
TILO R. JONAS

GRÖÖE UND POPULATIONSVORTEILUNG DES HEPATITIS-C-VIRUS

- Eine nanometrische Anwendung der Gel-Ausschluß-Chromatographie -

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Größe und Populationsverteilung des Hepatitis-C-Virus

Eine nanometrische Anwendung
der Gel-Ausschluß-Chromatographie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Tilo Renk Jonas,
geboren in Lich/ Hessen

Gießen 2004

Aus dem
Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Medizinische Virologie
Leiter: Prof. Dr. phil. nat. W. H. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. W. H. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. med. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 15.2.2005

- Finis coronat opus -

*Meinem Großvater Renk Jan Schreck gewidmet
Doktor der Zahnmedizin der Universität Göttingen
1913 - 2003*

INHALT

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Hepatitis-C-Virus als Erreger einer viralen Hepatitis	1
1.1.1. Die Entdeckung des Hepatitis-C-Virus	1
1.1.2. Infektionswege.....	1
1.1.3. Akute Hepatitis C.....	3
1.1.4. Chronische Hepatitis C.....	3
1.1.5. Nachweisverfahren.....	4
1.1.6. Therapie der Hepatitis C.....	5
1.2. Das Hepatitis-C-Virus unter virologischen Gesichtspunkten.....	7
1.2.1. HCV als Mitglied der Virusfamilie Flaviviridae	7
1.2.2. Die Genomstruktur des Hepatitis-C-Virus.....	10
1.2.3. Die Größe des HC-Virions.....	14
1.3. Das Problem der Größenbestimmung von Viren.....	15
1.3.1. Die Bedeutung der Größe eines Virus.....	15
1.3.2. Prinzipielle Probleme einiger Verfahren	16
1.4. Die Methode der Gel-Ausschluß-Chromatographie (GEC)	18
1.4.1. Historischer Überblick.....	18
1.4.2. Prinzip der GEC.....	20
1.4.3. Parameter zur Beschreibung der Gelsäule und ihrer Eluate	21
1.4.4. Parameter zum Vergleich unterschiedlicher Gelsäulen	22
1.4.5. Parameter zur Beschreibung der Trennfähigkeit	23
1.5. Fragestellung der Arbeit	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. Materialien.....	27
2.1.1. Chemikalien.....	27
2.1.2. Puffer.....	27
2.1.3. Antikörper und Referenzmaterialien	28
2.1.4. Seren.....	29
2.1.5. Oligonukleotide und Hybridisierungs-Sonden.....	30
2.1.6. PCR-Reagenzien.....	31
2.1.7. Geräte	32
2.2. Methoden.....	33
2.2.1. Immunblot.....	33
2.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.3. Western-Blot.....	33
2.2.4. Pelletierung von Viruspartikeln in der Ultrazentrifuge	34
2.2.5. Elektronenmikroskopische Darstellung virusassoziierter Partikel ...	35
2.2.6. Extraktion viraler Nukleinsäure	35
2.2.7. Quantifizierung viraler Nukleinsäure (real-time PCR)	35
2.2.8. Quantifizierung des HCV-Core-Antigens	47
2.2.9. Radiale Immundiffusion humaner Immunglobuline.....	48

2.2.10.	Quantifizierung des HBsAg	48
2.2.11.	Präzipitation von Immunglobulin-beladenen HCV-Partikeln	49
2.2.12.	Entfernung der Lipidmembran von HCV	50
2.2.13.	Gelfiltration kleiner Volumina	50
2.2.14.	Analytische Gel-Ausschluß-Chromatographie (GEC)	51
3.	ERGEBNISSE	54
3.1.	GEC-Vorversuche mit Säulen kleinen Volumens	54
3.2.	Modell zur deskriptiven Analyse der GEC	55
3.2.1.	Die Weibullfunktion zur Beschreibung des Elutionsverhaltens	55
3.2.2.	Der Parameter a und sein Einfluß auf den Maximalwert	58
3.2.3.	Der Parameter b und sein Einfluß auf die Weite	59
3.2.4.	Der Parameter c und seine Bedeutung für die Symmetrie	59
3.3.	Bestimmung des K_{av} von Eichpartikeln	62
3.3.1.	Bestimmung der Säulenparameter V_0 und V_t :	62
3.3.2.	Immunglobuline	62
3.3.3.	Parvovirus B19	63
3.3.4.	Poliovirus (Impfstamm Sabin 1).....	64
3.3.5.	Simian Virus 40	65
3.3.6.	Semliki Forest Virus.....	67
3.3.7.	Beurteilung der Elutions-Symmetrie	69
3.3.8.	Beurteilung der Kalibrierung	69
3.4.	Verhalten von Hepatitis-C-Virus Partikeln in der GEC	72
3.4.1.	Chronische HCV-Infektion	72
3.4.2.	Frühe Infektionsphase	76
3.4.3.	Akute Infektion unter Immunsuppression	80
3.4.4.	Stokes´scher Durchmesser freier HCV-Virionen	82
3.4.5.	Verhältnis des HCV-Core-Antigen zu RNA.....	85
3.4.6.	Inhibition der RT-PCR durch Serumbestandteile in der GEC	86
3.4.7.	Bestimmung des Fehlers für V_e	88
3.4.8.	Menge eingesetzter und eluierter Viren.....	90
3.5.	Elektronenmikroskopische Darstellung viraler Partikel	91
3.5.1.	Darstellung von Eichpartikeln	91
	Darstellung von Partikeln aus HCV-positivem Serum	94
3.6.	Molekulargewicht des HCV-Core Proteins im Serum	96
3.7.	Immunpräzipitation Antikörper-beladener HCV-Partikel	97
3.8.	Versuche zur Freilegung des Capsids	98
3.9.	Versuche mit Superose 6 auf analytischen Säulen	98
3.10.	Anwendung der GEC auf HBV, BVDV und B19	100
3.10.1.	GEC von HBV-positivem Serum auf Biogel A50m	100
3.10.2.	Vergrößerung des Stokes´schen Durchmessers durch Antikörper.....	102
3.10.3.	Größenbestimmung von BVDV	103

4. DISKUSSION	105
4.1. Die Beschreibung der GEC im Verteilungsmodell	106
4.2. Das Verhalten von HCV-Partikeln in der GEC	111
4.2.1. Populationsverteilung und Größe des HCV.....	111
4.2.2. HCV-Partikel bei V_0	111
4.2.3. Freie HCV-Partikel.....	113
4.3. Bisherige Bestimmungen der HCV-Partikelgröße	115
4.4. Divergentes Verhalten von RNA und Core	118
4.5. Core-Protein oder Matrix-Protein?	121
4.6. Elektronenmikroskopische Darstellung von HCV-Partikeln	122
4.7. Größe von HBV und sphärischen HBs-Partikeln	125
4.8. BVDV als Modellvirus für HCV?	125
4.9. Größenzunahme durch Antikörper-Beladung	126
4.10. Ausblick	128
5. LITERATURVERZEICHNIS	131
6. APPENDIX	141
6.1. Abkürzungsverzeichnis	141
6.2. Zusammenfassung	142
6.3. Summary	143
6.4. Erklärung gemäß §11 (6) der Promotionsordnung des FB Medizin der JLU Gießen	144
6.5. Lebenslauf	145
Danksagung	146

1. Einleitung

1.1. Das Hepatitis-C-Virus als Erreger einer viralen Hepatitis

1.1.1. Die Entdeckung des Hepatitis-C-Virus

Nach der Entdeckung der Hepatitis A und B Viren fiel eine weitere Gruppe von Patienten mit Hepatitiden von anscheinend viraler Natur auf, die man zunächst als NonA/NonB (NANB) klassifizierte (Prince et al., 1974). Die NANB Hepatitis trat besonders als Posttransfusionshepatitis (PTH) auf, war also mit einem parenteralen Übertragungsweg verknüpft. Eine Identifizierung des Erregers gelang trotz zahlreicher entsprechender Publikationen zunächst nicht. Schließlich konnte Bradley aufgrund von Infektionsversuchen an Schimpansen postulieren, daß ein Großteil der NANB-Infektionen von einem umhüllten, einsträngigen RNA-Virus mit positiver Polarität hervorgerufen werden müsse (Bradley, 1985). Im Jahre 1989 gelang der entscheidende Schritt: Nach der genetischen Identifizierung eines mit der Krankheit assoziierten Genomabschnittes (Choo et al., 1989) wurde der zugehörige Erreger als Hepatitis-C-Virus (HCV) bezeichnet. Das Virus wurde nach der vollständigen Analyse des Genoms als einziger Vertreter der Gattung der Hepaciviren (Robertson et al., 1998) in die Familie der Flaviviridae (Heinz et al., 2000) eingeordnet. Eine eindeutige morphologische Identifizierung von HCV Virionen mittels elektronenmikroskopischer Verfahren oder eine gezielte Vermehrung *in vitro* ist jedoch bislang nicht gelungen.

1.1.2. Infektionswege

Die Hepatitis C wird parenteral übertragen. So ist ein Teil der Patienten mit HCV den Risikogruppen zuzuordnen, die auch durch HIV gefährdet sind, wenn auch mit unterschiedlicher Gewichtung. In den meisten Studien kann ungefähr ein Drittel der Patienten keiner der üblichen Risikogruppen zugerechnet werden, so daß die Epidemiologie letztendlich noch nicht komplett geklärt werden konnte; dies mag aber mit einer ungenügend stringent durchgeführten Anamnese nach einer diagnostizierten HCV-Infektion in Zusammenhang stehen.

Gesichert ist der Übertragungsweg durch Blut/Blut-Kontakt, so daß i.v.-Drogenabhängige, Medizinisches Personal, Kinder HCV-positiver Mütter unter der Geburt und vor 1992 auch Empfänger von Blutprodukten besonders gefährdet sind (Heintges et al., 1997). Vor der serologischen (1992) und später der Te-

stung mit Nukleinsäureamplifikationstests (NAT) auf HCV waren trotz Spenderauslese in Deutschland mindestens 0,15 % der in den Verkehr gebrachten Blutkonserven mit HCV kontaminiert (Burger et al., 2003). Bei Empfängern von Produkten aus gepooltem Plasma wie Gerinnungsfaktoren aus der Ära vor der Virusinaktivierung muß von einer nahezu kompletten Durchseuchung ausgegangen werden. So sind fast alle Hämophilie-Patienten in den 1980er Jahren mit HCV infiziert worden. Berichtet wurde auch über Infektionen durch nicht genügend desinfiziertes medizinisches Material, Akkupunktur, feststehende Rasiermesser und Geräte zur Gewinnung von Kapillarblut (Mele et al., 1995). Im Gegensatz zu HIV scheint der sexuelle Kontakt zu Infizierten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da Ehepartner von HCV-Infizierten nur unwesentlich häufiger mit HCV infiziert sind als der Rest der Bevölkerung (Meisel et al., 1995, Nakashima et al., 1995). Da Speichel, Samen und Vaginalsekret jedoch durch die Empfindlichkeit der Schleimhäute immer auch durch Mikrotraumen mit geringen Mengen Blut versetzt sein können, ist die Möglichkeit einer Infektion nicht komplett auszuschließen. Die gemeinsame Benutzung von Zahnbürsten, Nagelscheren und Rasiermessern ist also als Risikofaktor in Betracht zu ziehen. Die Ausbreitung von HCV wird durch Immunsuppression, z. B. unter Chemotherapie, bei Dialysepatienten oder unter HIV begünstigt, da Immunsupprimierte eine besonders hohe Virämie haben.

Die Infektiosität scheint nicht vollständig mit der in einer NAT bestimmten Virusmenge zu korrelieren. Es wurde ein Übertragungsfall durch ein Thrombozytenkonzentrat dokumentiert, bei dem im Serum des Spenders HCV-RNA mittels PCR nicht nachweisbar war (Schüttler et al., 2000). Die bei frisch Infizierten besonders hohe Infektiosität ist im Zusammenhang mit den zunächst fehlenden Antikörpern zu sehen; die Verteilung von freien bzw. Ig-gebundenen Virionen könnte zur Abschätzung der Infektiosität von Bedeutung sein. Dies wird durch die Tatsache untermauert, daß mit der Ak-Testung von Poolprodukten aus Blutbestandteilen nicht automatisch die Häufigkeit von Infektionen sank, vielmehr wurden nach dem Ausschluß von Anti-HCV positiven Blutspenden für die Gewinnung von Immunglobulinen zu Beginn der 1990er Jahre rund 200 HCV-Infektionen beobachtet, obwohl von diesem Produkt in der Zeit vor der Testung kein so hohes Infektionsrisiko ausging (Burger et al., 2003). Durch die Anwesenheit von Anti-HCV-positiven Plasmen kann somit anscheinend ein gleichzeitig

eingebrautes Anti-HCV-negatives, aber hochinfektiöses Plasma in seiner Infektiosität herabgesetzt werden.

1.1.3. Akute Hepatitis C

Die akute Hepatitis C ist eine Erkrankung der Leber, die bei den meisten Patienten asymptomatisch, nur in 20% der Fälle ikterisch und somit in der Mehrzahl aufgrund der diskreten Symptomatik scheinbar benigne verläuft. Die Inkubationszeit nach Infektion beträgt im Mittel 5-12 Wochen (in Ausnahmefällen bis 20 Wochen: Hoofnagle, 1997). Die Transaminasen im Serum können nicht als direkter Verlaufsmarker für die Infektion genutzt werden. Aktivitäten der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) > 300 U/L sind selten. Eine mehrmonatige Normalisierung der Leberenzyme vor einem erneuten Schub ist nicht ungewöhnlich. Fulminante Verläufe der Infektion sind außerordentlich selten, so daß das Hauptproblem die wahrscheinliche Chronifizierung ist. Eine Vorhersage zu einem möglichen chronischen Verlauf ist derzeit nicht zu treffen, es gibt jedoch Hinweise darauf, daß die Intensität und Diversität der T-Zell-Response gegen verschiedene HCV-Proteine und die HLA-Konfiguration eine Rolle spielen könnten (Par et al., 2002). Dies würde auch die These stützen, daß eine HCV-spezifische T-Zell-Anergie wesentlich zur Chronifizierung beiträgt.

1.1.4. Chronische Hepatitis C

Auch die chronische Hepatitis C, die bei fast 80% der HCV-Infektionen auftritt, verläuft weitgehend asymptomatisch. Das am häufigsten beschriebene Symptom ist die Müdigkeit, der häufigste klinische Befund die Hepatomegalie, also Zeichen, die eher ungeeignet sind, den Patienten auf eine mögliche Erkrankung aufmerksam zu machen. Während man früher davon ausging, daß die spontane Ausheilung einer chronischen HCV-Infektion selten ist, gibt es nun vermehrt Hinweise darauf, daß –abhängig vom Kollektiv- bis zu 10% der chronisch Infizierten in der Lage sind, im Langzeitverlauf eine HCV-RNA-Negativität zu erreichen (Seeff, 2002). Das Erreichen des Endstadiums einer dekompensierten Leberzirrhose (Child-Pugh C) benötigt zehn bis zwanzig Jahre, wenn es überhaupt eintritt. Die Angaben hierüber sind nicht genau bestimmt und geben für einen Zeitraum von 20 Jahren Zahlen von 20 bis 55% an. Von Bedeutung scheint hier die individuelle Entzündungs- und Fibroseaktivität in der Leber zu sein, die biopsisch durch den histopathologisch definierten Hepatitis-Aktivitäts-Index erfaßt

werden kann. Zirrhosepatienten sind durch eine verringerte Syntheseleistung der Leber und die Entwicklung eines Pfortaderhochdrucks gefährdet. Die 5-Jahres-überlebensrate bei kompensierten Zirrhosepatienten (Stadium Child-Pugh A) beträgt 83%, im Falle einer dekompensierten Zirrhose jedoch nur 51%. Eine Dekompensation betrifft 4% der Zirrhosepatienten pro Jahr.

Jedes Jahr entwickeln 3-6 % aller HCV-Zirrhosepatienten ein hepatozelluläres Karzinom (HCC), so daß 5 Jahre nach Diagnose der Zirrhose bereits 20% der Patienten an einem HCC erkrankt sind. Nach 10 Jahren sind es bereits über 50%, nach 15 Jahren muß mit einer Inzidenz von fast 80 % gerechnet werden.

In bis zu 10 % der Fälle eines HCV-assoziierten HCC sind jedoch vor Diagnose des HCC keine Zirrhosezeichen nachweisbar. In einer nicht-zirrhosen Leber entsteht es damit deutlich seltener als das HBV-assoziierte HCC (Wettstein et al., 2001). Die Literatur kommt jedoch zu keinem einheitlichen Schluß, ob HCV bei vorbestehender Zirrhose ein höheres karzinogenes Potential als HBV hat.

1.1.5. Nachweisverfahren

Da die Klinik der Hepatitis C wie erwähnt meist eher unauffällig ist, kommt den Laborverfahren zum Infektionsnachweis eine entscheidende Bedeutung zu. Zu den immunologischen Nachweisverfahren zählt der ELISA auf HCV-Antikörper. In verschiedenen Generationen des Assays wurden unterschiedliche rekombinante virale Proteine für den Nachweis verwendet; die Tests der 3. Generation verwenden sowohl Core- als auch die Nichtstrukturproteine NS3 bis NS5 als Antigen für die in der Probe enthaltenen Antikörper (Dow et al., 1994). Da es eine gewisse Zeit braucht, bis das Immunsystem nach dem Kontakt mit dem Virus messbare Antikörperspiegel gebildet hat, ergibt sich ein diagnostisches Fenster, in dem das Virus aktiv ist, Antikörper aber noch nicht nachgewiesen werden können. Deshalb ist frühestens 4 Wochen nach Infektion mit einem positiven Testergebnis zu rechnen, das Maximum des Antikörpertiters wird 1-2 Jahre nach der Infektion erreicht. In seltenen Fällen mit geringer Virämie kann eine Antikörperbildung ganz ausbleiben (Yuki et al., 1994).

Eine frühere Aussage ist möglich, wenn durch immunologische Nachweisverfahren direkt die Proteine des Virus nachgewiesen werden können. In der Markteinführung befindet sich derzeit ein ELISA gegen das HCV-Coreprotein, der relativ sensitiv ist und schon 1,5 pg/mL HCV-Core nachweisen kann. Dieser Test ist

dennoch weniger sensitiv als Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT) (Maynard et al., 2003, Zanetti et al., 2003).

Bei den NAT-Tests zum Virus-Genomnachweis hat sich die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in mehreren Varianten durchgesetzt. Mittels RT-PCR kann bereits eine Woche nach Infektion virale RNA im Blut nachgewiesen werden (Farci et al., 1991). Andere Assays [Ligase Kettenreaktion (LCR), Transcription mediated amplification (TMA) , Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)] wurden zwar entwickelt, haben in der Routine hierzulande z.Zt. aber noch keine Bedeutung. Die TMA zeichnet sich bei speziellen Fragestellungen durch eine besonders hohe Sensitivität aus und wird in den USA zum Spenderscreening eingesetzt.

Bei der RT-PCR ist grundsätzlich zwischen dem qualitativen und dem quantitativen Nachweis zu unterscheiden. Qualitativ ausgerichtete Methoden wie die konventionelle RT-PCR oder die Nested-RT-PCR können zwar sehr empfindlich sein, lassen aber nur in einem geringen Maß eine Aussage über die Anzahl der nachgewiesenen Virusgenome zu. Quantitative Methoden waren bislang nicht ganz so sensitiv wie die qualitativen. Mit den zunehmend angewandten real-time Verfahren läßt sich sowohl eine hohe Empfindlichkeit als auch eine genaue Quantifizierung über einen breiten Meßbereich erzielen (Schüttler et al., 2004).

1.1.6. Therapie der Hepatitis C

Typisch für die HCV-Infektion ist die lange Zeit der Symptomfreiheit und der relativ hohe Anteil von Patienten, die keine Zeichen des Leberschadens entwickeln. Trotzdem sollte jede noch aktive HCV Infektion möglichst früh einer Therapie zugeführt werden, da es einerseits keine zuverlässigen prognostischen Marker für den weiteren Verlauf der Infektion gibt und andererseits der Infizierte als Quelle für mögliche Neuinfektionen gesehen werden muß. Über den Zeitpunkt des Therapiebeginns muß bei chronischen Verläufen jedoch individuell entschieden werden. Da es sich um eine Langzeittherapie handelt, sollten sowohl klinische Kriterien wie der Fibrose/Nekrosegrad der Leber, als auch persönliche Kriterien wie die Therapiemotivation des Patienten und seine Compliance in die Entscheidung einbezogen werden. Für den Therapieerfolg der akuten HCV-Infektion gibt es derzeit keine stringenten Daten. In einer nicht kontrollierten, multizentrischen Studie wurden Hinweise gefunden, daß die Interferon-Therapie

in der akuten Phase die Viruspersistenz weitgehend verhindern kann (Jaeckel et al., 2001). Da die Gefahr der Chronifizierung und der damit verbundenen Spätfolgen sehr hoch ist, ist bei derzeitiger Datenlage die Therapie jedes akut HCV-Infizierten anzustreben. Über Zeitpunkt des Therapiebeginns, Dauer und Art der Therapie gibt es jedoch keine allgemein anerkannten Empfehlungen.

Im Gegensatz zu anderen Viren wie HIV, Herpes Simplex Virus oder Cytomegalievirus stehen für die Behandlung der HCV keine virusspezifischen Therapeutika zur Verfügung. Die Therapie beruht im wesentlichen auf zwei Säulen: Das auch zur Therapie der chronischen HBV-Infektion eingesetzte Interferon ist bereits sehr früh zur Therapie der Hepatitis C eingesetzt worden (Hoofnagle et al., 1986), besitzt aber als Monotherapie bei der HCV-Infektion nur einen bedingten Erfolg im Sinne einer anhaltenden Viruselimination. α -Interferone zeigen vielfältige direkte und indirekte antivirale Eigenschaften wie u.a. intrazelluläre virale RNA-Degradation, Hemmung der viralen RNA-Translation, Aktivierung des zellulären Immunsystems zur Erkennung virusbefallener Zellen und Prävention einer Virusinfektion von suszeptiblen Zellen (Hu et al., 2001). Welcher dieser Effekte für die Elimination des HCV hauptsächlich verantwortlich zeichnet, ist bislang unklar.

Unterstützend wird das Guanosin-Analogon Ribavirin gegeben. Durch welchen Mechanismus Ribavirin die antivirale Wirkung des IFN verstärkt, ist bisher nicht verstanden. Die vorliegenden Daten lassen jedoch vermuten, daß der therapeutische Effekt in Kombination mit IFN eher auf immunmodulatorische als auf direkt antivirale Eigenschaften zurückzuführen ist (Hultgren et al., 1998, Patterson et al., 1990). Während Interferon alleine in der Lage ist, bei einem Teil der Patienten zu einer Viruselimination zu führen, ist Ribavirin als Monotherapeutikum nicht in der Lage, die Virusreplikation in irgendeiner Art zu beeinflussen. In Kombination mit Interferon erhöht es den Anteil der erfolgreich therapierten Patienten um das zwei- bis dreifache (Di Bisceglie et al., 1995, Poynard et al., 1998).

