTR). Das Polyprotein wird co- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in mindestens 10 Proteine gespalten. Lange Zeit stand kein geeignetes Zellkultursystem mit replizierender HCV-RNA zur Verfügung. Das vor einigen Jahren entwickelte Replikationsmodell mit replizierenden subgenomischen Abschnitten von HCV-RNA des Genotyps 1b ermöglicht neben der Untersuchung des viralen Replikationszyklus und der Proteinexpression die Austestung von antiviralen Substanzen. Nachfolgend wurden Isolate weiterer Genotypen (1a/b, 2a) beschrieben, die in Zellkultur erfolgreich replizieren. Mit Ausnahme des HCV-Genotyps 2a steht für die entwickelten Replikonsysteme keine Information der jeweiligen HCV Isolate bezüglich Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber einer IFN-basierten Therapie im Patienten zu Verfügung. Ein System mit replizierender subgenomischer HCV-RNA des Genotyps 3a wurde bis dato nicht beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von Replikonkonstrukten von HCV-Isolaten des Genotyps 3a. Für die Herstellung dieser Replikonkonstrukte wurden Isolate ausgewählt, die unterschiedlich auf die Therapie angesprochen hatten, was im späteren Verlauf vergleichende Untersuchungen bei der Erforschung von Resistenzmechanismen der einzelnen HCV Isolate ermöglichen sollte. Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation des gesamten Genomabschnittes, der für die Nichtstrukturproteine NS3-NS5B kodiert. Nach Analyse der Aminosäuresequenz der Proteine NS3-NS5B von vier Klonen wurden von beiden Isolaten die entsprechenden Konsensusklone generiert, auf deren Basis RNA-Replikonkonstrukte hergestellt wurden. Zusätzlich erfolgte die Generierung von Replikonkonstrukten, die eine Mutation in den einzelnen NS-Genen NS3, NS4B, NS5A enthielten, die bereits bei anderen in Zellkultur replizierenden Isolaten als adaptiv beschrieben worden waren. Zudem wurden Replikonkonstrukte hergestellt, die neben den Nichtstrukturproteinen die 3'NTR eines Genotyp 3a-Isolates enthielten. Es erfolgte die Transfektion von naiven HuH-7 Zellen sowie einer

---

adaptierten Zelllinie (HuH-7.5) mit den in dieser Arbeit hergestellten Replikonkonstrukten. Parallel wurden HuH-7 Zellen mit dem bereits etablierten Replikonkonstrukt vom Genotyp 1b transfiziert. Nach Transfektion der Zellen mit den in dieser Arbeit hergestellten Replikonkonstrukten konnten unter G418 keine Zellen selektioniert werden, in denen HCV-RNA des Genotyps 3a erfolgreich replizierte. Zusammenfassend konnte der Versuch ein HCV-Replikonsystem mit replizierenden subgenomischen Abschnitten des Genotyps 3a zu etablieren, nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

## 9 Summary

Hepatitis C virus is a positive-strand RNA virus that belongs to the family *Flaviviridae*. Its genome of about 9.6 kb is composed of the 5' non-translated region (5'NTR), an open reading frame encoding for a large polyprotein of approximately 3000 amino acid residues and the 3'NTR. This polyprotein is co- and post-translationally processed by host and viral proteases into at least 10 distinct products. For a long time, a cell culture model was not available in which HCV RNA replicates efficiently, thus allowing to study HCV replication as well as the evaluation of antiviral drugs. The establishment of a cell culture system based on the transfection of cloned viral consensus genome sequence HCV Con1 genotype 1b replicating in HuH-7 cells opened the possibility to study HCV translation and RNA replication in human hepatoma derived (HuH 7) cells. During the last years replication competent replicons have been constructed including genotypes 1a/b and 2a. With the exception of genotype 2a isolate, the interferon sensitivity of the 'parenteral' virus from which the existing replicons have been generated was unknown. A replicon system with HCV genotype 3a has not been established. Accordingly, the aim of the study was to establish a replicon system with replicating HCV RNA based on HCV 3a isolates from patients that show sustained virologic response and a non sustained response, respectively, to IFN- $\alpha$ /Ribavirin combination therapy. This replicon system should provide a tool for the investigation of mechanisms inducing resistance to IFN-alpha based therapy. Using long-distance RT-PCR, the complete ORF of each isolate containing the NS proteins, NS3-NS5B, was amplified. The sequences of four clones of each isolate were analyzed followed by the generation of constructs based on the viral consensus genome sequence. Replicon constructs were generated containing the wildtype consensus genome and adaptive mutations in NS3, NS4B and NS5A that enhance replication of HCV con 1 in cell culture. Furthermore, replicon constructs were produced containing the 3'NTR from a genotype 3a isolate. Naive HuH-7 cells and an adapted HuH-7 cell line were transfected with *in vitro* transcripts corresponding to the cloned subgenomic genomes. In parallel a replicon construct containing the HCV con1 was transfected into HuH-7 cells. Cells were selected with G418 and the clones obtained after

transfection were analyzed. However no HCV-RNA could be detected for wildtype or adaptive constructs.