Die gegenwärtig empfohlene Therapie dauert – je nach Genotyp – 24 bzw. 48 Wochen (EASL-Jury, 1999). Ribavirin existiert in einer oralen Form, Interferon muß jedoch subcutan appliziert werden. Derzeit werden mehrfach pegylierte Interferone eingesetzt, die eine einmal wöchentliche subcutane Gabe ermöglichen (Cornberg et al., 2002). Bedeutende Nebenwirkung des Ribavirins ist eine verschieden stark ausgeprägte Hämolyse. Interferon induziert eine Reihe von Symptomen, die in Art eines grippalen Infektes imponieren: Myalgie, Arthral-

gie, Thrombozytopenie, Fieber etc.. Erhöhte Aufmerksamkeit verlangen mögliche psychiatrische Nebenwirkungen. Depressionen unter Interferon können so schwer sein, daß trotz guten viralen Ansprechens die Therapie abgebrochen werden muß (Heintges et al., 1996).

1.2. Das Hepatitis-C-Virus unter virologischen Gesichtspunkten

1.2.1. HCV als Mitglied der Virusfamilie Flaviviridae

Die Familie der Flaviviridae beinhaltet drei Genera: Die Gattung Flavivirus umfasst das Gelbfiebervirus und eine Reihe weiterer, durch Arthropoden übertragene Viren mit vorwiegend hämorrhagischen oder enzephalitischen Krankheitsbildern (Denguevirus, West-Nil-Virus, FSME-Virus). Das Genus der Pestiviren beinhaltet tierpathogene Viren: das Virus der Klassische Schweinepest (CSFV), die Bovinen Virus-Diarrhoe Viren 1 und 2 (BVDV) und das Border-Disease-Virus der Schafe. Das dritte Genus Hepaciviren besteht bislang nur aus dem Hepatitis-C-Virus. Die noch nicht endgültig klassifizierten GB-Viren (besonders das beim Menschen vorkommende GBV-C) könnten aufgrund ihrer Ähnlichkeit der Genomorganisation in das Genus Hepacivirus eingruppiert werden (Ohba et al., 1996). Insgesamt scheint das HCV nach Sequenzvergleichen phylogenetisch den Pestiviren näher zu stehen als den Flaviviren (Choo et al., 1991, Miller et al., 1990, Roggendorf, 2002).

Die Flaviviridae sind behüllte, einsträngige RNA-Viren positiver Polarität. Das Genom enthält einen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF), der für ein einziges Polyprotein codiert. Dieses wird durch zelluläre und viruseigene Proteine kotranslational gespalten. Der ORF wird an beiden Enden jeweils durch eine nicht codierende Region (NCR) flankiert.

Vom 5'-Ende ausgehend, werden zunächst die Strukturproteine und danach die Nichtstrukturproteine codiert. Zur besseren Vergleichbarkeit erhielten Proteine mit gleicher Funktion in allen drei Genera der Flaviviridae die gleichen Namen, jedoch bilden einzelne Genera Proteine aus, die bei anderen analog so nicht vorhanden sind. So besitzen Flaviviren ein Membranprotein (M), das bei den Pestiviren und HCV fehlt. Dafür können diese beiden Genera zwei Envelopeproteine vorweisen. In *Tabelle 1* sind die Proteine von Gelbfieber-Virus, FSME-Virus, HCV und BVDV vergleichend gegenübergestellt.

Protein	Gelbfieberevirus	FSME-Virus	HCV	BVDV	Funktion
N ^{pro}	-	-	-	aa 1-168 23 kD <i>N^{pro}</i>	Protease spaltet sich autokatalytisch vom Polyprotein ab
Core	aa 1-120 12-14 kD <i>Signalase</i>	aa 1-115 13-16 kD <i>Signalase</i>	aa 1-190 21 kD <i>Signalase</i>	aa 169-270 14 kD <i>Signalase</i>	Capsid, interagiert mit RNA
E ^{rns}				aa 271-497 44-48 kD <i>unbekannt</i>	RNase, sezerniert, glykosyliert
Prä-M	aa 121-209 10-11 kD <i>Golgi-Protease</i>	aa 116-204 17-19 kD <i>Golgi-Protease</i>			glykosyliert
M	aa 210-284 7-9 kD <i>Signalase</i>	aa 205-279 7-8 kD <i>Signalase</i>			Membranprotein
E	aa 285-777 51-59 kD <i>Signalase</i>	aa 280-775 50-60 kD <i>Signalase</i>			Membranprotein, Adsorption
E1			aa 191-382 31-35 kD <i>Signalase</i>	aa 498-692 25-33 kD <i>Signalase</i>	Membranprotein
E2			aa 383-746 68-72 kD <i>Signalase</i>	aa 693-1085 53-55 kD <i>Signalase</i>	Membranprotein
p7			aa 747-809 7 kD <i>Signalase</i>	aa 1086-1186 7kD <i>Signalase</i>	Membranprotein Ionenkanal
NS1	aa 778-1156 19-25 kD <i>NS2B?</i>	aa 776-1127 39-41 kD <i>NS2B</i>			glykosyliert, sezerniert, zellmembranassoziiert, kein Bestandteil der Viruspartikel
NS2A	aa 1157-1353 20-24 kD <i>NS2B</i>	aa 1128-1357 20 kD <i>NS2B</i>			?
NS2B	aa 1354-1483 14 kD <i>NS2B</i>	aa 1358-1488 14 kD <i>NS2B</i>			Zn ⁺⁺ Metalloproteinase
NS2			aa 810-1024 21 kD <i>NS2</i>	aa 1187-1679 38-54 kD <i>unbekannt</i>	Zn ⁺⁺ -bindend, spaltet bei HCV zwischen NS2 und NS3
NS3	aa 1484-2106 68-70 kD <i>NS3</i>	aa 1498-2109 70 kD <i>NS3</i>	aa 1025-1657 70 kD <i>NS3</i>	aa 1680-2362 75-80 kD <i>NS3</i>	Serinprotease, Helicase
NS 2-3				aa 1187-2362 120-125 kD <i>NS3</i>	Protease, Helicase, wird bei cytopathogenen Stämmen in NS2 und NS3 gespalten
NS4A	aa 2107-2393 16 kD <i>NS3</i>	aa 2110-2258 16 kD <i>NS3</i>	aa 1658-1710 4-10 kD <i>NS3</i>	aa 2363-2426 7-10 kD <i>NS3</i>	membranassoziiert, assoziiert mit NS3 (HCV, BVDV)
NS4B	aa 2394-2505 26 kD <i>NS3</i>	aa 2259-2510 27 kD <i>NS3</i>	aa 1711-1971 27 kD <i>NS3</i>	aa 2427-2773 30 kD <i>NS3</i>	membranassoziiert (?)
NS5	aa 2506-3411 103-104 kD	aa 2511-3415 100 kD			RNA-capping, RNA-abhängige Polymerase
NS5A			aa 1972-2419 56-58 kD <i>NS3</i>	aa 2274-3269 58-70 kD <i>NS3</i>	phosphoryliert
NS5B			aa 2420-3010 68-70 kD	aa 3270-3899 75-78 kD	RNA-abhängige RNA-Polymerase

Tabelle 1: Vergleich der viralen Proteine von Flaviviridae aus drei Genera. Die Proteine sind von oben nach unten in ihrer Reihenfolge von amino- nach carboxyterminal im Polyprotein geordnet. Angegeben sind die Position im Polyprotein, das Gewicht in kD und die Protease, die C-terminal spaltet (kursiv). (modifiziert nach Modrow et al., 2003)

1.2.2. Die Genomstruktur des Hepatitis-C-Virus

Das Genom des HCV ist eine einzelsträngige RNA positiver Polarität mit einer Länge von ungefähr 9,5 kb, die für einen einzigen offenen Leserahmen (ORF) codiert. Dieser ORF ist an beiden Enden durch nicht-codierende Regionen (NCR) eingefasst und enthält die Information für ein Polyprotein, das je nach Genotyp 3008 bis 3037 Aminosäuren lang ist (Reed et al., 2000). Dieses wird wahrscheinlich durch vier Proteasen – zelluläre und viruseigene – in vermutlich insgesamt 10 Proteine gespalten (s. *Tabelle 1*).

1.2.2.1. Strukturproteine

Core. Das Core-Protein ist aminoterminal das erste Protein, das durch die hepaticvirale RNA codiert wird. Es ist innerhalb der Genotypen relativ konserviert und besteht aus 191 Aminosäuren (aa) (Yasui et al., 1998). Dieses Volllängen-Coreprotein ist nach *in vitro* Expression in verschiedenen Längen (p16, p19, p21) und zellulären Lokalisationsorten nachgewiesen worden; eine differenzierte Funktion dieser verschiedenen prozessierten Varianten oder eine Bedeutung in der viralen Morphogenese sind unbekannt (vgl. Schüttler, 2001). Für das reife und im Cytoplasma lokalisierte Core sind mehrere Funktionen bekannt: Es besitzt die Möglichkeit, an virale RNA (Santolini et al., 1994), Fettkomplexe (Hope et al., 2000, McLauchlan et al., 2002) und das Strukturprotein E1 zu binden (Lo et al., 1996) und kann Oligomere bilden (Matsumoto et al., 1996). Außerdem hat es die Möglichkeit, verschiedene zelluläre Proteine zu binden. Aus Zellkulturversuchen ergaben sich Hinweise, daß Core in der Lage ist, verschiedene Promotoren und Enhancer zu aktivieren oder zu hemmen. Es ist insgesamt nicht auszuschließen, daß das HCV Core-Protein neben der eigentlichen Aufgabe der RNA-Verpackung noch weitere Bedeutung in der viralen Pathogenese haben könnte. Auch die Genexpression von anderen Viren kann bei Coexpression von HCV-Core-Protein gehemmt werden. Dies erklärt, warum bei einer HBV/HCV-Koinfektion die HBV-Infektion supprimiert werden kann (Shih et al., 1993, Schüttler et al., 2002).

E1/E2. Die Glykoproteine E1 und E2 sind in die Lipidhülle des HCV eingelagert; sie sind relevant für die Antikörperbindung an das HCV-Virion. Von E2 nahm man ursprünglich an, daß es sich – wie bei den Flaviviren – um das erste Nicht-Strukturprotein handeln würde. Später stellte sich jedoch heraus, daß es sich um ein Strukturprotein handelte. Das scheinbare Molekulargewicht der Proteine in

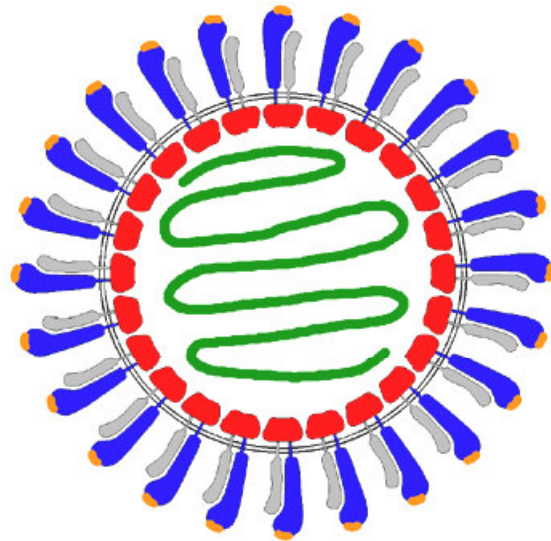
der Gelelektrophorese ist größer, als dies von ihrer Aminosäuresequenz her zu erwarten wäre. Dies liegt an Glykosylierungen, die an mehreren Positionen erfolgen (Grakoui et al., 1993, Lanford et al., 1993). Von besonderer Bedeutung für die Immunantwort des Wirtes ist die hypervariable Region 1 (HVR1) des E2. Diese wird von 27 aminoterminalen Aminosäuren gebildet (Weiner et al., 1991). Im Bereich der HVR1 kann das Virus immer neue Oberflächenvarianten ausbilden, was dazu dient, sich der Elimination durch das Immunsystems zu entziehen (Weiner et al., 1992). Dies könnte einer der Gründe für die Chronifizierung der HCV-Infektion sein.

Es konnte gezeigt werden, daß eine minimale Domäne der HVR1 des E2 in der Lage ist, eine Bindung an den Scavenger-Rezeptor B1 von Hepatozyten zu vermitteln (Scarselli et al., 2002). Weiterhin ist die Bindung von E1/E2 Komplexen an den CD81 Rezeptor Zelle beschrieben worden (Cocquerel et al., 2003, Pileri et al., 1998); diese beiden Rezeptoren scheinen eine Bedeutung zur Infektion der Zelle zu haben (Bartosch et al., 2003).

Zusätzlich kommt ein E2/p7-Protein vor, dessen Bedeutung jedoch unklar ist (Lin et al., 1994, Selby et al., 1994). Aus Versuchen mit BVDV ist jedoch bekannt, daß diese die Einzelproteine nicht ersetzen können: Nach dem Unterdrücken der Spaltung in E2 und p7 können keine infektiösen Viren mehr gebildet werden (Harada et al., 2000).

p7. Das virale Spaltprodukt p7 ist in seiner Funktion bislang ungeklärt. Aus *in vitro*-Experimenten weiß man jedoch, daß das p7 in der Lage ist, Ionenkanäle in Lipidmembranen auszubilden. Auch eine Inhibition dieser Kanäle wurde beschrieben (Griffin et al., 2003, Pavlovic et al., 2003). Griffin und Rowlands vermuten, daß p7 für die reguläre Reifung des HCV erforderlich ist, indem die Ionenkanäle ähnlich wie bei Influenzaviren eine vorzeitige Auslösung der Fusionsfunktion hemmen (Griffin et al., 2004). Sollte sich bestätigen, daß diese Kanäle auch *in vivo* ausgebildet werden und für die Replikation und Infektiosität des Virus von Bedeutung sind, wären sie möglicher Angriffspunkt für eine antivirale Therapie mittels Amantadin, welches die Ionenkanäle blockiert.

Abbildung 1: Mögliches Modell eines HCV-Partikels. (modifiziert nach W.H. Gerlich u. B. Boschek): RNA (grün), Core-Protein (rot) mit möglicher Interaktion mit E2 (blau) und E1 (grau), die in die Lipidhülle als Heterodimere eingelagert sind. Am E2 ist außen die HVR1 (orange) markiert.



1.2.2.2. Nichtstrukturproteine

NS2. HCV codiert nicht für ein dem NS1 der Flaviviren entsprechendes Protein, weshalb das erste Nichtstrukturprotein mit NS2 bezeichnet wird. Das NS2 ist Bestandteil der NS2/3-Autoprotease, durch die NS2 von NS3 abgespalten wird. Für diese Prozessierung müssen zweiwertige Zinkionen anwesend sein (Hijikata et al., 1993). Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß NS2 für die Phosphorylierung des NS5A Proteins notwendig ist (Liu et al., 1999). Das NS2 könnte ein möglicher Angriffspunkt für Virustatika aus der Klasse der Protease-Inhibitoren sein.

NS3. Für das NS3 sind drei verschiedene Funktionen beschrieben worden: Zunächst hat es Eigenschaften einer Serin-Protease. Dabei katalysiert es unter Mitwirkung von NS4A die Prozessierung an der Schnittstelle von NS3/4A in *cis* und an den Schnittstellen von NS4A/B, NS4B/5A und NS5A/B in *trans* (Lin et al., 1994). In seiner Funktion als Helicase entwindet es doppelsträngige RNA und RNA/DNA-Hybride in 3'5'-Richtung (Tai et al., 1996). Zuletzt konnte eine Funktion als RNA-stimulierte NTPase nachgewiesen werden. Während das Protein für die Helicase-Aktivität NS4A als Co-Faktor benötigt, kann es seine NTPase-Aktivität auch alleine entfalten (Gallinari et al., 1999).

NS4A. Das NS4A ist Co-Faktor für das NS3. Es ist unumgänglich notwendig für die Prozessierung an den Schnittstellen von NS4A/B und NS4B/5A und verbessert die Prozessierung an NS5A/B (Failla et al., 1994).

NS4B. Dem NS4B wird eine Beteiligung am Replikationskomplex zugeschrieben (Lin et al., 1997). Außerdem wurde in einer Publikation von einer transformieren-

den Wirkung zusammen mit dem H-ras Onkogen berichtet (Parks et al., 2000). Dies bedarf jedoch noch einer ausstehenden Bestätigung.

NS5A. Die genaue Funktion des NS5A ist nicht bekannt. Man geht allerdings davon aus, daß es eine wichtige Rolle im Replikationszyklus spielt. Vielfach sind Arbeiten zur Frage einer *Interferon-sensitivity determined region* (ISDR) des NS5A erschienen. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich (z.B. Chayama et al., 1997, Chung et al., 1999, Sarrazin et al., 2000).

NS5B: Das NS5B entspricht als Genprodukt der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase des HCV (Behrens et al., 1996); es zeigt typische Sequenz-homologien insbesondere im katalytischen Zentrum zu anderen bekannten viralen RNA-Polymerasen (vgl. Hagedorn et al., 2000).

1.2.2.3. Nicht-codierende Regionen

Das HCV-Polyprotein wird von zwei nicht-codierenden Regionen (NCR) einge- faßt. Diese beinhalten Erkennungsstrukturen für die HCV-Polymerase zur Ge- nomreplikation. Außerdem ist es für die Virusprotein-Synthese notwendig, daß das die virale +RNA der Translation zugeführt wird. Dazu bildet die 5'-NCR eine „Internal ribosome entry site“ (IRES) aus (Honda et al., 1999), welche zu einer Cap-unabhängigen Translationsinitiation führt, wie diese auch bei den Pestiviren und den Picornaviridae (z.B. Poliovirus) und einigen eukaryoten Genen be- schrieben ist (z. B. c-myc, NRF u.a. Übersicht: Bonnal et al., 2001)

Die IRES des HCV besteht aus einer Sekundärstruktur mit 4 Stem-loops (Brown et al., 1992). Die 5'-NCR ist zwischen verschiedenen Genotypen bis zu 85% identisch; Variationen treten nur in begrenzten Bereichen aus, so daß man von einem hochkonservierten Genomabschnitt sprechen kann (Bukh et al., 1992) (Smith et al., 1995). Basenaustausche im Bereich der IRES führen zumeist zu einer Änderung der IRES-Aktivität; teilweise können jedoch ganze Stem-loops entfernt werden, ohne die Replikation nennenswert zu unterdrücken, andere Be- reiche müssen hingegen zwingend vorhanden sein (Rijnbrand et al., 2000).

Die 3'-NCR besteht jenseits des Stop-Codons aus einer kurzen, sehr variablen Sequenz von etwa 40 Nukleotiden Länge. Darauf folgt ein Poly-U-Bereich, der einzelne Cytosine enthält. Dieser Bereich ist unterschiedlich lang (Yamada et al., 1996). Es folgt der sogenannte X-tail mit 98 Nukleotiden (Tanaka et al., 1996). Er ist hochkonserviert, bildet drei Stem-loops aus und ist für die Virusreplikation un- erlässlich (Kolykhalov et al., 2000).

1.2.3. Die Größe des HCV-Virions

Für die Größe des HCV-Virions existieren derzeit nur ungefähre Angaben mit einer großen Schwankungsbreite. Dies ist unter anderem mit der Geschichte der Entdeckung des HCV-Virions zu erklären. Es fällt auf, daß es fast 15 Jahre gedauert hat, das Virus nachzuweisen, nachdem seine Existenz erstmals vermutet wurde. Dies mag hauptsächlich daran liegen, daß der Nachweis des Virus weder durch Zellkultur noch durch die Elektronenmikroskopie (EM) geführt werden konnte, sondern durch die Klonierung des Genoms geschah. Bis heute ist es nicht gelungen, überzeugende EM-Bilder von HCV anzufertigen. Einzelne Veröffentlichungen enthalten zwar Bilder mit einigen wenigen virusähnlichen Partikeln; diese haben jedoch sehr divergierende Größen zwischen 20 und 80 nm. Außerdem scheinen sie nie in einer Konzentration vorzukommen, die der Virusmenge in der Probe zumindest annähernd proportional wäre. Insgesamt scheint die EM bei allen Mitgliedern der Gruppe der Flaviviridae schwieriger zu sein als bei anderen Viren. Die allgemein vermutete Größenangabe des HCV von 50 nm (Heinz et al., 2000) beruht im wesentlichen auf Analogieschlüssen zu anderen Flaviviridae, deren Größe wiederum durch eine kritisch zu beurteilende EM-Darstellung abgeleitet wurde. Trotzdem findet sich diese Angabe durchgängig in den Lehrbüchern. Eine häufig zu findende Größenangabe von 40-60 nm für Flaviviren stößt auch nicht wesentlich auf eine kritische Hinterfragung. Indirekte Methoden zeigen ebenfalls eine hohe Heterogenität: So ist die Dichte von HCV-Partikeln mittels Dichtegradientenzentrifugation in einem Bereich von 1,04 bis 1,21 g/mL breit gestreut (Jursch, 2000, Thomssen et al., 1993).

Die Abschätzung der Größe mittels Ultrafiltration läßt durch die Streuung der Porendurchmesser nur grobe Bereiche zu. Schon bei der Charakterisierung des damals sogenannten NonA/NonB-Agens wurde mittels Filtration und Infektionsexperimenten an Schimpansen eine Größe von unter 80 nm angegeben (Bradley, 1985). Bei Experimenten mit mehreren sequentiellen Filtrationen konnte eine Größe von 30-50 nm ermittelt werden (He et al., 1987). Ähnliche Arbeiten unter Verwendung von NAT-Verfahren zur Konzentrationsbestimmung nach Filtration finden Größen von 30-60 nm (Burnouf et al., 2003) und 29-46 nm (Yuasa et al., 1991). Diese Angaben sind jedoch für eine zutreffende morphologische Beschreibung unbefriedigend.

Trotz der relativ langen Zeit, in der das Virus seit dem ersten Nachweis beforscht wird, gibt es noch viele offene Fragen, die den prinzipiellen Aufbau und die Struktur betreffen. So ist es beispielweise noch nicht gelungen, mit rekombinantem Core-Protein *in vitro* ein assembliertes Capsid nachzuweisen. Auch die Funktion der einzelnen Proteine ist noch mit vielen Fragezeichen versehen. Es reicht nicht hin, die Morphologie des HCV aus Analogien zu verwandten Viren zu erschließen. Als grundsätzliche Frage ist die Bestimmung der exakten Größe deshalb ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Morphologie.

1.3. Das Problem der Größenbestimmung von Viren

1.3.1. Die Bedeutung der Größe eines Virus

Im allgemeinen geht man davon aus, daß HCV als Mitglied der Virusfamilie Flaviviridae analoge Eigenschaften wie die anderen, besser untersuchten Spezies dieser Familie aufweist. Obwohl dies für viele *in vitro* Eigenschaften zutreffen mag, zeigen die erheblichen Probleme in der Beschreibung der grundlegenden Eigenschaften von HCV wie Infektiosität, Morphogenese und Replikation, daß Verallgemeinerungen hier nicht notwendigerweise zur richtigen Untersuchungsstrategie und schließlich zu Erkenntnis führen. Zu den Standardmerkmalen der Beschreibung von Viren gehört deren Größe. Unter rein medizinischen Gesichtspunkten mag diese Eigenschaft wenig bedeutsam erscheinen, jedoch ist selbst bei rein utilitaristischer Betrachtungsweise diese Auffassung falsch. Viren werden heute aus menschlichen Plasmaproteinderivaten (z.B. Gerinnungsfaktoren, Immunglobuline) unter anderem auch durch Ultrafiltration entfernt. Naturgemäß spielt hier die Größe von Viren eine entscheidende Rolle. Eine Kenntnis der Größe von HCV ist aber auch wissenschaftlich bedeutsam. Ihre genaue Bestimmung könnte dazu beitragen, die bisher wenig verstandene Morphologie des Virus wenigstens in Ansatzpunkten zu beschreiben. Vieles spricht dafür, daß Analogieschlüsse von den Gattungen Flavivirus, Pestivirus oder der Familie der Togaviridae nicht gerechtfertigt sind. Weiterhin wären auch durch die Veränderung der Größe nach einer wie auch immer gearteten Behandlung des Virus (Delipidisierung oder enzymatischer Verdau) Rückschlüsse auf dessen Aufbau möglich.

1.3.2. Prinzipielle Probleme einiger Verfahren

Mit der Elektronenmikroskopie ist es möglich, Bilder eines Virus anzufertigen und damit seine Größe zu bestimmen. Befindet sich Kontrastmittel im Elektronenweg – gleichgültig in welcher räumlichen Anordnung – wird das Signal am entsprechenden Bildpunkt abgeschwächt. Damit können Außen- und Binnenstrukturen dargestellt werden. Mit diesen Bildern kann jedoch auf den Durchmesser *in vivo* nur näherungsweise geschlossen werden. Durch die Präparation vor der Betrachtung (Kontrastierung mit Uransalzen, Vakuum im Elektronenweg) wird dem Virus alles Wasser entzogen. Im günstigsten Fall könnte man davon ausgehen, daß das Virus nun gleichmäßig geschrumpft ist, aber seine ursprüngliche Struktur maßstabsgetreu behalten hat. Doch ist das Artefakt der Schrumpfung abhängig vom Wassergehalt des Viruskompartiments (Hülle, Core, gegebenenfalls Matrixraum etc.), und damit selbstverständlich nicht gleichmäßig. Hinzu kommt noch, daß man es mit einem Phänomen zu tun bekommt, daß sich am anschaulichsten mit einem luftlosen Fußball beschreiben läßt: Breitet man diesen Ball auf dem Boden aus, wirkt seine Kontur und sein Durchmesser größer als im aufgepumpten Zustand, wenn man ihn sich von oben betrachtet. Bei der Betrachtung von der Seite hingegen wäre von der kugeligen Struktur nichts mehr zu erkennen, man sähe vielmehr eine längliche, flache, unregelmäßige Struktur. Dies führt zu einer Überschätzung des Durchmessers. Dieses Phänomen zeigt sich bei vielen behüllten Viren, wo sich die Hülle als eine solche geschrumpfte Struktur darstellt.

Es ist bei der Auswertung von elektronenmikroskopischen Abbildungen daher niemals direkt (z.B. durch Einführen eines „Schrumpfungskoeffizienten“ o.ä.) auf die natürliche Größe in hydratisierten, nativen Zustand zu schließen, was sämtliche veröffentlichte, auf TEM fußende Angaben von Virusgrößen (besonders von behüllten Viren) in Frage stellt.

Bei der CryoEM wird das Präparat in gefrorenem Zustand in den Elektronenweg eingebracht, so daß Viren nahezu in ihrem natürlichen Zustand vorliegen. Mehrere Aufnahmen werden digital miteinander verrechnet und so ein dreidimensionales Bild erstellt. Dazu müssen die Viren jedoch mindestens eine Symmetrieachse aufweisen und in einer relativ homogenen Population vorliegen, da der mathematische Algorithmus (Fourier-Transformation) sonst nur eine amorphe Kugel erzeugt. Dazu ist für die eigentliche Untersuchung ein Aliquot einer

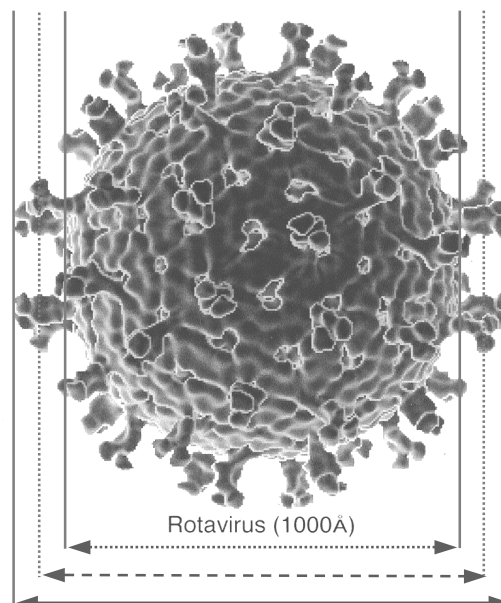
hochgereinigten Suspension von mindestens 5 μL nötig, daß eine Konzentration von 0,05 bis 0,5 mg Viren/mL enthält, so daß dieses Verfahren praktisch nur für Viren in Frage kommt, die in Zellkultur angezüchtet werden können und eine gewisse Stabilität besitzen (Baker et al., 1999).

Ein weiteres Verfahren ist die Röntgenstrukturanalyse, die auch in der Lage ist, Viren ohne wesentliche artifizielle Größenveränderungen darzustellen. Voraussetzung ist jedoch, daß das Virus in hochreiner Form vorliegt und in der Lage ist, zu kristallisieren. Während die Aufreinigung in vielen Fällen noch zu bewerkstelligen wäre, sind behüllte Viren *per se* nicht in der Lage, Kristalle auszubilden, was dazu führt, daß allenfalls Virusbestandteile behüllter Viren (z.B. rekombinante Corepartikel oder abgespaltene Hüllproteine) durch Röntgenstrukturanalyse untersucht werden können. Zudem ist eine nativ vorhandene Hydrathülle, die einen nicht unwesentlichen Anteil an der funktionellen Größe eines Viruspartikels liefert, durch die Anordnung im Kristallgitter alteriert.

Die Hydrathülle eines Viruspartikels ist bei der Definition der Größe eines Virus ein problematischer Gesichtspunkt, da sie nach der klassischen Morphologie nicht zum Virion gehört, das größenabhängige Verhalten desselben aber mitbestimmt. Die Frage nach dem Außendurchmesser eines Viruspartikels ist auch insofern problematisch zu sehen, als insbesondere bei ausgeprägten unregelmäßigen Oberflächenstrukturen (wie z.B. „spikes“. Vgl. Abb. 2) nicht ohne weiteres von einer definierten Größe gesprochen werden kann.

Abbildung 2: CryoEM-Rekonstruktion von Humanem Rotavirus (verändert nach Baker et al., 1999) mit drei möglichen Angaben für die Partikelgröße:

- Durchmesser mit spike-Länge
- Durchmesser der Oberfläche,
- - - Mittelwert der Beiden



Da die Größe eines Virus biologisch, z.B. in Zusammenhang mit Invasionsmechanismen, bedeutsam ist, sollte die Frage nach der Größe eines Virions auch unter funktionellen Aspekten und nicht nur als morphologische Eigenschaft gesehen werden. Solche auf das Verhalten von Partikeln aufbauende Verfahren, basieren in letzter Konsequenz auf Strömungs- und Diffusionsverhalten und werden bei sphärischen Partikeln als Stokes'scher Radius, meßbar durch Sedimentationsgeschwindigkeit, bzw. Diffusionsgeschwindigkeit, wiedergegeben. Eine weitere Möglichkeit, diesen „funktionellen“ (hydrodynamischen) Durchmesser eines Partikels zu bestimmen, ist die Gelausschlußchromatographie (gel exclusion chromatography, GEC), die sonst eher bei der Bestimmung von Molekulargewichten oder zur Reinigung von z.B. Proteinen Verwendung findet.

1.4. Die Methode der Gel-Ausschluß-Chromatographie (GEC)

1.4.1. Historischer Überblick

Die Methode der GEC hat ihre Wurzeln in der angewandten und analytischen Chemie und wurde konzipiert, um niedermolekulare Stoffe von höhermolekularen trennen zu können. Deuel konnte 1954 als erster ein ungeladenes Gel synthetisieren, mit dem es ihm gelang, Kolloide zu entsalzen. Andere Arbeitsgruppen experimentierten mit natürlichen Produkten wie Stärke und Agar-Gel. Das erste universell anwendbare Gel wurde 1959 als Reaktionsprodukt aus löslichem Dextran mit Epichlorhydrin synthetisiert und unter dem Namen Sephadex vertrieben (Porath et al., 1959). Varianten dieses Geles sind bis zum heutigem Tage im Einsatz. Während am Anfang nur Gele zur Verfügung standen, mit denen relativ niedermolekulare Stoffe getrennt werden konnten, wurden rasch Gele mit einer weniger starken Vernetzung und damit größeren Porenweite entwickelt, um auch größere Partikel trennen zu können. Bereits damals wurde eine spezielle Eigenschaft der GEC deutlich: Charakteristisch für ein Gelmaterial ist, daß es immer nur einen Teilbereich des gesamten theoretisch möglichen Selektionsbereichs der GEC abdecken kann. Die erste Anwendung in der Virologie gelang 1962 mit dem Tabak-Mosaik-Virus durch Steere (Steere et al., 1962). (Übersicht: Determann, 1967)

Weitere Arbeitsgruppen reinigten mit Hilfe der GEC Influenzaviren (1965), Adenoviren (1966), BVDV (1968) und Poliovirus (1969). Die weitaus meisten virolo-

gischen Publikationen, die sich mit der Anwendung der GEC beschäftigten, nutzten diese jedoch lediglich zur Isolierung von einzelnen Antigenen und Antikörpern und nicht von nativen Viren.

1970 legte Gerlich dar, daß die Obergrenze für die Separation durch GEC von großen Partikeln bei ungefähr 400 nm liegen müsse. In diesem Bereich sei eine Trennung jedoch nur noch möglich, wenn sich zwei zu trennende Partikel deutlich in ihrer Größe unterscheiden. Als Untergrenze nannte er eine Partikelgröße von 2 nm (Gerlich et al., 1970). 1971 konnte er mit Hilfe der GEC das HBsAg isolieren und die Größe sphärischer HBsAg-Partikel bestimmen; damit wurde der Grundstock für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HBV gelegt (Gerlich, 1971). Erwähnenswerte Arbeiten zur Selektion ganzer humanpathogener Viren beschäftigen sich mit Hepatitis A (Hornbeck et al., 1975) und Hepatitis D (Bonino et al., 1986). Insgesamt verlor die Methode jedoch bis heute zur Größenbestimmung und morphologischen Charakterisierung ganzer Virionen an Bedeutung. Die Eigenschaften von Viruspartikeln wurden standardmäßig mit Elektronenmikroskopie, Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifugation und der Ultrafiltration ermittelt. Die GEC hatte fortan nur eine gewisse Bedeutung bei der Reinigung von Proteinen z.B. im industriellen Maßstab zur Reinigung von Gerinnungsfaktoren aus Blutplasma.

Nachdem bis Mitte der 1990er Jahre mit konventionellen Methoden keine befriedigende Größenbestimmung der meisten Flaviviridae gelungen war, erarbeitete C. Jursch mit Hilfe der GEC Größenbereiche für BVDV, GBV-C, HCV und HBV, die aber trotz der sehr arbeitsintensiven Nachweisverfahren (konventionelle PCR, Infektionsassays) eine große Spannweite aufwiesen (Jursch, 2000).

1.4.2. Prinzip der GEC

Mit Hilfe der GEC ist es möglich, Partikel aufgrund ihres Diffusionsverhaltens in einer laminaren Strömung zu trennen. Da dieser Vorgang durch den Diffusionskoeffizienten bestimmt wird, ist der Stokes'sche Durchmesser (D_s) die bestimmende Größe.

Grundprinzip der GEC ist eine in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser behinderte selektive Diffusion in eine umströmte Gelmatrix. Da den Partikeln aufgrund von Größenunterschieden verschieden große Diffusionsvolumina zur Verfügung stehen, kommt es zu einer selektiven Elution der Partikel. Den größten Partikeln,

die nicht in die Gelmatrix eindringen können, steht das kleinste Verteilungsvolumen zur Verfügung; sie werden zuerst eluiert und erscheinen im sogenannten Ausschlußvolumen. Kleine Partikel (z.B. kleine Moleküle wie Aceton, einfache Salze etc.) werden als letztes eluiert, da sie in der Gelmatrix ungehindert diffundieren und ihnen damit nahezu das komplette Säulenvolumen als Verteilungsvolumen zur Verfügung steht.

Mit der GEC ist es möglich, Partikel aus Lösung, bzw. Suspension zu separieren, solange Stoffe aus der Probe die Gelpartikel nicht zersetzen und die zu separierenden Partikel klein genug sind, um graduell in das Gel hineindiffundieren zu können. Begrenzt wird die Trenneigenschaft einer GEC jedoch durch Absorptionvorgänge oder ladungsabhängige Beeinflussungen der freien Diffusion der Partikel, die eine größenabhängige Elution überlagern können. Die Obergrenze der Größe von zu trennenden Partikeln ist spätestens dann erreicht, wenn die Partikel, zum Beispiel Zellen aufgrund von Sedimentation nicht ausreichend diffundieren.

Auf eine dichte, säulenförmige Packung aus Gelperlen, einer Gelmatrix, wird eine Probe aufgetragen. Diese wird mit Hilfe eines Laufmittels über die Säule geführt. Am Auslauf der Säule wird das Eluat aufgefangen und in Fraktionen unterteilt. Zunächst tritt nur das Laufmittel aus, das sich vor dem Auftragen der Probe in der Säule befunden hat, der Vorlauf. Dann erscheinen gemeinsam alle Partikel, die so groß sind, daß sie über dem Trennvermögen der Säule liegen. Danach folgen die eigentlichen getrennten Partikel – erst große und dann immer kleinere, bis schließlich alle Partikel der Probe wieder ausgewaschen sind und nur noch das reine Laufmittel austritt. Je länger die Säule ist, desto länger haben die Partikel die Möglichkeit, mit der Matrix zu interagieren. Also wird durch eine längere Säule und eine hinreichend langsame Strömungsgeschwindigkeit die Trennfähigkeit verbessert.

Nach Möglichkeit sollten alle Partikel der Probe gleichzeitig die Wanderung über die Matrix antreten, damit große Partikel vom „Ende“ des Probenvolumens nicht kleine Partikel vom „Anfang“ überholen und somit das Ergebnis verfälschen. Daraus folgt, daß das sinnvolle Volumen einer Probe von der Grundfläche der Säule abhängig ist. Für analytische Zwecke wird somit eine Säule mit einer kleinen Grundfläche gewählt werden. Aufgrund des Strömungsverhaltens in Wandnähe ist allerdings ein Durchmesser kleiner als 1,5 cm wenig sinnvoll. Für präpa-

rative Zwecke kann der Durchmesser entsprechend der aufzutragenden Probe fast beliebig erweitert werden.

1.4.3. Parameter zur Beschreibung der Gelsäule und ihrer Eluate

Da es nahezu unmöglich ist, mit normalen Laborverfahren zwei Säulen in Länge und Packungsdichte identisch anzufertigen, wurden verschiedene Parameter entwickelt, um Säulen zu beschreiben und letztendlich ermittelte Elutionsvolumina von Partikeln vergleichen zu können.

Säulenhöhe: Höhe der Gelpackung

V_0 : *Ausschlußvolumen*- bezeichnet das Volumen, das den Partikeln zur Verfügung steht, die zu groß sind, um in die Gelmatrix hineindiffundieren zu können. Das V_0 ist während eines GEC-Laufes dadurch definiert, daß an diesem Punkt alle Partikel auftauchen, die über der Trennfähigkeit der Säule liegen. Üblicherweise wird zur Bestimmung von V_0 ein Partikel gewählt, das deutlich größer ist als das Trennvermögen. Dieses kann entweder extra zugeführt oder als ohnehin in der Probe vorhandener Bestandteil (z.B. Chylomikronen in Serum) nachgewiesen werden.

V_e : *Elutionsvolumen*- bezeichnet das Volumen, das die Säule passieren muß, bis ein bestimmtes Partikel eluiert wird. Der Vergleich unterschiedlicher Partikel über V_e ist nur an einer identischen Gelmatrix zulässig.

V_m : *Matrixvolumen*- bezeichnet jenes Volumen, das durch die Struktur der Gelmatrix selbst belegt ist und somit keinem Teilchen zur Diffusion zur Verfügung steht. Bei stark quellbaren und porösen Gelen kann ein niedriges V_m von nahezu 0 angenommen werden. (Determann, 1967)

V_i : *Inneres Volumen*- bezeichnet das Volumen, das Teilchen, die komplett in die Gelmatrix eindringen können, zusätzlich zu V_0 zur Verfügung steht. ($V_i = \text{Volumen der Säule} - V_m - V_0$)

V_t : *Gesamtvolumen*, das Partikeln innerhalb und außerhalb der Gelmatrix zur Verfügung steht, die komplett in die Matrix eindringen können. ($V_t = \text{Säulenvolumen} - V_m$)

1.4.4. Parameter zum Vergleich unterschiedlicher Gelsäulen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, das V_e eines nachgewiesenen Partikels in Bezug zu der benutzten Säule zu stellen:

V_e / V_t oder V_e / V_0 : Beide Quotienten beziehen sich auf ein säulenabhängiges Volumen, sind unabhängig von der Geometrie der Säule aber empfindlich gegen Unterschiede in der Packungsdichte. Die größte Genauigkeit zeigt sich bei großem V_e .

K_d : Relativer Anteil an V_i , der einem Partikel (p) zur Verfügung steht, der nur zum Teil in die Matrix eindringen kann, so daß $V_e(p) = V_0 + K_d(p) V_i$, oder umge-

formt:

$$K_d = \frac{(V_e - V_0)}{V_i}$$

Dieser Parameter ist unabhängig von der Geometrie und Packungsdichte der Matrix. Allerdings ist V_i durch die Abhängigkeit von V_m schwierig zu bestimmen. Die größte Genauigkeit ist bei kleinen Molekülen zu erwarten.

K_{av} : Der Quotient K_{av} (av: available) wurde auf der Basis eines Diffusionsmodells in die GEC eingeführt (Laurent et al., 1964) und ist ähnlich dem K_d unabhängig von der Geometrie und Packungsdichte der Gelmatrix; er hat den Vorteil, daß alle Volumina leicht zu messen sind. Größte Genauigkeit besitzt K_{av} bei großem V_e , also kleinen Partikeln.

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)}$$

In der Praxis hat sich die Verwendung des K_{av} durchgesetzt. Aus der Definition von K_{av} ergibt sich für $V_e = V_0$ (Ausschlußvolumen) ein $K_{av} = 0$.

$K_{av} = 1$ entspricht folglich V_t . Dadurch ist gleichzeitig abzuleiten, daß Partikel mit $K_{av} < 0$ nicht zu erwarten sind oder V_0 falsch bestimmt wurde. Partikel mit $K_{av} > 1$ haben in einer anderen Form als der Diffusion mit der Matrix interagiert und wurden später ausgewaschen – entweder in Form einer Peakverschiebung oder kontinuierlich („Nachbluten der Säule“).

1.4.5. Parameter zur Beschreibung der Trennfähigkeit

Bestimmt man die Konzentration eines Partikels, das über eine Gelmatrix geführt wird am Auslass der Säule, so kann man beobachten, daß die Konzentration erst ansteigt und danach wieder abfällt. Die Spitze des Peaks wird als V_e des Partikels definiert. Im chromatographischen Idealfall (z.B. Gaschromatographie)

ist der Peak symmetrisch, schmal und hoch. Dieser Idealfall kann in der GEC jedoch nur erreicht werden, wenn das zu messende Partikel einen homogenen Stokes'schen Durchmesser hat (z.B. ein einfaches Molekül wie Aceton), nicht unspezifisch an der Matrix adsorbiert wird und die Fraktionsvolumina im Verhältnis zum Säulendurchmesser sehr klein sind. Die offene Weite des Peaks im Konzentrationsniveau 0 wird mit w bezeichnet. (Abb. 3)

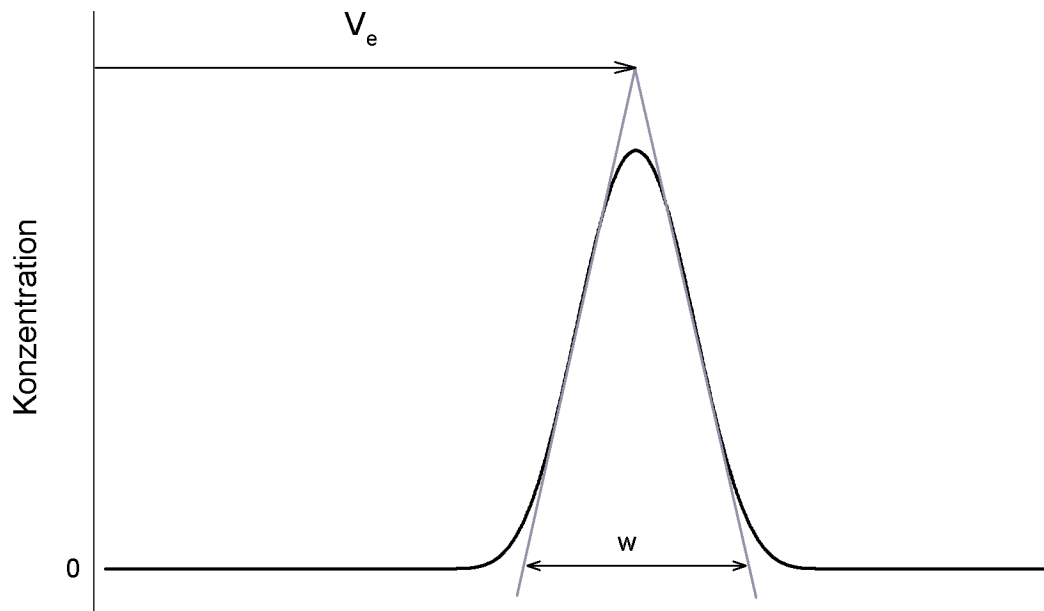


Abbildung 3: Schema des Chromatogramms eines regelmäßigen Partikels, das nicht mit der Gelmatrix unspezifisch interagiert (z.B. Aceton): Scharfer, symmetrischer Peak. (w : offene Weite des Peaks)

Aus der Destillationstechnik wurde der Begriff der theoretischen Bodenhöhe (equivalent height of one theoretical plate = EHTP) übernommen, um die Trennfähigkeit einer Matrix zu beschreiben. Allerdings entspricht eine Bodenhöhe in der Destillation ungefähr 30-50 Bodenhöhen in der Gelchromatographie. Die Anzahl der theoretischen Böden N berechnet sich aus

$$N = \left(\frac{4 \cdot V_e}{w} \right)^2$$

Dividiert man nun die Anzahl der Böden durch die Säulenlänge, so erhält man die *einem* Boden entsprechende Länge der Säule (EHTP). Je schmaler die Basis der Elutionskurve ist, desto kleiner wird die EHTP, d.h. um so besser wird die Matrix zwei unterschiedliche Peaks auflösen. Je größer die Anzahl der chromatographischen Böden, desto eher ist es möglich Partikel voneinander zu differenzieren, die sich nur gering in ihrer Größe unterscheiden. Die EHTP ist abhängig vom Gelmaterial, dem filtrierten Partikel und der Fließgeschwindigkeit des Laufmittels. Bei bekannter K_{av} -Differenz zweier Partikel ist es möglich, die not-

wendigen Ausmaße einer Gelmatrix zur Trennung zu berechnen, wenn man ihre EHTP kennt (Flodin, 1962).