## 10 Abkürzungen

3' NTR:	3' nicht-translatierte Region
5' NTR:	5' nicht-translatierte Region
amp <sup>®</sup> :	Ampicillin-Resistenz
A. dest:	„Aqua destillata“ (destilliertes Wasser)
ALT:	Alaninaminotransferase
AS:	Aminosäure
bp:	Basenpaare
BVDV:	bovine viral diarrhoea virus“ (Virus der bovinen viralen Diarrhöe)
°C:	Grad Celsius
cDNA:	komplementäre DNA
CIP:	„Calf-intestinal phosphatase“; alkalische Phosphatase
C-Terminal:	carboxyterminal
DMEM:	„Dulbecco's modified Eagle's medium“
DMPC:	Dimethyl-Pyrocbonat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonuklosidtriphosphat
ddNTP:	Dideoxynukleotidtriphosphat
DIG:	Digoxigenin
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DTT:	Dithiothreitol
<i>E.coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	IRES des Encephalomyocarditisvirus
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMCV:	Encephalomyocarditisvirus
ER:	endoplasmatisches Retikulum
HCV:	Hepatitis-C-Virus
HVR:	Hypervariable Region
IFN- $\alpha$ :	Interferon- $\alpha$
IRF-3	„Interferon regulatory factor 3“, Interferon-regulierender Faktor-3
ISDR:	Interferon-Sensitivität determinierende Region
IRES:	interne Ribosomen Eintrittsstelle, „internal ribosome entry site“
Kb:	Kilobasenpaare
kDa:	Kilo-Dalton
LB:	Luria-Bertani
MG:	Molekulargewicht
MOPS:	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA:	„messenger“RNA
NaAc:	Natriumacetat
NaCl:	Natriumchlorid
NANBH:	NonA-NonB Hepatitis
NSP:	Nichtstrukturprotein



nt:	Nukleotid
N-terminal:	aminoterminal
N-Terminus:	Aminoterminus
OD:	optische Dichte
PBS:	„Phosphat buffered saline“; Standard Phosphatpuffer
PePHD:	PKR/eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierungs-Homologie-Domäne
PCR:	“Polymerase-chain reaction”; Polymerase Kettenreaktion
PKR:	Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	reverse Transkription
RT-PCR:	reverse Transkription mit anschließender Polymerase Kettenreaktion
UpM:	Umdrehungen pro Minute
Vol:	Volumen

## Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## 11 Referenzen

1. Agnello V, Abel 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 U S A* 1999;96:12766-12771.
2. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
3. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 2005;79:3187-3194.
4. Baginski SG, Pevear DC, Seipel M, Sun SC, Benetatos CA, Chunduru SK, Rice CM, Collett MS. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7981-7986.
5. Bare P, Massud I, Parodi C, Belmonte L, Garcia G, Nebel MC, Corti M, Pinto MT, Bianco RP, Bracco MM, Campos R, Ares BR. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients. *J Gen Virol* 2005;86:1717-1727.
6. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J Virol* 1993;67:3835-3844.
7. Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol* 1998; 72:2364-2372.
8. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 1996;15:12-22.
9. Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, Gowans EJ. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 1994;20:553-557

10. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV-RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974.
11. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003;77:3181-3190.
12. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002;76:13001-13014.
13. Bradley DW. Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:1-23.
14. Buckwold VE, Wei J, Wenzel-Mathers M, Russell J. Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and ribavirin against bovine viral diarrhea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2293-2298.
15. Bukh J, Pietschmann T, Lohmann V, Krieger N, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, Shapiro M, St Claire M, Bartenschlager R. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14416-14421.
16. Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 2002;76:3720-3730.
17. Chang SC, Cheng JC, Kou YH, Kao CH, Chiu CH, Wu HY, Chang MF. Roles of the AX4GKS and arginin-rich motifs of hepatitis C virus RNA helicase in ATP- and viral RNA-binding activity. *J Virol* 2000;74:9732-9737.
18. 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;244:359-362.
19. Collett MS, Larson R, Belzer SK, Retzel E. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 1988;165:200-208.
20. Date T, Kato T, Miyamoto M, Zhao Z, Yasui K, Mizokami M, Wakita T. Genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon can replicate in HepG2 and IMY-N9 cells. *J Biol Chem* 2004;279:22371-22376.

21. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 1997;71:697-704.
22. Durantel D, Carrouee-Durantel S, Branza-Nichita N, Dwek RA, Zitzmann N. Effects of interferon, ribavirin, and iminosugar derivatives on cells persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:497-504.
23. Eckart MR, Selby M, Masiarz F, Lee C, Berger K, Crawford K, Kuo C, Kuo G, Houghton M, Choo QL. The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:399-406.
24. Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, 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.
25. El-Hage N, Luo G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* 2003;84:2761-2769
26. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224-230.
27. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.
28. Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13038-13043.
29. Failla C, Tomei L, De Francesco R. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* 1994;68:3753-3760.

30. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Ed.). *Virus Taxonomy: The Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
31. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM, Gale M, Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003;300:1145-1148.
32. Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R. Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* 2005;79:380-392.
33. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
34. Frolov I, McBride MS, Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA* 1998;4:1418-1435.
35. Gale MJ, Jr., Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-227.
36. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4498-4503.
37. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, Moradpour D. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77:5487-5492.
38. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-1395.
39. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-38.

40. Grobler JA, Markel EJ, Fay JF, Graham DJ, Simcoe AL, Ludmerer SW, Murray EM, Migliaccio G, Flores OA. Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *J Biol Chem* 2003;278:16741-16746.
41. Gwack Y, Kim DW, Han JH, Choe J. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:654-659.
42. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H, Jr., Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.
43. Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 2000;74:9498-9506.
44. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:4665-4675.
45. Hofacker IL, Fekete M, Flamm C, Huynen MA, Rauscher S, Stolorz PE, Stadler PF. Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acid Res* 1998;26:3825-3836.
46. Huang L, Hwang J, Sharma SD, Cameron CE. Hepatitis C virus nonstructural Protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005;280:36417-36428.
47. Ikeda M, Yi M, Li K, Lemon SM. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol* 2002;76:2997-3006.
48. Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, Hijikata M, Asabe S, Kimura K, Shimotohno K. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:320-326.

49. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, Wakita T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003;125:1808-1817.
50. Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Mizokami M, Wakita T. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol* 2005;79:592-596.
51. Kim DW, Kim J, Gwack Y, Han JH, Choe J. Mutational analysis of the hepatitis C virus RNA helicase. *J Virol* 1997;71:9400-9409.
52. Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-3371.
53. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture- adaptive mutations. *J Virol* 2001;75:4614-4624.
54. Kurosaki M, Enomoto N, Marumo F, Sato C. Evolution and selection of hepatitis C virus variants in patients with chronic hepatitis C. *Virology* 1994;233:43-50.
55. Lanford EL, Guerra B, Lee H. Hepatitis C virus genotype 1b chimeric replicon containing genotype 3 NS5A domain. *Virology* 2006;355:192-202.
56. Lee H, Shin H, Wimmer E, Paul AV. cis-acting RNA signals in the NS5B c-terminal coding sequence of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 2004;78:10865-10877.
57. Lee KJ, Choi JC, Ou J, Lai MMC. The C-terminal transmembrane domain of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase is essential for HCV replication in vivo. *J Virol* 2004;78:3797-3802.
58. Lerat H, Berby F, Trabaud MA, Vidalin O, Major M, Trepo C, Inchauspe G. Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* 1996;97:845-851.
59. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 1999;6:937-943.
60. Li Y, McNally J. Characterization of RNA synthesis and translation of bovine viral diarrhea virus (BVDV). *Virus Genes* 2001;23:149-155.

61. Lohmann V, Hoffmann S, Herian U, Penin F, Bartenschlager R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* 2003;77:3007-3019.
62. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001;75:1437-1449.
63. Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 1997;71:8416-8428.
64. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-113.
65. Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 2003;77:5428-5438.
66. Major ME, Feinstone SM. Characterization of hepatitis C virus infectious clones in chimpanzees: long-term studies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:279-298.
67. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.
68. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gomez J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: Quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229
69. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.
70. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 1991;180:602-616.