Bei der Chromatographie von Proteinen kann es jedoch vorkommen, daß Teile der Probe unspezifisch an der Gelmatrix zurückgehalten werden. Diese Anteile werden dann später ausgewaschen, so daß die Konzentration am Säulenausgang nicht im selben Maß abfällt, wie sie ansteigt – es zeigt sich ein „Nachschleppen“ (Tailing). In diesem Falle wäre w – im 0-Niveau gemessen – eher ungeeignet, um die Trennfähigkeit zu beschreiben: Obwohl kurz vor dem Ende des Tailing noch ein Signal nachweisbar ist, ist trotzdem schon der allergrößte Teil der Probe wieder eluiert. (Abb. 4)

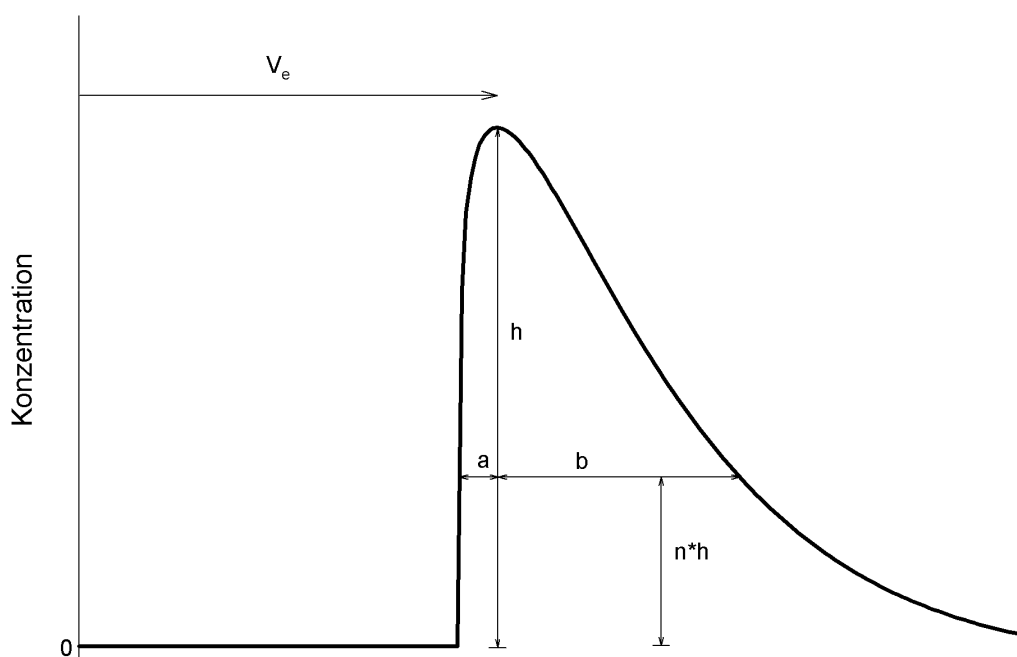


Abbildung 4: Schema des Chromatogramms eines Partikels mit Tailing-Phänomen: Rascher Anstieg, dann immer geringer werdender Abfall. h : Höhe des Peaks, a und b : Symmetrieparameter in der Höhe $n \cdot h$. Die Strecke $a+b$ entspricht der offenen Weite w .

Dieser Tatsache wird Rechnung getragen, indem man w über dem Null-Niveau mißt; beschrieben sind – mehr oder weniger willkürlich festgelegte – Messungen in Höhe von 10% bis 33% der Maximalkonzentration. Zur Beschreibung der Symmetrie kann nun der Quotient $T = b_{n \cdot h} / a_{n \cdot h}$ herangezogen werden, wobei $n \cdot h$ die Höhe ist, auf der w gemessen wird. In der Gaschromatographie geht man davon aus, daß ein Tailing mit einem $T > 3$ als nicht mehr akzeptabel gilt (Lottspeich et al., 1998). Für die GEC von Viren gibt es hierzu keine Angaben.

1.5. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob mit chromatographischen Methoden die Größe des Hepatitis-C-Virus bestimmt werden kann; dies ist bislang durch keine der gängigen Methoden zur Darstellung der Virusmorphologie überzeugend gelungen.

Es soll untersucht werden, ob in ihrer Größe verschiedene Viruspopulationen vorliegen und inwieweit die virale RNA sich kongruent zu viralem Antigen (Core-Ag) verhält. Eine mögliche Abhängigkeit der Größe von der Beladung mit Antikörpern ist zu prüfen.

Die Methode der GEC zeigt besonders bei einer diskontinuierlichen Messung (Fraktionen) gewisse Schwierigkeiten bei der Ermittlung des Elutionsvolumens des mutmaßlichen Konzentrationsgipfels. Zur Auswertung der Gel-Ausschlußchromatographie soll daher ein mathematisches Verfahren entwickelt werden, das objektivierbare Ergebnisse, höhere Meßgenauigkeit und neue Parameter zur Beschreibung von Virusheterogenitäten erschließt.

PAGE-Trenngelpuffer (4x)	1,5 M (36,3 g) 0,1 % (1,0 mL) ad 200,0 mL	Tris-HCl pH 8,8 SDS 20 % aq. Aqua bidest.
PAGE-Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M (12,1 g) 0,1 % (1,0 mL) ad 200 mL	Tris-HCl pH 6,8 SDS 20 % aq. Aqua bidest.
PAGE-Probenpuffer (4x)	11,25 mL 27,0 mL 6,75 mL 20 % (w/v)	Tris 1,0 M pH 6,8 SDS 20 % aq Glycerin DTT (vor Gebrauch zugeben)
PAGE-Laufpuffer (10x)	0,25 M 1,92 M (288,26 g) 1 % w/v (100 mL) ad 2000,0 mL	Tris-HCl pH 8,3 Glycin SDS 20 % aq. Aqua bidest.
Transferpuffer	8,25 mM (12,0 g) 0,77 mM (57,6 g) 15 % (600,0 mL) ad 4000,0 mL	Tris Glycin Methanol Aqua bidest.
DEPC-Wasser :	Zu 100 mL Aqua bidest., werden 1% (100µL) DEPC (Diethylpyrocarbonat 97%, Fa. Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. 15,922-0/25) hinzugefügt, über Nacht bei 37°C inkubiert und zweimalig autoklaviert. Das fertige RNase-freie Wasser wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.	

Vorbereitung von Pufferlösungen zur Verwendung als GEC-Laufpuffer:

Die verwendete Pufferlösung wird in einer Schottflasche mit einem Rührfisch autoklaviert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (T_r) in einen Exsikkator gestellt, der sich auf einem Magnetrührer befindet. Mittels einer Saugpumpe wird ein Unterdruck erzeugt. Unter ständigem Rühren wird der Puffer für 5 min dem Unterdruck ausgesetzt und somit entgast.

2.1.3. Antikörper und Referenzmaterialien

Referenzproteine und Längenstandards

Rainbow-Marker low für die SDS-PAGE:

(Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg, Kat. Nr. RPN 755) mit folgenden Molekulargewichten (in kD): 45/ 30/ 20,1/ 14,3/ 6,5/ 3,5/ 2,5

1kB DNA Leiter für die Agarosegel-Elektrophorese:

(Fa. Life Technologies, Karlsruhe) mit folgenden Fragmentgrößen (in bp):

12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

pUC-Mix DNA-Größen-Marker 8 für die Agarosegel-Elektrophorese:

(Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit den Fragmentgrößen (in bp):

1114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37/34/26/19

Antikörper

Anti-human-IgG: „Affine Pure Donkey Anti-human-IgG (H+L)“, Kat. 709-005-149, Fa. Dianova, Hamburg

Anti-Maus-IgG: „Affine Pure Goat Anti-mouse-IgG (H+L)“, Kat. 115-005-100, Fa. Dianova, Hamburg

Anti-HCV-Core-Ak: Mix aus drei monoklonalen Antikörpern, Peroxidase-markiert, aus dem Trak-C Assay für HCV-Coreprotein der Firma Ortho, Raritan (NJ), USA

2.1.4. Seren

A: Serum ID 245 der Sammlung des Institutes. Gefrierplasma eines klinisch asymptomatischen Blutspenders des ÖRK Blutspendedienstes Linz/ Österreich aus dem Jahre 1992. Von der Transfusion ausgeschlossen wegen erhöhter Transaminasen. Anti-HCV positiv, HCV RNA-Konzentration $1 \cdot 10^6$ IU/mL.

B: Serum ID 90 der Sammlung des Institutes. Vollblutspende 98/074345 eines Blutspendedienstes, vermutlich noch in der akuten Phase. Durch die Vorspende dieses Spenders fand die Infektion der Patientin E statt. HCV RNA-Konzentration $4 \cdot 10^5$ IU/mL.

C: Serum ID 91 der Sammlung des Institutes. Anti-HCV negativer Blutspender. Serum überlassen von Dr. K. Heermann, Göttingen. HCV RNA-Konzentration $2,5 \cdot 10^6$ IU/mL.

D: Serum ID 166 der Sammlung des Institutes. Anti-HCV negativer Patient. Serum überlassen von Prof. Dr. Scharf, Düsseldorf. HCV RNA-Konzentration $3,7 \cdot 10^6$ IU/mL.

E: Serum einer Patientin, die aufgrund einer chronisch myeloischen Leukämie unter chemotherapeutischer Immunsuppression stand und in der thrombozytopenischen Phase über ein kontaminiertes Thrombozytenkonzentrat mit HCV infiziert wurde (Busch et al., 2003, Schüttler et al., 2000). HCV RNA-Konzentration $3 \cdot 10^6$ IU/mL.

F: Serum eines chronisch HCV-positiven Patienten der nephrologischen Ambulanz des Klinikums der JLU. Immunsuppression bei Zustand nach Nierentransplantation. Gegenüber allen anderen Seren zeichnet es sich dadurch aus, daß es vor der GEC nicht eingefroren war, sondern direkt nach Abnahme analysiert wurde. HCV RNA-Konzentration $8 \cdot 10^6$ IU/mL.

G: Serum ID 259 der Sammlung des Institutes. Hochvirämischer Patient in der Frühphase einer HBV-Infektion. HBV DNA-Konzentration $1 \cdot 10^9$ GE/mL.

H: Serum eines frisch geboosterten Polio-Impflings (Salk-Totimpfstoff) Die Vorimpfung erfolgte mit oraler Polio-Vaccine.

2.1.5. Oligonukleotide und Hybridisierungs-Sonden

Alle eingesetzten Primer wurden von Fa. MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert und HPLC-gereinigt. Die Hybridisierungssonden mit Fluorophoren (Hybprobes) wurden von der Firma TIB-Molbiol, Berlin hergestellt. Primer und Hybprobes wurden nach Synthese in lyophilisiertem Zustand angeliefert. Die Volumina zur Lösung ergaben sich aus der vom Hersteller angegebenen Masse der synthetisierten Nukleotide. Die Primer wurden mit DEPC-gereinigtem Wasser auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt und auf eine Gebrauchskonzentration von 10 mM aliquotiert. Die Hybprobes wurden mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 8 pM/ μ l eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C . Für die PCR von HCV und HBV konnte auf im Institut bereits etablierte Methoden zurückgegriffen werden. Für die anderen Viren wurden neue Methoden etabliert. Die Primer wurden nach einem Sequenzvergleich von mindestens 5 bekannten Sequenzen manuell ausgewählt.

Die Ziele der Primer und Sonden sind: BV: Bovines Virus-Diarrhoe Virus (BVDV), SV1: Simian Virus 40 (SV40), PVSab1: Poliovirus Impfstamm Sabin I, B19-1: Parvovirus B19, SFV1: Semliki-Forest-Virus (SFV). s bezeichnet den

Sense-Primer, as den Antisense-Primer. LC steht für ein LightCycler Rot, FL für ein Fluoreszein-Molekül.

Sonden	Sequenz (5'->3')	T _m [°C]	Position	Genbank Nummer
HCV LC	(LCRed640)TGC CTG ATA GGG TGC TTG CAG T-p	65,9	-52 bis -30	M58338
HCV FL	GGT CGC GAA AGG CCT TGT GGT A(FLGreen)	65,3	-75 bis -54	M58338
HBV-XBFL	ACG GGG CGC ACC TCT CTT TAC GCG G(FLGreen)	72,5	1519-1543	X51970
HBV-XBLC	(LCRed640)CTC CCC GTC TGT GCC TTC TCA TCT GC-p	69,8	1545-1570	X51970

Primer	Sequenz (5'->3')	T _m [°C]	Position	Genbank Nummer
HCV-NCR-s149	TGC GGA ACC GGT GAG TAC A	62,3	-193-(-175)	M58338
HCV-NCR-as342	CTT AAG GTT TAG GAT TCG TGC TCA T	61,3	24 – 1	M58338
BV-s-NCR	CAT GCC CTT AGT AGG ACT AGC	52,8	105-125	AF220247
BV-as-NCR	TCC ATG TGC CAT GTA CAG CAG	58,6	387-367	AF220247
SV1-s	AAA GTC CTT GGG GTC T	59,8	4353-4374	AF33256
SV1-as	GGA GCA GTG GAA T	60,4	4482-4468	AF33256
PVSab 1-s	AGG TCA GAT GCT TGA AAG C	58,0	243-261	A13892
PVSab1-as	TCC ACT GGC TTC AGT GTT	57,6	339-322	A13892
B19-1-s	CCA TGC CTT ATC CAG	53,7	2876-2897	AF162273
B19-1-as	ATG AAT CCT TGC AGC AC	50,4	2988-2969	AF162273
HBV-X2as	TGC AGA GGT GAA GCG AAG TGC ACA	67,1	1601-1578	X51970
HBV-X2s	GAC GTC CTT TGT YTA CGT CCT GTC	63,5	1413-1436	X51970
SFV1-s	CTC CGC AAG AAG CAA T	49,2	770-785	X04129
SFV1-as	CGG GGC ACA TAG TGA T	51,7	971-965	X04129

2.1.6. PCR-Reagenzien

LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I

Kat. Nr. 2 015 137, Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes

Kat. Nr. 2 015 145, Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes

Kat. Nr. 3 003 248, Roche Diagnostics, Mannheim

Die Kits enthalten jeweils den Reaktionsmix mit PCR-Puffer und DNTPs, die Polymerase und Magnesiumchlorid.

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain

Kat. Nr. 1 988 131, Roche Diagnostics, Mannheim

Die Lösung wird 1:900 mit DEPC-Wasser verdünnt.

2.1.7. Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des Institutes
Blot-Kammer	Stratagene, Heidelberg
Chromatographiesäulen XK 16/100, 26/70	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Durchflußphotometer Uvicord SD	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Elektronenmikroskop EM 10 CR	Zeiss, Oberkochen
Fraktionssammler HeliFrac	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Gelkamera CS1, Thermodrucker, Monitor	Cybertech, Berlin
Incubator für Mikrotiterplatten Typ 1410	iEMS, Finnland
LightCycler Realtime PCR-Gerät	Roche Diagnostics, Mannheim
Peristaltikpumpe P1	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Photometer für Mikrotiterplatten LP400	Pasteur Diagnostics, Frankreich
Photometerschreiber REC 101	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Probenverteiler V7	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilmentwickler Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
SDS-Gelkammern und Zubehör	Stratagene, Heidelberg
Spannungsgerät Feathervolt	Stratagene, Heidelberg
Spectrophotometer-Dual DU 70	Beckman, München
Thermocycler Hybaid Omni Gene	MWG Biotech, Ebersberg
Transilluminator (UV)	Cybertech, Berlin
Ultrazentrifuge Beckman L5-50	Beckman, München
UZ-Rotor TST 41-14	Kontron, Großbritannien
Waschgerät für Mikrotiterplatten Columbus	SLT, Österreich
Zentrifuge Biofuge 1512	Heraeus, Osterode/Harz
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.2. Methoden

2.2.1. Immunblot

Die Originalvorschrift für eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde in ihrer Anpassung auf virologische Besonderheiten mit nachfolgendem Immunblot nach Heermann und Gerlich (Heermann et al., 1988) verwendet.

2.2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für ein 12% Polyacrylamidgel wurden 28 mL Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stamm-
lösung, 17,6 mL 4xTrenngelpuffer (pH 8,8), 24 mL Aq. bidest. und 56 µl TEMED
gemischt, die Polymerisation mit 340 µl 10% Ammoniumpersulfat gestartet. Die
Mischung wurde umgehend bis ca. $\frac{3}{4}$ der Höhe in eine Gelkammer eingefüllt
(„Mighty small“-Kammer, Fa. Hoefer bzw. Nachbau durch die Werkstatt) und
vorsichtig mit 2-Propanol überschichtet.

Nach erfolgter Polymerisation wird das 2-Propanol entfernt, das Sammelgel
eingefüllt und die Kämme eingesetzt. Das 5%ige Sammelgel (pH 6,8) besteht
aus 2,5 mL Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung, 3,7 mL Sammelgel-Puffer,
7,3 mL Aq. bidest., 17 µl TEMED und 0,01% Bromphenolblau; zur Polymerisati-
on werden 70 µl frisch angesetztes 10% Ammoniumpersulfat zugesetzt.

Die Proben werden in 1x Laemmli-Puffer/1%dTT aufgenommen und 5 Min. bei
95° C inkubiert. Nach Auftragen der Proben erfolgt die Auftrennung mit PAGE-
Laufpuffer bei ca. 18 mA/200 V für etwa 2 h.

2.2.3. Western-Blot

Um die Blot-Membran (Immobilon PVDF [Polyvinylidendifluorid] Transfer-
Membran, Fa. Millipore Kat. Nr. IVPH 00010) hydrophil zu äquilibrieren wurde
sie wie folgt vorbehandelt: 5 s Methanol, 2 Min. in Aq. bidest. auswaschen, 5
Min. in Blot-Puffer äquilibrieren. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel auf
ein mit Blot-Puffer getränktes Filterpapier gelegt, die vorbereitete PVDF-
Membran blasenfrei mit dem Gel in Kontakt gebracht, und ein weiteres Filterpa-
pier aufgeschichtet. Der Transfer erfolgt in einer Blot-Kammer in Transfer-Puffer
bei 35 mA/20 V über Nacht.

Nach dem Transfer wird die Membran kurz mit TBS gewaschen und dann über Nacht geblockt. (0,5x Rotiblock (Fa. Roth, Karlsruhe, Kat.Nr. A151.1), 4% Magermilch, 0,5% Tween 20). Es erfolgt dann die Inkubation mit einem Peroxidase-markierten Antikörper für 1 h bei T_r in TBS/0,1% bovines Serumalbumin (Fa. Roth, Karlsruhe, Kat.Nr. 8076.2); die Membran wird hierzu in Polyethylen-Folie eingeschweißt und auf einen Rüttler gelegt. Bei dem Antikörper handelt es sich um den Antikörper des HCV-Core-Elisa der Firma Ortho Diagnostics, der Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Membran wird danach kurz mit TBS abgespült und viermal für 10 Min. gewaschen: einmal in TBS/0,1% Tween 20, dreimal in TBS.

Antikörpernachweis auf Blotmembran

Zum Nachweis der Peroxidase-markierten Ak wird die ECL (Enhanced chemiluminescence)-Methode angewandt. Hierzu wird die Membran in der eingeschweißten Folie für 1 Min. in der Dunkelkammer mit dem ECL-Detection Reagens (Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg, Kat. Nr. RPN 2106) inkubiert, die Lösung entfernt und die eingeschweißte Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm, Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg, Kat. Nr. RPN 2103K) gelegt. In der Regel genügt eine Exposition für 20 s bis 3 Min..

2.2.4. Pelletierung von Viruspartikeln in der Ultrazentrifuge

Zur Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 1%BSA / TNE abgesättigte Ultrazentrifugenröhrchen (14x95 mm, Fa. SCI, München, Kat.Nr. 7031) mit einem 50 μ L Kissen aus 60% Sucrose am Boden versehen und dann vollständig mit Fraktionen aus den beiden Peaks und deren Nachbarfraktionen aufgefüllt. Dann erfolgte die Ultrazentrifugation mit 34 000 U/min bei 4°C (Rotor TST 41-14) für 1 h. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig bis auf ca. 100 μ L abgehoben und die pelletierten Viren darin re-suspendiert.

2.2.5. Elektronenmikroskopische Darstellung virusassoziierter Partikel

Ein auf 4°C gekühlter Metallblock wird mit Parafilm überzogen und auf diesem 30 μ L der Proben aufgebracht. Der elektronenmikroskopischen Probenträger

(Grids) wird auf die Probe aufgelegt und für 15 min. inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt und die Probe mit 1% Uranylacetat für eine Minute beschichtet, die überschüssige Lösung wieder entfernt und das Präparat getrocknet. Nach dieser Negativ-Kontrastierung können die Grids im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

2.2.6. Extraktion viraler Nukleinsäure

Zur Extraktion der viralen RNA aus Serum oder GEC-Eluaten wurde das Viral RNA Mini Kit (Kat.-Nr. 52906), zur Extraktion viraler DNA das QIAmp DNA Minikit (Kat.-Nr. 51306) der Firma Qiagen verwendet. Diese Methoden beruhen auf der selektiven Affinität von Nukleinsäuren zu einer Silikamatrix, sie unterscheiden sich lediglich in dem verwendeten Detergenz zur Lyse der viralen Partikel. Vor dem Auswaschen der Nukleinsäuren wurde eine zusätzliche Zentrifugation ohne Waschlösung durchgeführt, um den Alkohol zuverlässig aus der Matrix zu entfernen. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte nicht mit dem beigelegten Puffer, der die LC-PCR inhibieren kann, sondern mit DEPC-Wasser, da hierdurch keine zusätzlichen Salze in den Meßansatz des Lightcyclers überführt werden.

2.2.7. Quantifizierung viraler Nukleinsäure (real-time PCR)

Das Prinzip realtime PCR mit dem LightCycler-System ist eine Weiterentwicklung der Standard-PCR. Während bei der Standard-PCR der quantitative Nachweis eines Genoms nur durch Endpunkttitration möglich ist, misst man bei der sog. Real-time PCR nach jedem Amplifikationszyklus ein Signal. Aus der Veränderung dieses Signales kann auf die Ausgangskonzentration zurückgeschlossen werden. Außerdem kann nach der beendigten Amplifikation die Spezifität des amplifizierten Produktes durch eine Schmelzkurvenanalytik bestimmt werden.

Um die Amplifikatkonzentration kontinuierlich zu messen, wird zwischen zwei Zyklen die Probe mit einem Lichtstrahl angeregt und ihre Fluoreszenz ermittelt, die der Amplifikatmenge proportional ist. Hierbei kommen zwei verschiedene Systeme zum Einsatz:

Bei der SYBR-Green Methode lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in die Doppelstrangstruktur des Amplifikates ein und kann dann durch UV Licht angeregt werden.

Bei der HybProbe-Methode lagern sich während des Annealing Hybridisierungssonden an die einsträngige cDNA an. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide, die – ähnlich Primern – an der für sie spezifischen Position der cDNA binden und paarweise eingesetzt werden. Von Primern unterscheiden sie sich dadurch, daß sich bei einer HybProbe am 3'-Ende ein Fluoreszeinmolekül (Donor), am 5'-Ende der anderen ein LC-Rot-Molekül (Akzeptor) kovalent gebunden ist. Um zu verhindern, daß die Akzeptor-Sonde ihrerseits als Primer wirken kann, ist sie an ihrem 3'-Ende methyliert. Lagern sich nun beide Sonden mit ihren Köpfen in einem Abstand von 1-5 Basen an die cDNA an, transferiert der Donor nach Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Energie an den Akzeptor. Dieser strahlt dann Licht einer anderen Wellenlänge ab (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET, s. Abb. 5). Das abgestrahlte Licht wird gemessen. Die Wellenlänge des abgestrahlten Lichtes ist abhängig vom verwendeten LC-Rot. Dadurch ist es möglich, in einem Ansatz Hybprobes verschiedener Spezifität einzusetzen, die beispielweise zur Detektion unterschiedlicher Genotypen genutzt werden können. (Übersicht FRET: Didenko, 2001)

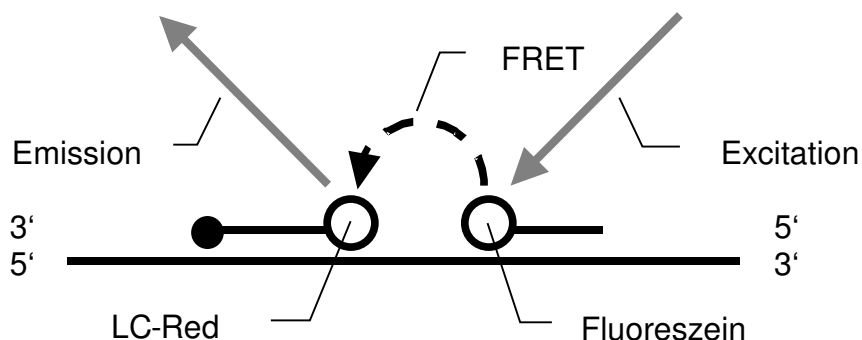


Abbildung 5: Prinzip der Hybprobe-Methode: Die Energie einstrahlenden Lichtes (Excitation) wird vom Fluoreszein durch FRET auf das LC-Red übertragen und mit einer anderen Wellenlänge abgestrahlt (Emission)

Zur Quantifizierung wird in jedem Zyklus der PCR die Fluoreszenz gemessen; bei der SYBR-Green-Methode nach der Elongation, bei der HybProbe Methode nach der Annealing-Phase. Eine Erhöhung der Spezifität ist möglich, wenn vor der Messung die Temperatur soweit erhöht wird, daß Hybprobes, die trotz einzelner Fehlpaarungen an die cDNA gebunden haben, wieder abfallen, bzw.

Fehlampflikate bei der SYBR-Green-Methode schon wieder auseinander geschmolzen sind.

Eine Hintergrundfluoreszenz ist von Anfang an vorhanden, die in allen Proben annähernd gleich ist. Solange sich noch wenig PCR-Produkt im Ansatz befindet, ist eine Zunahme der Fluoreszenz praktisch nicht meßbar. Schließlich ist soviel PCR-Produkt vorhanden, daß zwischen zwei Messungen diskriminiert werden kann. Später wächst die Zunahme der Fluoreszenz exponentiell an, geht dann aber in eine Plateauphase über, wenn gegen Ende des Laufes alle fluoreszierenden Moleküle an Amplifikat gebunden sind, bzw. die freien desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTP) in ihrer Konzentration sinken oder die Aktivität der Polymerase nachläßt.

Die gemessenen Fluoreszenzaktivitäten werden in Bezug zur Anzahl der verstrichenen Zyklen grafisch dargestellt. Der Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenzzunahme wird ermittelt, indem eine Regressionsgerade durch Punkte auf der Fluoreszenzfunktion gelegt und ihr Schnittpunkt mit der Zeitachse errechnet wird (Crossing point). Dieser ist umso früher, je mehr cDNA in der ursprünglichen Probe war. Die Anzahl der Punkte, durch die die Regressionsgerade definiert wird (Fit points) kann durch den Benutzer festgelegt werden. Dabei dürfen die Fit points nur im exponentiellen Bereich des Signalzuwachses liegen, da der Crossing point sonst in Richtung kleinerer Zyklenzahlen verschoben wird.

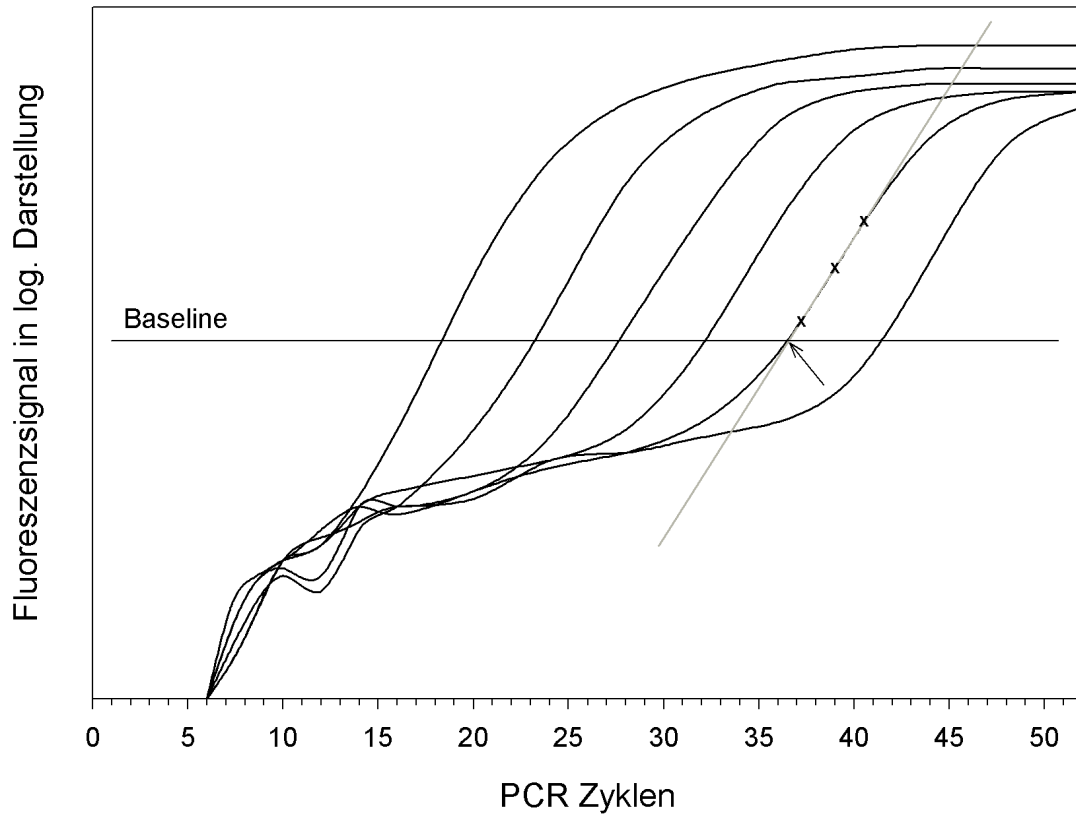


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Lightcycler-Laufes mit 6 Proben. (Verdünnungsreihe des B19-Standards) Bei der 5. Probe wurde der Crossing point (←) mit der Baseline durch die 3 eingetragenen Fit points bestimmt. — Regressionsgerade x Fit points

Durch das Mitführen der Verdünnungsreihe eines Standards kann der DNA-Gehalt der Probe quantifiziert werden, indem man die bekannte Konzentration gegen die Schnittpunkte mit der Zeitachse in einer Grafik in halblogarithmischer Darstellung aufträgt, eine Regressionsgerade einzeichnet und nun die unbekannte Konzentration anhand ihres Schnittpunktes mit der Gerade ermittelt. Dies wird durch einen Algorithmus in der LightCycler Software automatisch generiert (Abb. 7). Üblicherweise wird die Konzentration in DNA-Molekülen pro mL angegeben. Die DNA-Moleküle werden vom Hersteller Roche als „copies“ bezeichnet.

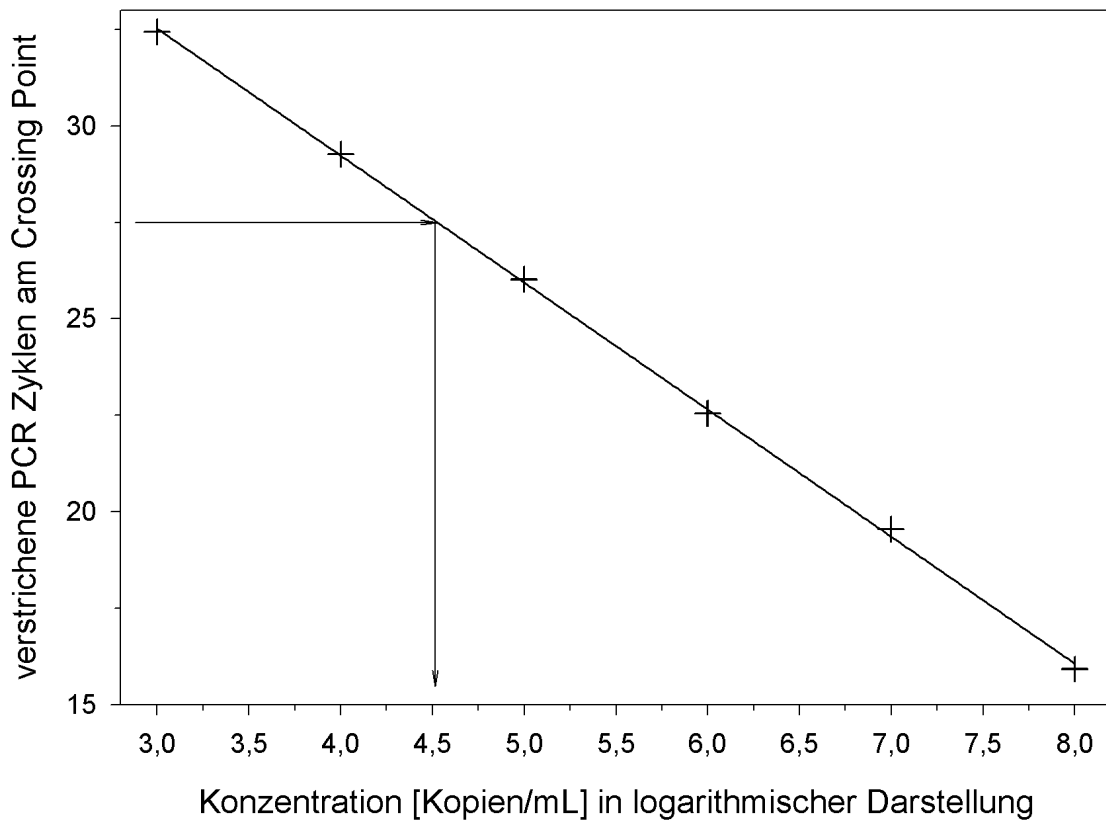


Abbildung 7: Beispiel für die Ermittlung einer unbekanntem Konzentration mit Hilfe der Regression durch die Crossing Points (+) des Standards aus Abb. 6 .

Zur Spezifitätsprüfung dient die Schmelzkurvenanalytik. Nach Ende des letzten Zyklus folgt eine weitere Denaturierung und anschließend ein letztes Annealing. Bei der SYBR-Green-Methode lagern sich nun die beiden Komplementärstränge aneinander – und zwischen ihnen das SYBR-Green – an. Bei der HybProbe-Methode lagern sich die Hybprobes an ihre spezifischen Positionen an. Nun wird die Probe in 0,1 °C Schritten erhitzt und jedes Mal die Fluoreszenz gemessen. An der für die Länge des Amplifikates spezifischen Schmelztemperatur (SYBR-Green), bzw. der beiden Hybprobes fällt der Doppelstrang auseinander und die Fluoreszenz nimmt ab. Die negative erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ($-dF/dT$) zeigt als ihr Maximum den Schmelzpunkt an. Als anschauliches Beispiel mag *Abb. 8* dienen:

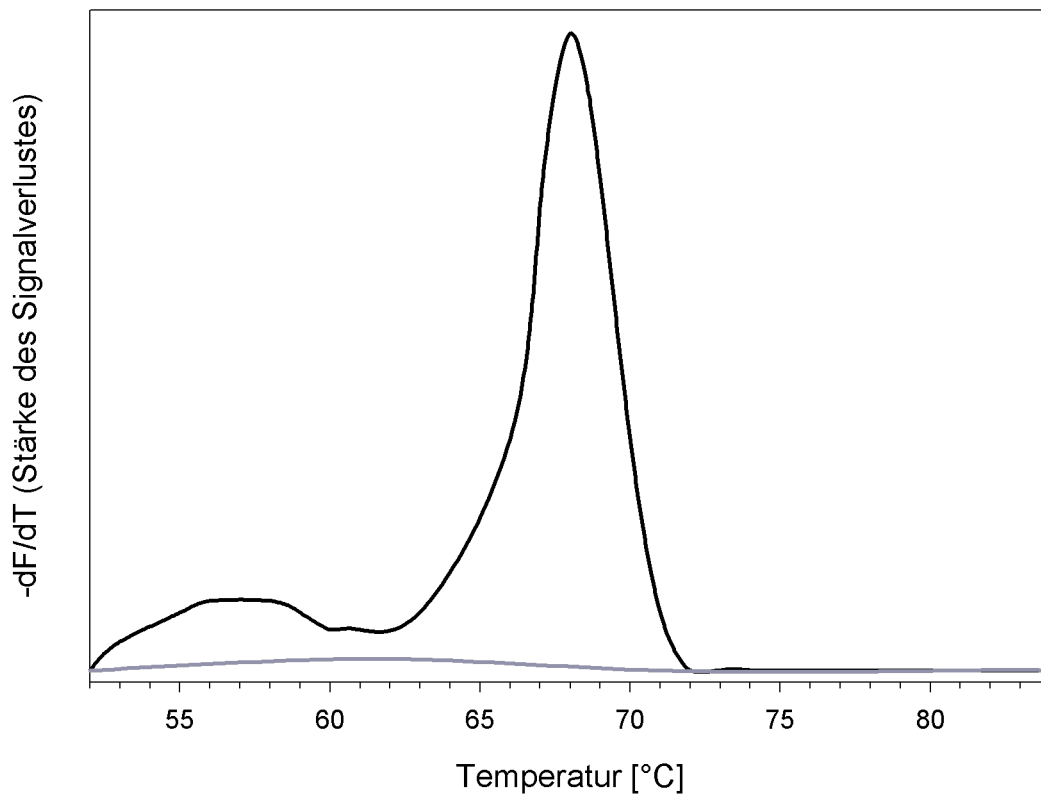


Abbildung 8: Beispiel für die Schmelzkurven zweier PCR-Ansätze. — Probe A: HCV positiv, Spezifisches Produkt bei 68 °C, — Probe B: negativ

Probe A hat eine sehr enge Schmelzkurve, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich alle Hybprobes gleichzeitig lösen. Bei SYBR-Green zeigt sich ein ähnliches Bild, dies bedeutet hier jedoch, daß die DNA-Doppelstränge gleichzeitig auseinanderfallen. Das Amplifikat sollte also hoch-spezifisch sein. Bei Probe B ist der Signalabfall über das gesamte Temperaturspektrum gleichmäßig, weshalb keine spezifischen Bindungen vorzuliegen scheinen; es zeigt somit kein Amplifikat an.

Während auf diese Weise bei der SYBR-Green-Methode nur eine geschätzte Aussage über die Länge des entstandenen Amplifikates oder etwaiger entstandener Nebenprodukte gemacht werden kann, bietet die HybProbe-Methode den Vorteil, daß eine Aussage über die Spezifität des Amplifikates möglich ist: Bei einem Amplifikat, für das die Hybprobes nicht spezifisch sind, binden sie nicht – es entsteht kein Signal. Die Hybprobes können jedoch – genau wie Primer – einzelne Fehlpaarungen während des Annealing tolerieren, so daß sie sich auch an Mutationen anlagern können; allerdings bricht der Doppelstrang nun schon bei niedrigeren Temperaturen auseinander. Liegt die Schmelztemperatur

einer Probe niedriger als zu erwarten ist, ist dies ein Hinweis darauf, daß sich innerhalb einer Hyprobe eine oder mehrere Fehlpaarungen mit der cDNA befinden – zum Beispiel bei einem anderen Genotyp, dessen Mutation sich innerhalb des Gegenstranges der Sonde befindet.

2.2.7.1. Praktische Durchführung der LC-PCR

Die verwendeten Protokolle zum Nachweis aller verwendeten Viren haben folgende Gemeinsamkeiten: Beim Nachweis viraler RNA werden zunächst zur Entfaltung möglicher Sekundärstrukturen 10 µl der extrahierten RNA mit 1 µl des as-Primers (10 mM) für eine Minute bei 95 °C und eine Minute bei 56 °C inkubiert.

Als Standard wurde entweder ein am WHO-Standard geeichtes Patientenserum oder – bei der Beurteilung von GEC-Läufen mit „Eichviren“ – die unverdünnte Probe verwendet. Der Standard wird mindestens 3 mal um eine LOG-Stufe verdünnt, so daß mindestens 4 Standards verwendet werden. Wasser wird als Negativkontrolle mitgeführt. Die Erfahrung mit anderen Amplifikaten hat gezeigt, daß bei einer Konzentration von ungefähr $1 \cdot 10^6$ Kopien/mL und optimaler Effizienz der Amplifikation (Slope 3,1 bis 3,4) der Crossing Point bei ungefähr 24 Zyklen liegt. Bei Eichviren mit unbekannter oder einer durch andere Techniken als PCR bestimmten Konzentration, wurden (falls nicht anders angegeben) die Standards deshalb so abgeglichen, daß ein Signal mit Crossing-Point 24 Zyklen $1 \cdot 10^6$ GE/mL entspricht.

Mastermix und Probe werden in eine LC-Kapillare pipettiert, bei 1500 U/Min 30 sec. zentrifugiert und dann in das LC-Karussell eingesetzt.

Die Annealingtemperatur während der Amplifikation wird im Sinne einer Touch-down PCR variiert, um die Spezifität der Amplifikation in der Anfangsphase der PCR zu erhöhen und unerwünschte Nebenprodukte durch Selbstkomplementarität der Oligonukleotide oder Amplifikation unspezifischer DNA bei niedrigen Temperaturen zu vermeiden. Beim ersten Zyklus findet das Annealing bei 64 °C statt, bei jedem weiteren Zyklus erniedrigt sich die Temperatur um 1 °C bis sie schließlich für den Rest des Laufes bei 54-50 °C stattfindet. Da nach unseren Erfahrungen die Polymerase bei langsamerer Erhitzung für den Elongationsschritt größere Effektivität aufweist, wird die Geschwindigkeit der Aufheizung der Kapillare auf maximal 2 °C/s begrenzt, während sonst Heizgeschwindigkeiten von 20 °C/s möglich sind.

Die Signalaquisition erfolgt bei der SYBR-Green-Methode etwa 1° unter der Temperatur des Schmelzpunktes des Amplifikates. Bei der HybProbe-Methode ist zu berücksichtigen, daß die beiden Sonden unterschiedliche Schmelzpunkte haben können. Die Signalaquisition erfolgt im etwa 0,5° unterhalb des niedrigeren Schmelzpunktes der beiden Sonden.

Direkt nach der Amplifikation wird die Schmelzkurvenanalytik durchgeführt. Dazu werden nach Denaturierung und Annealing von der Start- bis zur Endtemperatur die Proben um jeweils 0,1°C erwärmt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Bei der Etablierung einer Methode wurde die Länge des Amplifikates anschließend durch Elektrophorese im Agarose-Gel (1,5%) überprüft. Bei den folgenden Läufen wurde die Spezifität dann lediglich durch die Schmelzkurve bestimmt. Für die Bestimmung von HCV-RNA und HBV-DNA konnte auf im Institut bereits etablierte Methoden zurückgegriffen werden; für die Quantifizierung von Semliki Forest Virus (SFV), Simian Virus 40 (SV40), Poliovirus Impfstamm Sabin I, Bovines Virus Diarrhoe Virus (BVDV) und Parvovirus B19 wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Protokolle entwickelt.