71. Meyers G, Thiel HJ. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J Virol* 1995;69:3683-3689.
72. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus and flavivirus as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2057-2061.
73. Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol* 1994;68:6215-6222.
74. Moldvay J, Deny P, Pol S, Brechot C, Lamas E. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cell of infected patients by in situ hybridization. *Blood*;1994:269-273
75. Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. Membran association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004;78:13278-13284.
76. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3392-3396
77. Oh JW, Ito T, Lai MM. A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J Virol* 1999;73:7694-7702.
78. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6104-6108.
79. Perri S, Driver DA, Gardner JP, Sherrill S, Belli BA, Dubensky TW, Jr., Polo JM. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J Virol* 2000;74:9802-9807.
80. Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002;76:4008-4021.

81. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 1989;8:3867-3874.
82. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998;352:1426-1432.
83. Qin W, Yamashita T, Shirota Y, Lin Y, Wei W, Murakami S. Mutational analysis of the structure and functions of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Hepatology* 2001;33:728-737.
84. Reusken CB, Dalebout TJ, Eerligh P, Bredenbeek PJ, Spaan WJ. Analysis of hepatitis C virus/classical swine fever virus chimeric 5'NTRs: sequences within the hepatitis C virus IRES are required for viral RNA replication. *J Gen Virol* 2003;84:1761-1769.
85. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, . Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6547-6549.
86. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK, Zeuzem S. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 2000;181:432-441.
87. Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013.
88. Sarrazin C, Bruckner M, Herrmann E, Ruster B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 2001;289:150-163.

89. Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090.
90. Sarrazin C, Kornetzky I, Ruster B, Lee JH, Kronenberger B, Bruch K, Roth WK, Zeuzem S. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000;31:1360-1370.
91. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, 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.
92. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin I, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
93. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74 ( Pt 11):2391-2399.
94. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78 ( Pt 2):321-328.
95. Stuyver LJ, McBrayer TR, Tharnish PM, Hassan AE, Chu CK, Pankiewicz KW, Watanabe KA, Schinazi RF, Otto MJ. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J Virol* 2003;77:10689-10694.
96. Stuyver LJ, Whitaker T, McBrayer TR, Hernandez-Santiago BI, Lostia S, Tharnish PM, Ramesh M, Chu CK, Jordan R, Shi J, Rachakonda S, Watanabe KA, Otto MJ, Schinazi RF. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:244-254.
97. Sumpter R, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replicating through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*;2005:2689-2699.

98. Suzich JA, Tamura JK, Palmer-Hill F, Warrener P, Grakoui A, Rice CM, Feinstone SM, Collett MS. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993;67:6152-6158.
99. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996;70:3307-3312.
100. Tanji Y, Kaneko T, Satoh S, Shimotohno K. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J Virol* 1995;69:3980-3986.
101. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.
102. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1992;181:293-300.
103. Tomei L, Failla C, Santolini E, De Francesco R, La Monica N. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* 1993;67:4017-4026.
104. Tuplin A, Wood J, Evans D, Patel AH, Simmonds P. Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA* 2002;8:824-841.
105. Vassilev VB, Collett MS, Donis RO. Authentic and chimeric full-length gnomonic cDNA Clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J Virol* 1997;71:471-478.
106. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
107. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001;7:710-721.
108. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* 1993;67:3338-3344.

- 
109. Ward CD, Flanagan JB. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J Virol* 1992;66:3784-3793.
110. Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol* 1988;62:558-562.
111. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL, Houghton M, . Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991;180:842-848.
112. Xu Z, Choi J, Yen TS, Lu W, Strohecker A, Govindarajan S, Chien D, Selby MJ, Ou J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 2001;20:3840-3848.
113. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998;72:6048-6055.
114. You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004;78:1352-1366.
115. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000;343:1666-1672.
116. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 2004;40:993-999.
117. Zhong W, Uss AS, Ferrari E, Lau JY, Hong Z. De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* 2000;74:2017-2022.
118. Zitzmann N, Mehta AS, Carrouee S, Butters TD, Platt FM, McCauley J, Blumberg BS, Dwek RA, Block TM. Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: Implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11878-11882.

- 
119. Zucker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406-3415.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

PD Dr. Christoph Sarrazin danke ich für die gute Betreuung und die fachliche Unterstützung meiner Arbeit im Labor sowie für die Durchsicht der Doktorarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für seine Bereitschaft, das Erstgutachten für meine Arbeit zu erstellen.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Bartenschlager bedanken, insbesondere bei Volker Lohmann für die geduldige Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden, sowie Nicole Appel, Marc Windisch, Peter Friebe, Thomas Pietschmann und Ulrike Herian.

Ferner möchte ich mich bei allen Kollegen im Labor für das freundliche Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die jahrelange finanzielle Unterstützung.