2.2.7.2. Real-time RT-PCR von HCV-RNA

Methode nach (Schüttler et al., 2004):

Mastermix je Probe:

	<i>Endkonzentration</i>
4 µl Reaction Mix (enthält 3mM MgCl ₂)	
3 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6,75 mM
1 µl 10mM Primer sense (HCV NCR s149)	50 pM
1 µl 10mM Primer anti-sense (HCV NCR as342)	50 pM
1 µl 8mM Hybprobe LC Red (HCV LC)	40 pM
0,5 µl 8mM Hybprobe FL-Green (HCV FL)	20 pM
0,1 µl Wasser	
0,4 µl Enzymmix (RT/ Polymerase)	

entspricht 11 µl/ Ansatz, dazu 9 µl RNA Extrakt
PCR Reagenzien aus dem RNA HybProbe Kit der Fa. Roche.

Als Standard wird ein Patientenserum verwendet, das am WHO-Standard 96/790 geeicht und auf 1·10⁶ IE/mL eingestellt ist (Schüttler et al., 2004). Durch den Überschuß des LC Red wird ein stärkeres Signal erzeugt, als dies bei einem 1:1 Verhältnis von LC Red und FL Green erreicht wird.

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [s]
Reverse Transkription	1		55	720
Denaturierung	1		95	30
Amplifikation	45	Denaturierung	95	3
		Annealing Fluoreszenzmessung	64-54 step size 1	7
		Elongation	72	14
Schmelzen	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	50	15
		Melting	50-90	0
Kühlen	1		40	60

2.2.7.3. Real-time PCR für HBV-DNA

Methode nach (Jursch et al., 2002):

Mastermix je Probe:

2,6 µl Wasser	
2,4 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6 mM
1 µl 10 mM Primer sense (HBV X2s)	50 pM
1 µl 10 mM Primer antisense (HBV X2as)	50 pM
0,5 µl 8 mM FL-Green (HBV XBFL)	20 pM
0,5 µl 8 mM LC-Red (HBV XBLC)	20 pM
2 µl Fast Start Reaktionsmix (enthält 6 mM MgCl ₂)	

Endkonzentration

entspricht 10 µl/ Ansatz, dazu 10 µl DNA Extrakt
PCR Reagenzien aus dem DNA HybProbe Kit der Fa. Roche.

Als Standard wird ein Patientenserum verwendet, das eine Konzentration von $6,25 \cdot 10^6$ Ge/mL aufweist. Es werden 4 Verdünnungstufen mitgeführt.

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [s]
Aktivierung	1		95	600
Amplifikation	45	Denaturierung	95	10
		Annealing Fluoreszenzmessung	64-52 step size 1	15
		Elongation	72	13
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	50	15
		Melting	50-95	0
Kühlen	1		40	30

2.2.7.4. Real-time RT-PCR von BVDV-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode.

Mastermix je Probe:

	<i>Endkonzentration</i>
4 µl Reaction Mix (enthält 3mM MgCl ₂)	
3 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6,75 mM
1 µl 10 mM Primer sense (BV-s-NCR)	50 pM
1 µl 10 mM Primer antisense (BV-as-NCR)	50 pM
1,6 µl Wasser	
0,4 µl Enzymmix (RT/ Polymerase/ SYBR-Green)	

entspricht 11 µl/ Ansatz, dazu 9 µl RNA Extrakt

PCR Reagenzien aus dem RNA SYBR-Green Kit der Fa. Roche.

Als Probe, bzw. Positivkontrolle und Standard diene die unverdünnte Probe (Zellkulturstamm BVDV Osloss, TCID₅₀ 10⁶ – 10⁷/mL, freundlicherweise überlassen von Dr. M. König, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen).

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [s]
RT	1		55	720
Denaturierung	1		95	30
Amplifikation	40	Denaturierung	95	3
		Annealing	62-49, step size 1	7
		Elongation	72	14
		Signalaquisition	86	1
Schmelzen	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	65	15
		Melting	65-95	0
Kühlen	1		40	60

2.2.7.5. Real-time RT-PCR von Poliovirus-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode.

Mastermix je Probe:

	<i>Endkonzentration</i>
4 µl Reaction Mix (enthält 3mM MgCl ₂)	
2,5 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6,13 mM
1 µl 10 mM Primer sense (PVSab1-s)	50 pM
1 µl 10 mM Primer antisense (PVSab1-as)	50 pM
2,1 µl Wasser	
0,4 µl Enzymmix (RT/Polymerase/SYBR-Green)	

entspricht 11 μl / Ansatz, dazu 9 μl RNA Extrakt
PCR Reagenzien aus dem RNA SYBR-Green Kit der Fa. Roche.

Als Probe, bzw. Positivkontrolle und Standard diente ein Zellkulturüberstand mit $6,3 \times 10^9$ TCID₅₀/mL des Impfstammes SABIN I, was aufgrund des Signals in der PCR ungefähr einer Konzentration von $1 \cdot 10^{11}$ Geq/mL entsprechen dürfte (Freundlicherweise überlassen von Frau Dr. B. Grosse, Paul-Ehrlich-Institut, Langen).

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer[s]
RT	1		55	720
Denaturierung	1		95	30
Amplifikation	45	Denaturierung	95	3
		Annealing	64-51, step size 1	7
		Elongation	72	12
		Fluoreszenzmessung	85	1
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	50	15
		Melting	65-95	0
Kühlen	1		40	30

2.2.7.6. Real-time PCR von Parvovirus B19 DNA

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode.

Mastermix je Probe:

3,2 μl Wasser	<i>Endkonzentration</i>
2,4 μl 25 mM Magnesiumchlorid	6,0 mM
1 μl 10 mM Primer sense (B19-1s)	50 pM
2 μl 10 mM Primer antisense (B19-1as)	50 pM
0,4 μl SYBR Green 1:900	
2 μl Fast Start Reaktionsmix (enthält 6 mM MgCl ₂)	

entspricht 11 μl / Ansatz, dazu 9 μl DNA Extrakt
PCR Reagenzien aus dem DNA HybProbe Kit der Fa. Roche.

Als Probe, bzw. Positivkontrolle und Standard diente zum einen ein Anti-B19-IgG positives Patientenserum mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ Ge/mL der Sammlung des Institutes, zum anderen ein Ak-freies Patientenserum aus der Frühphase einer Infektion mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{10}$ Ge/mL, deren Konzentration mittels WHO Standard bestimmt wurde (Freundlicherweise überlassen von Dr. J. Blümel, Paul-Ehrlich-Institut, Langen).

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer[s]
Aktivierung	1		95	600
Amplifikation	30	Denaturierung	95	5
		Annealing	63-51, step size 1	12
		Elongation	72	13
		Fluoreszenzmessung	81	1
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	67	15
		Melting	67-95	0
Kühlen	1		40	30

2.2.7.7. Real-time PCR von SV40 DNA

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode.

Mastermix je Probe:

3,2 µl Wasser	<i>Endkonzentration</i>
2,4 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6,0 mM
1 µl 10 mM Primer sense (SV1-s)	50 pM
2 µl 10 mM Primer antisense (SV1-as)	50 pM
0,4 µl SYBR Green 1:900	
2 µl Fast Start Reaktionsmix (enthält 6 mM MgCl ₂)	

entspricht 11 µl/ Ansatz, dazu 9 µl DNA Extrakt
PCR Reagenzien aus dem DNA HybProbe Kit der Fa. Roche.

Als Probe, bzw. Positivkontrolle und Standard diente ein Zellkulturüberstand mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ TCID₅₀/mL, was ungefähr $1 \cdot 10^{10}$ Ge/mL entspricht. (Freundlicherweise überlassen von Dr. C. Jursch, Eurovir, Luckenwalde)

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer[s]
Aktivierung	1		95	600
Amplifikation	42	Denaturierung	95	5
		Annealing	63-51, step size 1	12
		Elongation	72	13
		Fluoreszenzmessung	78	1
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	67	15
		Melting	67-95	0
Kühlen	1		40	30

2.2.7.8. Real-time RT-PCR von Semliki Forest Virus RNA

Im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode.

Mastermix je Probe:

	<i>Endkonzentration</i>
4 µl Reaction Mix (enthält 3 mM MgCl ₂)	
2,5 µl 25 mM Magnesiumchlorid	6,13 mM
1 µl 10 mM Primer sense (SFV1-s)	50 pM
1 µl 10 mM Primer antisense (SFV1-as)	50 pM
2,1 µl Wasser	
0,4 µl Enzymmix (RT/Polymerase/SYBR-Green)	

entspricht 11 µl/ Ansatz, dazu 9 µl RNA Extrakt

PCR Reagenzien aus dem RNA SYBR-Green Kit der Fa. Roche.

Als Probe, bzw. Positivkontrolle und Standard diente ein Zellkultur-Überstand mit $>10^{10}$ TCID₅₀/mL (Freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. G. Wengler, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen).

Abschnitt	Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer[s]
RT	1		55	720
Denaturierung	1		95	30
Amplifikation	46	Denaturierung	95	3
		Annealing	63-52, Stepsize 1	7
		Elongation	72	12
		Fluoreszenzmessung	81	1
Schmelzkurve	1	Denaturierung	95	10
		Annealing	65	15
		Melting	65-95	0
Kühlen	1		40	30

2.2.8. Quantifizierung des HCV-Core-Antigens

Zur Bestimmung des HCV-Core-Antigen wurde ein in der Testphase befindlicher HCV-Core-ELISA der Firma Ortho nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Das System befand sich in der klinischen Evaluation, an der auch unser Institut teilnahm. Gegenüber konventionellen ELISAs hat das System einige Besonderheiten (Bouvier-Alias et al., 2002):

- Die Epitope des Core-Ag werden durch Inkubation bei 56°C in einem Detergenz freigelegt.

- Das Konjugat enthält Antikörper gegen drei verschiedene Epitope; jeder dieser Antikörper ist mit zwei Molekülen Peroxidase konjugiert.
- Die Nachweisgrenze liegt bei 1,5 pg/mL.
- Der Nachweis wird durch gleichzeitig vorliegende Antikörper gegen HCV Core Antikörper nicht gestört.

2.2.9. Radiale Immundiffusion humaner Immunglobuline

Zur Eichung des Gelmaterials der GEC-Säule wurden als Meßpunkte die Immunglobuline der Klassen M und G verwendet. Um die Fraktion mit dem höchsten Ig-Anteil zu bestimmen, wurde das Prinzip der Radialen Immundiffusion nach Mancini verwendet (Mancini et al., 1965). Hierbei kamen käufliche Partigen-Platten der Firma Dade Behring, Marburg zum Einsatz. Da diese jedoch zur Bestimmung von Ig im Serum konzipiert sind, reichen die Konzentrationen in den GEC-Fractionen bei Anwendung nach Vorschrift des Herstellers nicht aus, um sichtbare Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen darzustellen. Bei den IgG-Platten, die in ihrer Vorschrift die Verdünnung des Serums im Verhältnis 1/10 fordern, wurden deshalb die unverdünnten Fraktionen aufgetragen. Die IgM-Platten werden nach Vorschrift mit unverdünntem Serum beschickt. In diesem Fall wurden 200 µl der Fraktionen mit der Speedvac-Zentrifuge auf 70 µl eingeeengt und anschließend in Portionen á 10 µl aufgetragen. Nach 2,5 Tagen Inkubation bei T_r wurden die Diffusionsringe mit einer Schiebelehre ausgemessen, der Durchmesser quadriert und so das Konzentrations-Maximum ermittelt.

2.2.10. Quantifizierung des HBsAg

Das HBsAg wurde durch das diagnostische Labor des Institutes mit Hilfe des AxSym-Systems (Fa. Abbott, Delkenheim) bestimmt. Um durch die hohen HBsAg-Titer des verwendeten Serum differenzierbare Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen feststellen zu können, wurde das Eluat mit Laufmittel 1:100 verdünnt. Die Konzentration wird als Quotient Signalstärke/Kontrolle (S/Co) angegeben.

2.2.11. Präzipitation von Immunglobulin-beladenen HCV-Partikeln

Für die Immunpräzipitation von IgG-beladenen Viren wurden zwei Verfahren durchgeführt:

Immunpräzipitation nach Hijikata:

Die zu untersuchende Probe (100 µL) wurde mit polyklonalen Anti-human-IgG-Antikörper (Kat. 709-005-149, Fa. Dianova, aufsteigende Reihe von 10-100 µL Ak Lösung ad 100 µL PBS) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe für 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet in 500 µl PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet erneut in 500 µl PBS aufgenommen und weiterverarbeitet. Das Pellet sollte nun die Ak-beladenen Viren enthalten, der erste Überstand die freien Viren. Als Kontrolle gegen unspezifische Ak-Bindung dienten Präzipitationen mit Antikörpern gegen Immunglobuline der Maus. Als positiv wurden nur Versuche gewertet, bei denen im Präzipitat aus Anti-human-IgG-Ak mehr Viren gebunden waren als im Präzipitat aus nicht-Anti-human-IgG-Ak (Hijikata et al., 1993).

Immunpräzipitation mit Magnetobeads:

Zum Einsatz kamen tosylaktivierte Dynabeads M280 der Firma Dynal A.S., Oslo/ Norwegen (Kat. Nr. 142.03). Antikörperbeladung und Immunpräzipitation nach Vorschrift des Herstellers (Dynal, 1996).

Bei dieser Methode sind Eisenpartikel mit einer proteinbindenden Oberfläche beschichtet. Durch den Eisenkern können die Partikel gewaschen werden, indem das Reaktionsgefäß in einen Magneten eingespannt wird. Die Partikel wandern nun zur Wand und die klare Flüssigkeit kann abgehoben werden. An der Oberfläche können Antikörper gegen ein beliebiges Antigen gebunden werden, wodurch die Beads dazu benutzt werden können, ein Antigen mit einer sehr schonenden Methode aus einer Lösung zu entfernen.

Dazu wurden 300 µL Dynabeads zunächst dreimal in PBS gewaschen. 50 µL Anti Human IgG Suspension (Kat. 709-005-149, Fa. Dianova) wurden mit 350 µL Boratpuffer die Dynabeads in dieser Lösung aufgenommen. Danach folgt eine Inkubation bei 37°C über 16 h. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA 1% werden die Beads in Tris/BSA 1% über Nacht bei T_r rotierend inkubiert, um die freien, proteinbindenden Komplexe abzusättigen. Nach einem erneuten

Waschen in PBS werden die Beads in 300 μ L PBS aufgenommen und sind nun fertig zum Einsatz.

140 μ L der zu untersuchenden Probe wird mit 20 μ L Dynabeads über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird das Reaktionsgefäß in einen magnetischen Halter eingespannt, so daß die Beads zum Magneten hin an die Wand wandern. Der Überstand wird abgehoben und enthält nun die Partikel, die nicht das Antigen des gebundenen Antikörpers enthalten. Die Beads werden drei Mal mit PBS gewaschen und der Überstand verworfen. Zum Schluß werden sie in PBS aufgenommen und analysiert.

2.2.12. Entfernung der Lipidmembran von HCV

Unter der Vorstellung, die Lipidmembran des HCV zu entfernen um den Stokes'schen Durchmesser eines hypothetischen Capsids bestimmen zu können, kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz:

Äther: Diethylether und Serum wurden im Verhältnis 1:1 und 1:2 vermischt, im Vortex-Rüttler vermengt, zur Phasentrennung 1 min. bei 6000 U/min zentrifugiert und anschließend die wäßrige Phase analysiert.

Chloroform: Chloroform und Serum wurden im Verhältnis 1:1 und 1:2 miteinander vermischt und anschließend 1 min. bei 6000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgehoben.

Phospholipase C: 250 IU Phospholipase C (Sigma-Aldrich, Kat. Nr. P7633) wurden in 0,5 mL PBS aufgenommen und zusammen mit 0,5 mL Serum und 20 μ L CaCl (1 M) für 45 min. bei 37° C inkubiert und anschließend analysiert.

Äther-Butanol: Ein Gemisch 85% Diisopropyläther und 15% 1-Butanol wurde im gleichen Verhältnis mit Serum gemischt und anschließend bei T_r für 30 min. inkubiert. Die Methode wurde für HCV schon angewandt (André et al., 2002), die Methodik fehlt jedoch in der Publikation (nach Anfrage schriftliche Mitteilung des Autors).

2.2.13. Gelfiltration kleiner Volumina

Für erste Vorversuche wurden 2 mL Säulen (Katalog-Nr. 731-1550) und 20 mL Säulen (Katalog-Nr. 732-1010) der Firma Biorad verwendet. Die beigelegten Fritten zum Verschuß der Gelmatrix gegen den Säulenboden sind zu großpo-

rig, um das Gel in der Säule zurückzuhalten. Deshalb wurde zusätzlich ein Filter der Stärke 2208 der Firma Schleicher & Schuell von Hand zugeschnitten. Als Gelmatrix diente Superose 6 prep grade (Kat. Nr. 17-0489-01) der Firma Amersham-Pharmacia, Freiburg. Nachdem das Gel drei mal in Laufmittel sedimentiert und der Überstand abgehoben ist, kann die Säule befüllt werden. Dazu wird der Ablauf geöffnet, Laufmittel abgelassen und solange Gel nachgefüllt, bis die gewünschte Säulenhöhe erreicht ist. Danach Verschuß des Ablaufs zur Lagerung.

Filtration: Der Ablauf wird geöffnet und der Überstand abgelassen. Auf das Gel wird nun die Probe aufgetragen. Ab diesem Zeitpunkt wird der Ablauf in Fraktionen asserviert. Das Eluat wurde von Hand in Fraktionen zu ungefähr 0,5 mL unterteilt und asserviert. Nachdem die Probe in die Säule eingezogen ist, wird solange Laufmittel aufgetragen, bis die Probe komplett ausgewaschen ist. Vor erneuter Verwendung muß die Säule wieder mit Laufpuffer gespült werden.

2.2.14. Analytische Gel-Ausschluß-Chromatographie (GEC)

Befüllen der Säule XK16/100:

Die angelieferte Gelmatrix (Biorad Gel A50m, Kat.-Nr. 151-1340, suspendiert in einem Alkohol/Wasser-Gemisch) wird durch mehrmaliges Aufrühren und Sedimentieren in Laufpuffer equilibriert und zügig ohne Blasenbildung in die Säule gefüllt. Durch die angeschlossene Pumpe kommt es zu einer gleichmäßigen Verdichtung der Matrix. Bei der Befüllung und beim Betrieb kommt nur steriler und entgaster Laufpuffer zum Einsatz.

Die Befüllung der Säule sollte bei der Temperatur stattfinden, bei der auch später der Lauf stattfindet. In unserem Falle fand das Packen, die Lagerung und die analytischen Läufe in einer Kühlkammer bei einer Temperatur von 4°C statt. Vor dem ersten Lauf, der analysiert werden soll, sollte eine Probe mit dem zu untersuchenden Agens (in der Regel humanes Serum) über die Säule geführt werden, um Verfälschungen der Meßwerte durch unspezifische Bindungen an der Gelmatrix zu minimieren.

Zur längerfristigen Lagerung wird die Säule mit dem doppelten Säulenvolumen mit Laufmittel/ NaN_3 1% gespült und anschließend Zu- und Ablauf abgedichtet. Vor erneuter Inbetriebnahme muß erneut mit Laufpuffer gespült werden.

Der Versuchsaufbau der GEC ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt:

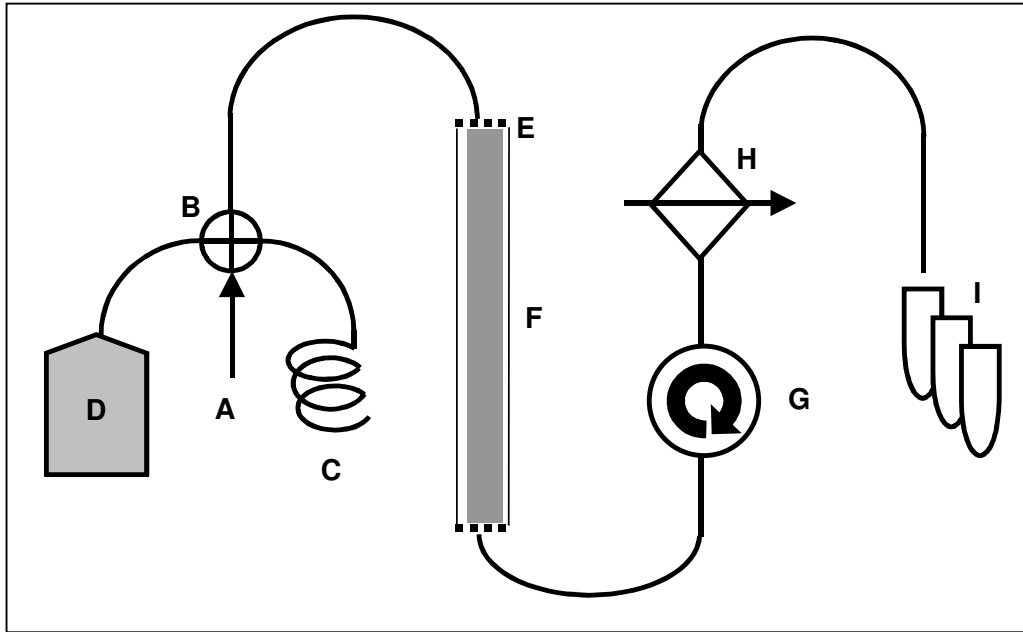


Abbildung 9: Schematischer Versuchsaufbau der GEC. **A:** Probeneingang **B:** Verteilerventil **C:** Probenreservoir **D:** Laufmittelreservoir **E:** Kopfstück mit Sieb **F:** GEC-Matrix **G:** Peristaltikpumpe (Sog) **H:** Durchflußphotometer mit Schreiber **I:** Fraktionssammler.

Die Probe wird zunächst bei 15 000 U/Min und 4°C 10 Min zentrifugiert, um makroskopische Feststoffe zu entfernen. Danach wird die Probe auf die Säule aufgetragen.

Die Probe wird mittels einer Spritze über den Probeneingang (A) durch den Verteiler (Ventil V7, Amersham-Pharmacia, Freiburg) (B) in das Probenreservoir (C) geladen werden und läuft dann „im Rückwärtsgang“ wieder durch den Verteiler auf die Säule. Als Probenreservoir dient ein Schlauch mit einem Volumen von 2 mL; das Ende ist über eine Wasserfalle mit einem Sterilfilter gegen die Umwelt verschlossen. Nachdem die Probe aus dem Reservoir auf die Säule geführt wurde, wird der Verteiler umgestellt, so daß nun das Laufmittelreservoir (D) weitere Flüssigkeit in das System führt. Die Probe erreicht die Gelmatrix (F) durch das Kopfstück (E). Dieses sitzt fest auf der Matrix auf und erfüllt zwei Zwecke: Durch den festen Sitz wird der Totraum klein gehalten und durch das Sieb, das der Matrix direkt aufliegt (Maschengröße 10 µm), wird verhindert, daß Gelpartikel ausgeschwemmt werden. Am Fuß der Matrix sitzt ein dem Kopfstück ähnliches Fußstück. Von dort wird die Probe über die Pumpe (G) durch ein Durchflußphotometer (H) zum Fraktionssammler (I) geführt. Das Photometer dient zur Messung der relativen Proteinkonzentration; die Probe muß das Photometer von unten nach oben durchlaufen, damit evtl. angesaugte Luft die

Meßzelle schnell wieder verläßt. Der Fraktionssammler wird mit 100 Probenröhrchen a 3 mL Fassungsvermögen beschickt, ein Gefäß für den Vorlauf bereitgestellt. Um eine Bindung der eluierten Proteine an der Wand des Probenröhrchens zu verringern, werden die Röhrchen mit Laufmittel/BSA 0,1% ausgeschwenkt; zur Stabilisierung gegen Proteinase und RNAsen werden (falls nicht anders angegeben) 30 µl Laufmittel/BSA 4%/EDTA ad 50 mM vorgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. GEC-Vorversuche mit Säulen kleinen Volumens

Zunächst mußte untersucht werden, ob die Stabilität des HCV, das Laufmittel oder die Trennung in der GEC selbst mit den Nachweismethoden für RNA und Core-Ag kompatibel waren. Auch mußte geprüft werden, ob eine mögliche unspezifische Adsorption einer Trennung entgegensteht.

Für erste Versuche wurden 5, bzw. 20 ml Säulen (Poly-Prep Column, Bio-Rad mit Superose 6 prepgrade, Pharmacia, Schweden) gegossen. Als Probe zur Auftrennung dienten 100 µL des Serum A; die Matrix wurde mit PBS pH 7,4 equilibriert und gefahren. Das durch bloße Schwerkraft austropfende Eluat wurde in Fraktionen zu 0,5 mL aufgefangen. Von jeder Fraktion wurde die Extinktion bei 260nm, die HCV-RNA und das HCV-Core-Ag quantitativ bestimmt.

Die Verteilung von RNA und Core-Ag zeigte sich als nicht ganz kongruent, insgesamt war aber eine sehr gute Trennung von HCV-Partikeln von Serumbestandteilen zu erkennen (s. Abb. 10).

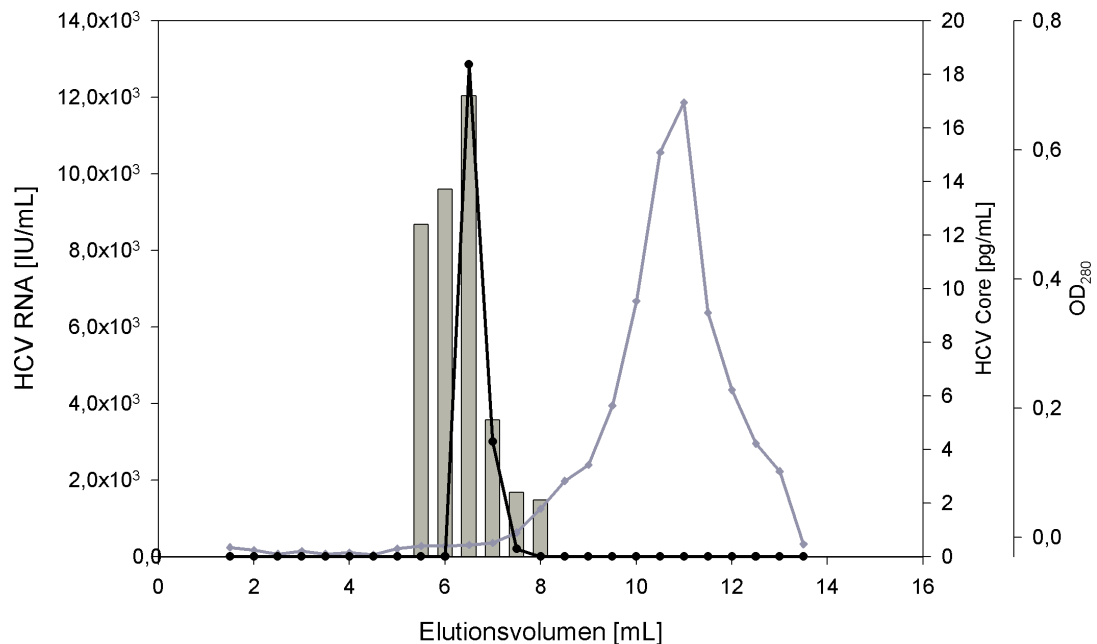


Abbildung 10: Vorversuch der GEC mit 0,5 mL 100 µL des Serum A auf Superose 6 bei 20 ml Matrixvolumen. — HCV RNA █ HCV Core — OD

Ein Vorteil der kleinen Säulenvolumina gegenüber der später verwendeten großen Säule ist, daß durch das direkte Auftragen auf die Matrix und das Fraktionieren direkt am Auslauf nahezu kein Totvolumen besteht und die Trennung in wenigen Minuten vollzogen ist. Zur Trennung von Viruspartikeln von Serumbe-

standteilen (s. Proteinpeak bei 280 nm) ist die Methode exzellent geeignet. Zur nanometrischen Bestimmung der Partikel ist die Trennfähigkeit jedoch zu gering; hierfür muß das Verhältnis aus Totalvolumen V_t und Fraktionsvolumen zu Gunsten von V_t verschoben werden, was nur in größeren Säulen möglich ist.

Insgesamt waren die RNA- und Core-Ag-Nachweismethoden nach erfolgter GEC in den kleinen Säulen erfolgreich, wobei sich jedoch schon ein prinzipielles Problem abzeichnete: Die Größe der Fraktionen kann nicht beliebig verkleinert werden, da ein gewisses Volumen für die Analysen benötigt wird. Das bedeutet (auch bei der Messung auf einer größeren Matrix), daß aus einer diskontinuierlichen Messung nicht ohne weiteres auf ein klares Elutionsvolumen V_e der Partikel und damit ihrer K_{av} -Werte geschlossen werden kann. Die Ungenauigkeit der Bestimmung von V_e ist daher theoretisch mindestens so groß wie ein Fraktionsvolumen; auch ist es nicht ausreichend objektiv, das V_e aus dem ersten Anstieg, dem absoluten Maximum oder einem Mittelwert beider zu bestimmen (vgl. Core-Ag Verlauf in Abb. 10). Um die folgenden Messungen mit großen Säulenvolumina zu objektivieren und die Genauigkeit zu steigern, mußte also ein Verfahren zur Auswertung der diskontinuierlichen Daten entwickelt werden.

3.2. Modell zur deskriptiven Analyse der GEC

3.2.1. Die Weibullfunktion zur Beschreibung des Elutionsverhaltens

Im Idealfall kann die Konzentration aller zu messenden Werte kontinuierlich während der Elution bestimmt werden, was auf Gaschromatographie oder HPLC zutrifft. Dadurch ist es leichter möglich, einen Peak eindeutig festzulegen, insbesondere wenn das Signal einer Gauß-Verteilung folgt. Diese Idealbedingungen treffen jedoch für die GEC nur eingeschränkt zu. Innerhalb eines GEC-Laufes ist die Messung der Proteinkonzentration mit dem Durchflußphotometer die einzige Größe, die kontinuierlich gemessen werden kann. Die virologischen Daten können nur bestimmt werden, indem das Eluat in Fraktionen unterteilt und diese einzeln analysiert werden. Dabei treten zusätzlich Meßschwankungen bei der Quantifizierung von viraler Nukleinsäure oder Antigen auf. Diese können bei der Quantifizierung des viralen Genoms zwar durch die Anwendung einer real-time PCR als dem derzeitigen Goldstandard der Nukleinsäurequanti-

fizierung minimiert werden, betragen aber selbst im optimalen Fall etwa 0,05 log, so daß auch diese Schwankung die Bestimmung des Maximums eines Peaks erschwert.

Aus den Erfahrungen der GEC bei der Anwendung für die Proteinauftrennung (Determann, 1967) war anzunehmen, daß eine Gauß-Verteilung der Daten nur als Grenzfall zu erwarten sei, vielmehr ist eine asymmetrische Datenverteilung auch aus theoretischen Erwägungen heraus eher zu erwarten. So zeigt sich bei schon bei Annahme von zwei Porengrößen in einer GEC-Modellrechnung eine asymmetrische Verteilung (Dondi et al., 2002); dies ist bei einer normalverteilten Porengröße der Matrix im realen Versuch daher sicher zu erwarten. Es galt nun eine Verteilung zu finden, die folgende Bedingungen erfüllten sollte:

- Ein eindeutiges V_e muß bestimmbar sein.
- Fallende und steigende Flanken sollen beschrieben werden können
- Eine mögliche Asymmetrie (Tailing-Effekt) muß durch die Verteilung beschrieben werden können und diese darf keinen wesentlichen Effekt auf das errechnete V_e haben.
- Die Weite des Peaks als Maß für die Heterogenität einer Partikelpopulation muß aus der Verteilung ableitbar sein.

Aus theoretischen Überlegungen zum Trennungsmechanismus der GEC (der letztlich jedoch nicht bis in jedes Detail physikalisch erklärbar ist) erscheint das Trennungsergebnis als Überlagerung zweier unabhängiger Verteilungen: Diffusion der Viruspartikel in verschiedene Kompartimente der Matrixpartikel (aufgrund der herstellungsbedingten schwankenden Porengröße der Matrix normalverteilt) und die Bewegungsverteilung von Partikeln in einer laminaren Strömung (durch eine Lorentz-Verteilung beschreibbar).

Als Verteilungsfunktion entschieden wir uns für eine Weibull-Funktion 4. Ordnung, da sie die obigen Kriterien erfüllt und als Näherungsfunktion das GEC-Elutionsprofil am genauesten beschreibt. Die Weibull-Verteilung wurde für physikalische Anwendungen 1937 von dem schwedischen Ingenieur Wallodi Weibull (1887 – 1979) entwickelt und zeigt ein breites Anwendungsspektrum auch für biologische Systeme (Weibull, 1951). Schon früh konnte die Anwendbarkeit auf Größenverteilungen gezeigt werden (z.B. Aerosolpartikel Tsu, 1952). Als Grenzfall liefert die Weibull-Verteilung eine Normalverteilung, so daß sie, nach

unserer Auffassung, universell zur Auswertung von Chromatogrammen verschiedenster Genese verwendet werden könnte. Unter den verschiedenen Formen der Weibull-Funktionen, erschien uns eine Ableitung aus der allgemeinen Formulierung unter Verwendung von vier Funktionsparametern empirisch die besten Resultate für die GEC zu ermitteln:

$$y = a \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\left(\frac{1-c}{c} \right)} \left[\frac{x-x_0}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \right]^{c-1} e^{- \left[\frac{x-x_0}{b} + \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1}{c}} \right]^c} + \frac{c-1}{c}$$

Gleichung 1: Weibull-Funktion mit vier Parametern. x_0 ist die Ordinate des Maximums und entspricht bei der Anwendung auf die GEC V_e bzw. K_{av} , a , b und c sind Skalare. (SPSS, 1998)

Durch Analyse der Rohdaten unter Vorgabe dieser Verteilungsfunktion können die Parameter a , b , c und x_0 (= K_{av} bzw. V_e) in einem Computermodell durch Iterationsverfahren bestimmt werden (Software SigmaPlot 6.0, SPSS Inc., USA); die Skalare und das x_0 bzw. der K_{av} -Wert ergeben sich unmittelbar aus der Anwendung der Weibullfunktion auf die Rohdaten, damit ist besonders die Angabe des K_{av} einer sonst unvermeidlichen subjektiven Willkür entzogen.

Die Anwendung einer solchen Verteilung auf die Rohdaten einer GEC ist bisher noch nicht berichtet worden. Da diese Verteilungsfunktion in ihrer neuartigen Anwendung auf die GEC-Läufe wesentlich die Ergebnisse der Größenbestimmung, Heterogenitätsabschätzung und die Präzision der K_{av} -Werte der Viruspartikel bestimmt, muß die Funktion im folgenden näher diskutiert werden. Bei der Kurvendiskussion unterstützte mich freundlicherweise Prof. Dr. Thomas Bartsch vom Mathematischen Institut der JLU, Professur für Analysis und mein Betreuer, Dr. Chr. Schüttler.

In Gleichung 1 ist x_0 die Ordinate des Maximums (entspricht K_{av} bzw. V_e), a und b sind Skalierungsparameter welche die Peakfläche in y , bzw. x Richtung erweitern. c ist ein Parameter für die Symmetrie.

Zur weiteren Demonstration soll folgende Abbildung dienen: (Abb. 11)

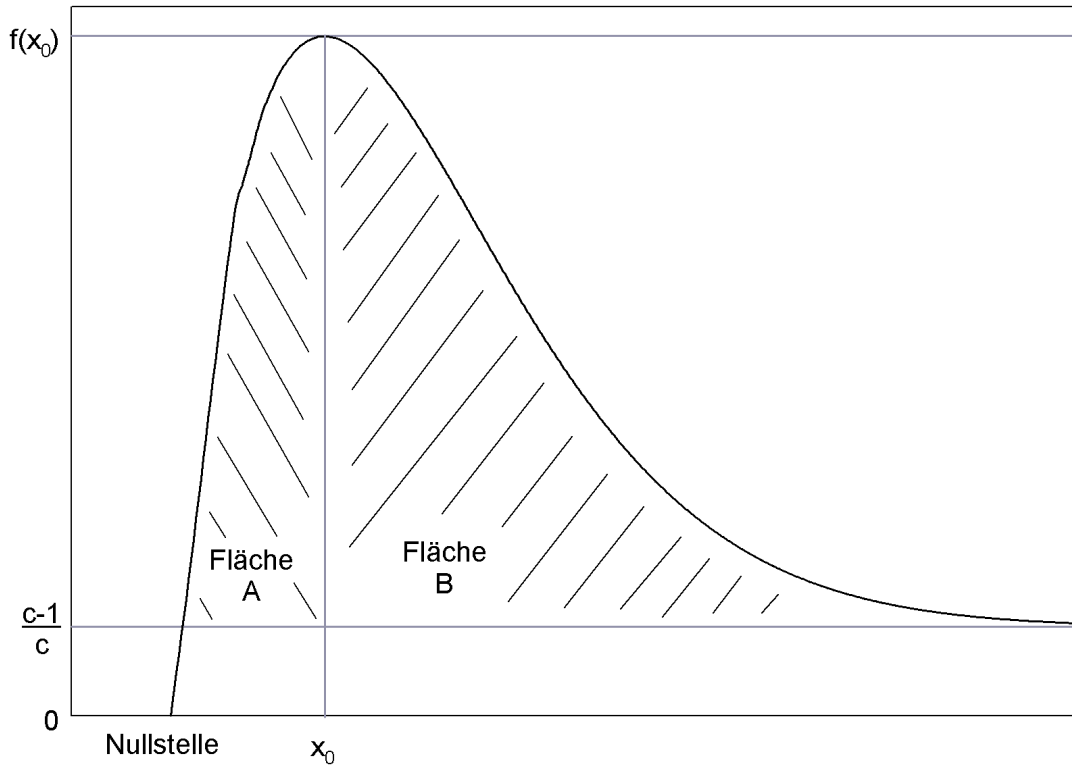


Abbildung 11: Weibullfunktion für den Symmetriefaktor $c=1,5$. Das Maximum $f(x_0)$ wird durch a und c definiert, die Weite ist abhängig von b und c . Die Form des Peaks und auch das Verhältnis der Flächen A und B zueinander ist ausschließlich von c abhängig.

3.2.2. Der Parameter a und sein Einfluß auf den Maximalwert

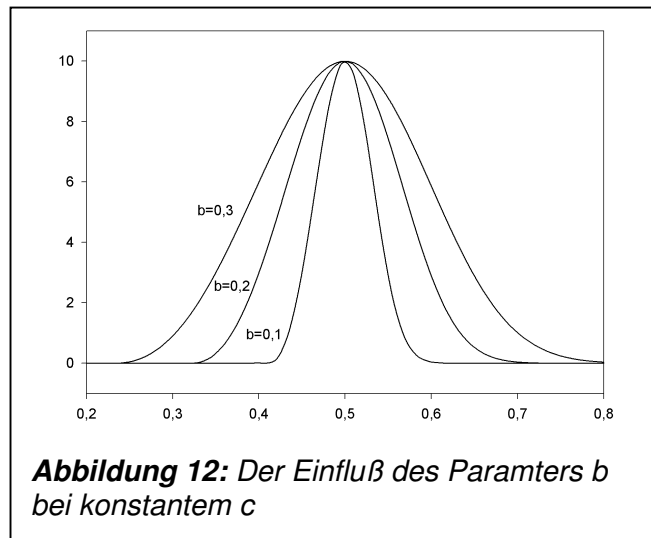
Die Streckung der Abszisse durch a ist abhängig von c . Für das Maximum des

Peaks gilt: $f(x_0) = ae^{-\frac{c-1}{c}} + \frac{c-1}{c}$. Daher gilt für $c \rightarrow 1 \Rightarrow f(x_0) \rightarrow a$ und für

$c \rightarrow \infty \Rightarrow f(x_0) \rightarrow \frac{a}{e} + 1$, so daß der Maximalwert höchstens den Wert a annehmen kann.

3.2.3. Der Parameter b und sein Einfluß auf die Weite

Durch den Parameter b wird die Weite beeinflusst. In *Abb. 12* ist demonstriert, wie sich verschiedene Werte von b bei konstantem a (10), x_0 (0,5) und c (3,25) auswirken.



Die Nullstelle $f(x)=0$ ist definiert

$$\text{durch: } x_0 - b\left(c - \frac{1}{c}\right)^{\frac{1}{c}}.$$

Daraus folgt, daß durch b der

Peak in der Ebene der Ordinate gestreckt wird, diese Streckung aber wiederum durch c folgendermaßen beeinflusst wird:

Für $c \rightarrow 1$ gilt: $\left(c - \frac{1}{c}\right)^{\frac{1}{c}} \rightarrow 0$, d.h. die Nullstelle strebt gegen x_0 .

Für $c \rightarrow \infty$ gilt: $\left(c - \frac{1}{c}\right)^{\frac{1}{c}} \rightarrow 1$, wodurch sich die Nullstelle maximal $x_0 - b$ von x_0 entfernen kann.

3.2.4. Der Parameter c und seine Bedeutung für die Symmetrie

Der Parameter c beeinflusst nicht nur das Maximum und die Weite des Peaks, er ist auch alleine für die Symmetrie verantwortlich. Der Einfluß von c auf die Weibullfunktion bei konstantem a (1), x_0 (0,5) und b (0,2) ist in *Abb. 13* dargestellt. c ist außerdem ein direktes Maß für das Verhältnis der Flächen A und B aus *Abb. 11* zueinander. Dies begründet sich folgendermaßen:

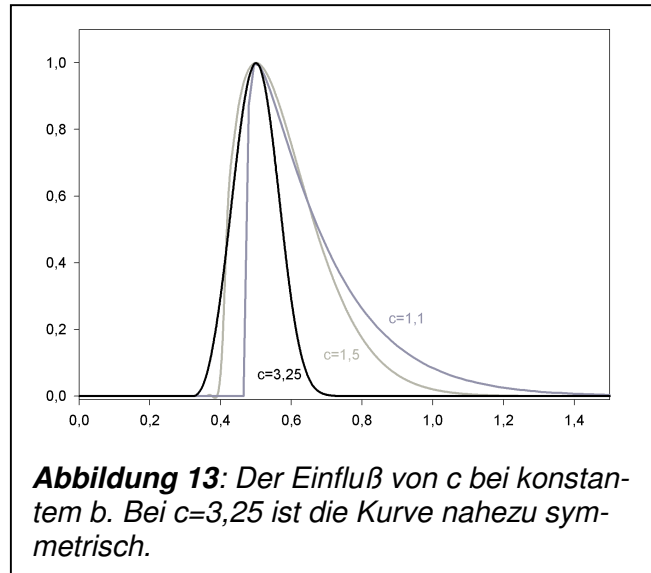
Nach dem Erreichen des Maximums strebt y gegen $(c-1)/c$ und erreicht nicht 0. Daraus folgt, daß die gesamte Fläche unter der Kurve unendlich groß ist. Zieht man jedoch von dieser Fläche die Fläche von $y=0$ bis $y=(c-1)/c$ ab, wird sie endlich.

Diese Fläche wird mit der Formel $Fläche_{Gesamt} = \frac{ab}{c} \left(\frac{c-1}{c}\right)^{\frac{1-c}{c}}$ erfaßt. Die Gesamtfläche kann mittels des Lotes, das bei x_0 gefällt wird, in zwei Teile geteilt werden. Dabei ist A die Fläche vor Erreichen des Maximums. Nach Integration

der Verteilungsfunktion von $x_0 - b[(c-1)/c]^{1/c}$ bis x_0 und von x_0 bis ∞ ergeben sich die beiden Teilflächen A und B durch folgende Formeln:

$$A = \frac{ab}{c} \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left(1 - e^{-\frac{c-1}{c}} \right) \quad \text{und}$$

$$B = \frac{ab}{c} \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} e^{-\frac{c-1}{c}}$$



Ein einfaches Maß zur Beschreibung der Symmetrie ist nun das Verhältnis $s=A/B$ der Teilflächen zueinander: $s < 1$ beschreibt ein Tailing, $s = 1$ einen symmetrischen Peak und $s > 1$ ein Fronting. Die Division der Formeln für die Teilflächen A und B um den Quotienten s zu erhalten, führt zu folgendem Ergebnis:

$$s = \frac{A}{B} = \frac{\frac{ab}{c} \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} \left(1 - e^{-\frac{c-1}{c}} \right)}{\frac{ab}{c} \left(\frac{c-1}{c} \right)^{\frac{1-c}{c}} e^{-\frac{c-1}{c}}} = \left(\frac{1 - e^{-\frac{c-1}{c}}}{e^{-\frac{c-1}{c}}} \right) = \left(\frac{1}{e^{-\frac{c-1}{c}}} - \frac{e^{-\frac{c-1}{c}}}{e^{-\frac{c-1}{c}}} \right) = \left(\frac{1}{e^{-\frac{c-1}{c}}} - 1 \right) = e^{\frac{c-1}{c}} - 1$$

Die Symmetrie des Peaks ist also ausschließlich abhängig von c . Für $s = 1$ ergibt sich $c = \frac{1}{1 - \ln 2} \approx 3,2589$. Ein c im Bereich von 1 bis 3,2589 ergibt ein $s < 1$ und somit ein Tailing, ein c ab 3,2589 ergibt ein $s > 1$ und damit ein Fronting.

In der Anwendung auf die GEC bedeutet dies, daß jeder Peak mit drei Parametern ausreichend beschrieben werden kann. Der Parameter x_0 entspricht dem K_{av} , der Parameter c beschreibt die Symmetrie und b die Weite. Als Sonderform der Weibullverteilung für $b \rightarrow \infty \wedge c = \frac{1}{1 - \ln 2}$ ergibt sich eine Normalverteilung.

Diese Weibull-Funktion kann also auch die bisher willkürlich gesetzten Definitionen und nur halbquantitativ zu bestimmenden Parameter des Maximums, der Symmetrie und der Weite („theoretische Bodenhöhe“) einer Chromatographie jeglicher Genese ganz allgemein ersetzen.

3.3. Bestimmung des K_{av} von Eichpartikeln

3.3.1. Bestimmung der Säulenparameter V_0 und V_t :

Die beiden charakterisierenden Parameter (V_0 und V_t) zur Vergleichbarkeit von verschiedenen Säulen wurden für jede Säule neu ermittelt. Zur Bestimmung von V_0 diente das HBV, das zum Teil in nativen Serum Aggregate mit Apolipoproteinen und Antikörper bildet und damit eine Größe besitzen, die die maximale Trennfähigkeit der Säule überschreiten. Das erste HBV-Signal aus Serum ist bei Analyse mittels LC-PCR also bei V_0 zu erwarten. Dieses Signal geht einher mit einem Peak der Extinktion bei 280 nm, der auf partikuläre Lipoproteine zurückgeht, die sich damit auch im Ausschlußvolumen finden (Chylomikronen >200 nm und Präbeta-Lipoproteine bis 200 nm).

Zur Bestimmung von V_t diente Aceton, das zum einen aufgrund seiner kleinen Molekülgröße den gesamten Diffusionsraum zur Verteilung nutzt (vgl. Definition von V_t), nicht an der Matrix adsorbiert und durch kontinuierliche Messung der Extinktion bei 280 nm im Durchflußphotometer einfach bestimmt werden kann. Zusätzlich wurde errechnet, daß die Matrix bei einer Gelbettlänge von 76 cm für Aceton die Trenneigenschaft von 372 theoretischen Böden besitzt, was einer Theoretischen Bodenhöhe von 0,2 cm entspricht.

3.3.2. Immunglobuline

Zur Bestimmung der K_{av} Werte von IgM und IgG wurde 1 mL des Serum G verwendet. Als Laufmittel diente PBS, Fließgeschwindigkeit 3,23 mL/h, Fraktionsgröße 1,23 mL. Nach Weibull-Analyse ergaben sich: $K_{av}(\text{IgM}) = 0,595$; $K_{av}(\text{IgG}) = 0,844$ (s. Abb. 14)

Beide Analysen zeigen eine weitgehend symmetrische Verteilung; IgG erscheint insgesamt schmaler (IgG: $b=0,115$; IgM $b=0,258$ bei ähnlichem s) was für eine heterogenere Verteilung des IgM spricht. Da die Ig-Moleküle keine Kugelgestalt besitzen, entspricht das K_{av} einer korrespondierenden scheinbaren Kugel mit entsprechendem Stokes-Durchmesser D_s .

Für diese scheinbare Kugelgestalt wird aufgrund früherer Messung des D_s von Immunglobulinen mittels GEC eine zu erwartende Größe von 21,2 nm für IgM (Gerlich, 1971) und 10,5 nm für IgG (Andrews, 1970) angenommen.

Der Peak des IgG fällt mit dem Peak der Serumproteine – gemessen durch optische Dichte – zusammen. Das Serumalbumin mit ca. 7 nm ist zwar in noch größeren Mengen vorhanden, jedoch ist seine UV-Absorption bei 280 nm wesentlich geringer.

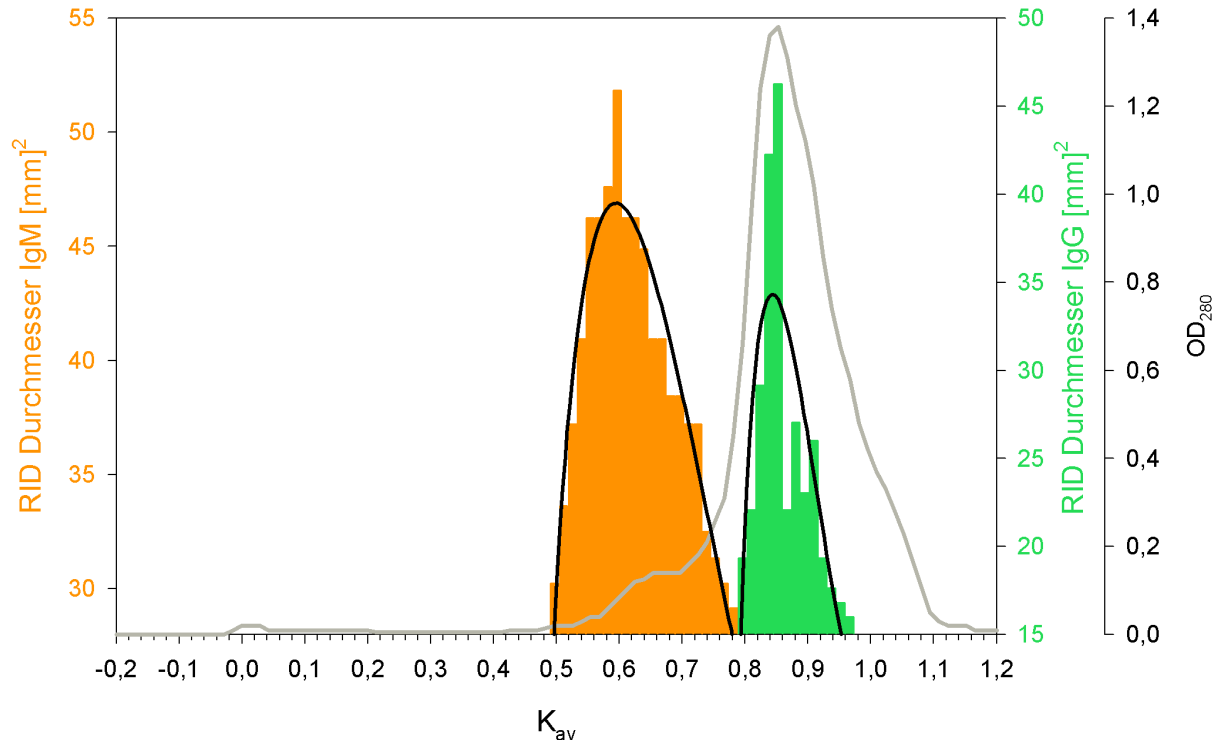


Abbildung 14: Nachweis von Immunglobulinen in der GEC mittels radialer Immundiffusion (RID). ■ IgM ■ IgG — Weibull-Regressionen — Optische Dichte

3.3.3. Parvovirus B19

Das Parvovirus B19 gehört zum Genus Erythrovirus aus der Familie der Parvoviridae (Berns et al., 2000). Es ist ein unbehülltes, einzelsträngiges DNA-Virus, das vorwiegend durch Schmier- und Tröpfcheninfektion übertragen wird und das Krankheitsbild der Ringelröteln und der akuten erythroblastischen Anämie verursacht. Das Virus hat wegen seiner Kleinheit und seiner hohen Resistenz eine gewisse Bedeutung bei der Überprüfung von Desinfektions- und Filtrationsverfahren in der Virologie und wird gerne als Testvirus für diese Verfahren verwendet (Omar et al., 2002, Santagostino et al., 1997).

Die Größe von Parvovirus B19 wird nach CryoEM Darstellung mit 26 nm angegeben (Chipman et al., 1996). Zur Bestimmung der Größe in der GEC wurde Serum verwendet, daß von einem Patienten mit einer akuten, hochtitrigen B19-Erstinfektion stammt. Das Serum (10^{10} ge/mL) wurde auf eine Konzentration von 5×10^9 ge/mL in TNE-Puffer eingestellt; hiervon wurde zur GEC 1 mL mit

TNE als Laufpuffer über die Säule geführt (Fließgeschwindigkeit: 4,82 mL/h; Fraktionsgröße: 1,36 mL). Das K_{av} des freien B19 Virions wurde durch eine nachfolgende Weibull-Analyse zu 0,492 bestimmt (Abb. 15).

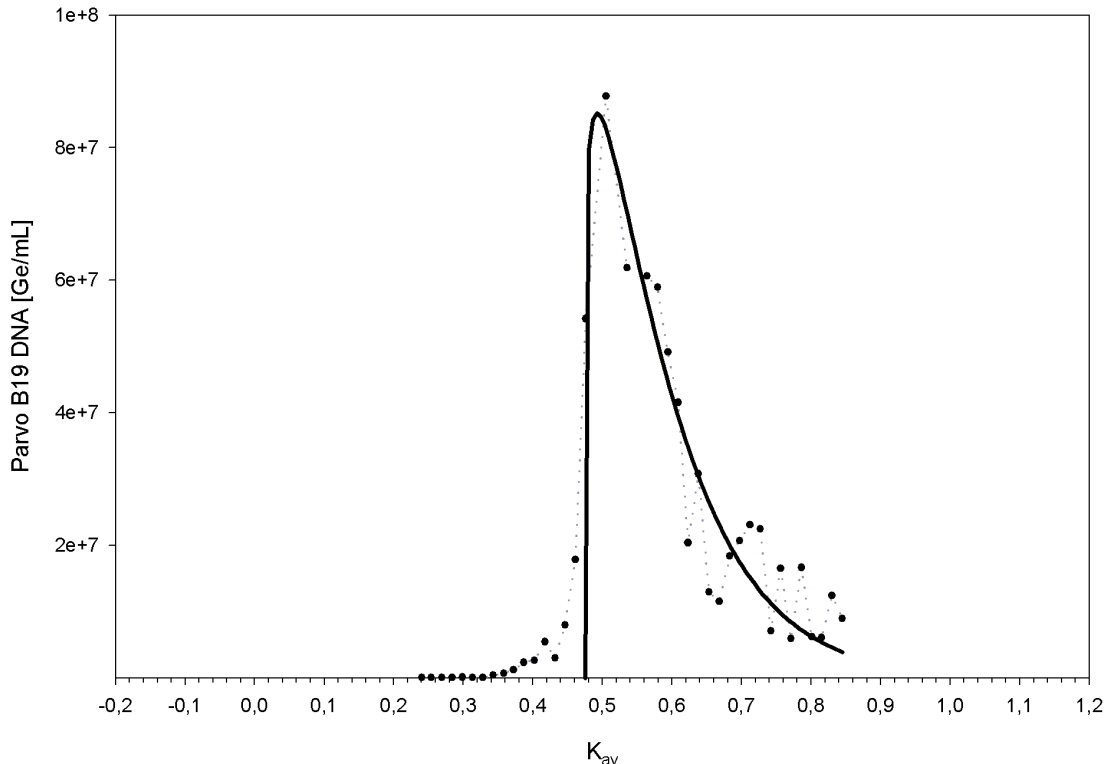


Abbildung 15: GEC von Parvovirus B19 aus anti-B19-freiem Serum; Quantifizierung mittels Real-time PCR: **•••** DNA Signal — Weibull-Regression

3.3.4. Poliovirus (Impfstamm Sabin 1)

Das Poliovirus ist ein unbehülltes, einzelsträngiges RNA Virus mit Plusstrang-orientierung aus dem Genus der Enteroviren, welches zur Familie der Picornaviridae gehört (King et al., 2000). Picornaviren besitzen ein ikosaedrisches Capsid. Das Poliovirus wird, wie viele andere Enteroviren auch, fäkal-oral übertragen und hatte wesentliche virologische Bedeutung als Erreger der Poliomyelitis. Mit der Entwicklung von Impfstoffen – zunächst Totimpfstoffen (Salk) später attenuierte Viren (Sabin I & II) und nun wieder Totimpfstoff– ließ die Inzidenz von Polioerkrankungen nach, so daß das Wildvirus heute nahezu ausgerottet ist.

Die Größe des Poliovirus wurde laut Literatur mittels Röntgenstrukturanalyse auf 31 nm bestimmt (Hogle et al., 1985); diese Größe hat sich in etwa in der CryoEM-Darstellung mit 30,5 nm bestätigt (Baker et al., 1999).

Aufgrund der für die GEC notwendigen Viruskonzentration und unter dem Aspekt der Infektionsgefährdung, wurde zur Größenbestimmungen ein Polio-Impfstamm (Typ Sabin 1) verwendet, der in Vero-Zellen propagiert wurde. Die Konzentration der infektiösen Polioviren aus Zellkulturüberstand wurde mit einer $TCID_{50}$ von $6,9 \times 10^9$ angegeben (Paul-Ehrlich-Institut, Langen). Mittels real-time RT-PCR schätzten wir die Polio-RNA Konzentration mit 10^{11} GEq/mL ab. Hiervon wurden 300 μ L in 700 μ L PBS verdünnt und als Probe aufgetragen. (Laufpuffer PBS; Fraktionsgröße 1,23 mL; Fließgeschwindigkeit 4,61 mL/h). Die GEC ergab nach Weibull-Analyse für Poliovirus Sabin 1 ein K_{av} von 0,465 (Abb. 16). Der im Vergleich zu Patientenserum abweichende Proteinpeak des Chromatogramms ist auf das Kulturmedium zurückzuführen, das einen geringen Anteil (10%) von fötalem Kälberserum (FKS) enthielt.

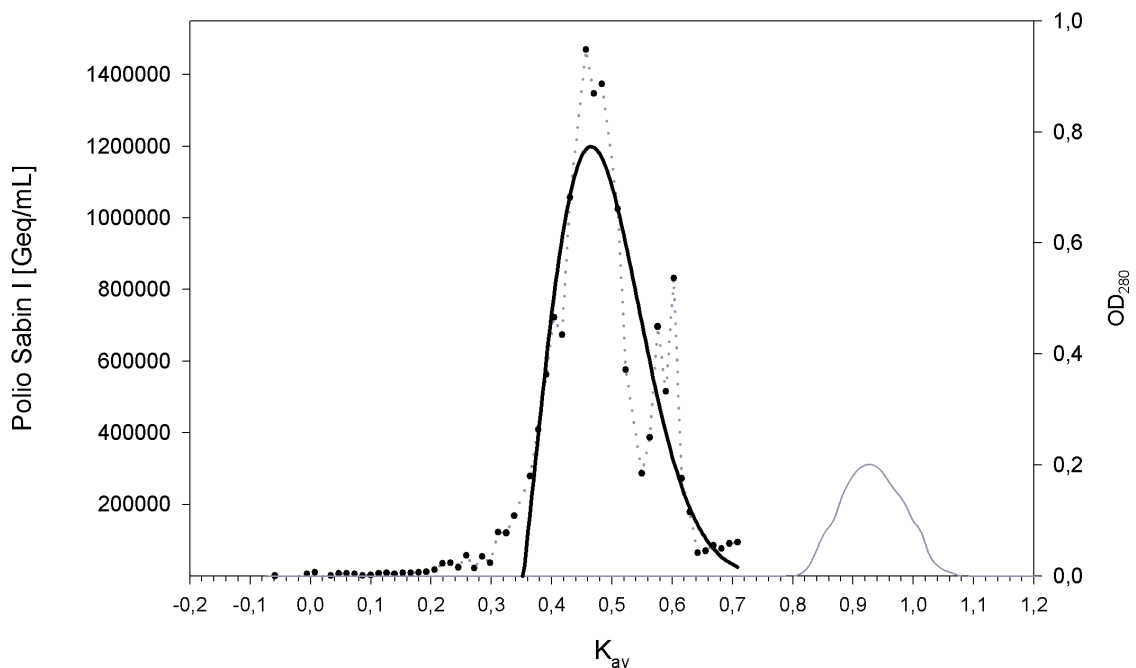


Abbildung 16: Chromatogramm von Poliovirus Sabin 1 in der GEC; Nachweis mittels Real-time PCR. **...** RNA Signal **—** Weibull-Regression **—** Optische Dichte

3.3.5. Simian Virus 40

Das Simian Virus 40 (SV40) ist ein unbehülltes Virus, dessen Genom in einer doppelsträngigen zirkulären DNA organisiert ist. Das Genus umfaßt „SV40 und ähnliche Viren“ und gehört zur Familie der Polyomaviren (Frisque et al., 2000). Es ist normalerweise nicht humanpathogen, es gibt jedoch Hinweise, daß es eventuell beim Menschen in Lymphomen und im Urin von immunsupprimierten

Transplantatempfängern gefunden werden kann; ein pathognomonischer Zusammenhang ist zur Zeit ungeklärt (Li et al., 2002, Shivapurkar et al., 2002). Die Größe von SV40 ist mit cryoEM Aufnahmen (Baker et al., 1999), bzw. Röntgenstrukturanalyse (Liddington et al., 1991) in der Literatur mit 50,0 nm angegeben worden.

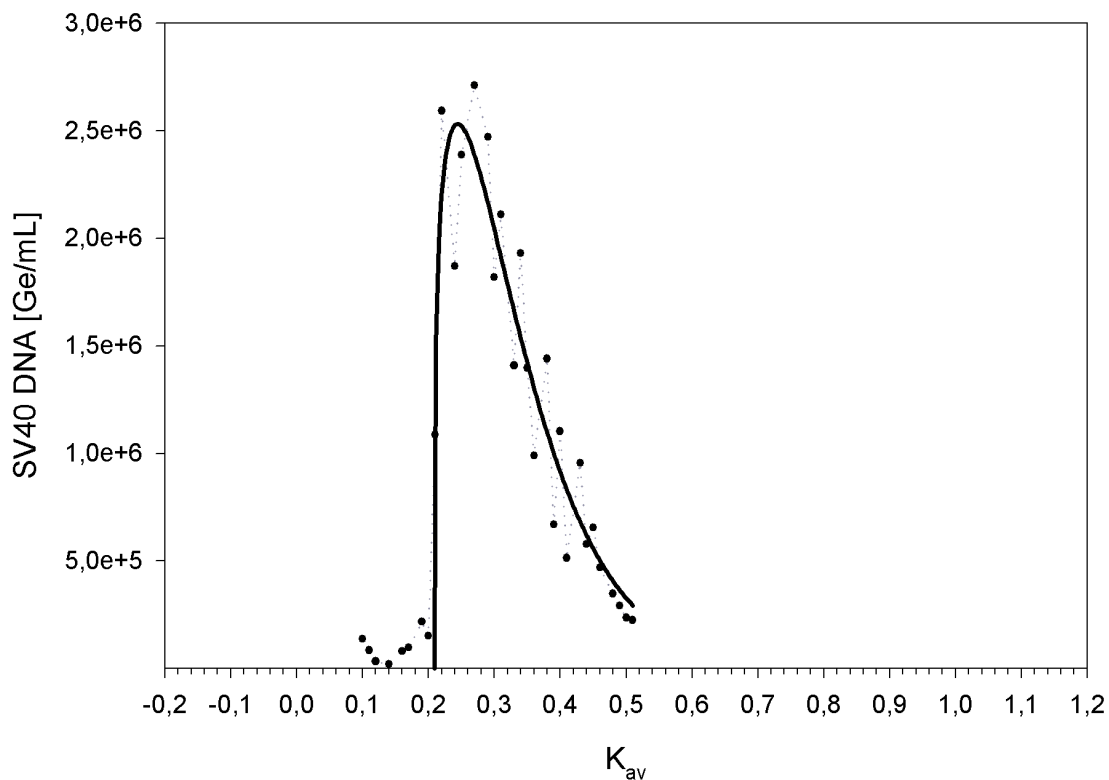


Abbildung 17: Chromatogramm von Simian Virus 40 in der GEC; Nachweis mittels Real-time PCR. ... DNA Signal — Weibull-Regression

Der K_{av} -Wert wurde mit 0,244 bestimmt (Abb. 17). Versuchsbedingungen: 150 μ L Zellkulturüberstand mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{10}$ GE/mL in 750 μ L PBS, Laufmittel PBS, Fraktionsgröße 1,17 mL, Fließgeschwindigkeit 3,63 mL/h.

Bei einem weiteren Lauf wurde als Laufmittel TNE verwendet, um bessere Voraussetzungen für eine EM-Darstellung zu haben. Beim Nachweis mittels rt-PCR waren die Signale jedoch an der Grenze der Testsensitivität von 100 ge/mL, was einen dramatischen Signalverlust von 6 log-Stufen bedeuten würde.

Der Signalverlust war auch nach wiederholten Läufen nicht mit einer Absorption an der Matrix zu erklären – eine hohe Instabilität des Virions selbst mußte die Ursache sein. Wegen der sehr viel höheren Signale in PBS stand im Raum, daß die Anwesenheit von EDTA im Laufpuffer TNE die für die Capsidstabilität des SV40 möglicherweise notwendigen Ca^{2+} -Ionen reduziert, was zum Zerfall

der Partikel führen könnte. Ähnliche Erfahrungen machte Brady, der feststellte, daß bei der Aufarbeitung von Polyomaviren für die EM mit EGTA die Viren dissoziierten (Brady et al., 1977). Eine Aufreinigung von SV40 in TNE scheint also nicht möglich zu sein.

3.3.6. Semliki Forest Virus

Das Semliki Forest Virus ist ein behülltes RNA-Virus mit einem einzelsträngigen Genom in Plusstrangorientierung. Es gehört zum Genus der Alphaviren aus der Familie Togaviridae (Weaver et al., 2000). Das Virus ist für den Menschen weitgehend apathogen, kann bei Übertragung durch Arthropoden jedoch eine Encephalitis verursachen. Es ist in Afrika und Asien endemisch. Die Größe wurde mittels CryoEM mit 70,0 nm bestimmt (Baker et al., 1999).

Da SFV nicht in ausreichender Menge aus natürlichen Wirten zu isolieren ist, wurde für die GEC wiederum Zellkultur-Überstand verwendet, der mit einer $TCID_{50}$ von $>10^{10}$ /mL angegeben wurde (W. Wengler, Institut für Virologie). Laufmittel PBS, Fließgeschwindigkeit 3,21 mL/h, Fraktionsgröße 0,675 mL.

Bei der Analyse des GEC Laufes mit SFV wurde ein Peak ungefähr bei K_{av} 0,1 erwartet. Es stellten sich jedoch zwei klar unterscheidbare Viruspopulationen dar, was das hohe Auflösungsvermögen der GEC auch im oberen Meßbereich bestätigte. Die Viruspopulationen stellten sich bei einem K_{av} von 0,110 und 0,180 dar. Die beiden Populationen sind deutlich durch drei niedrigtitrige Fraktionen getrennt. (Abb. 18)

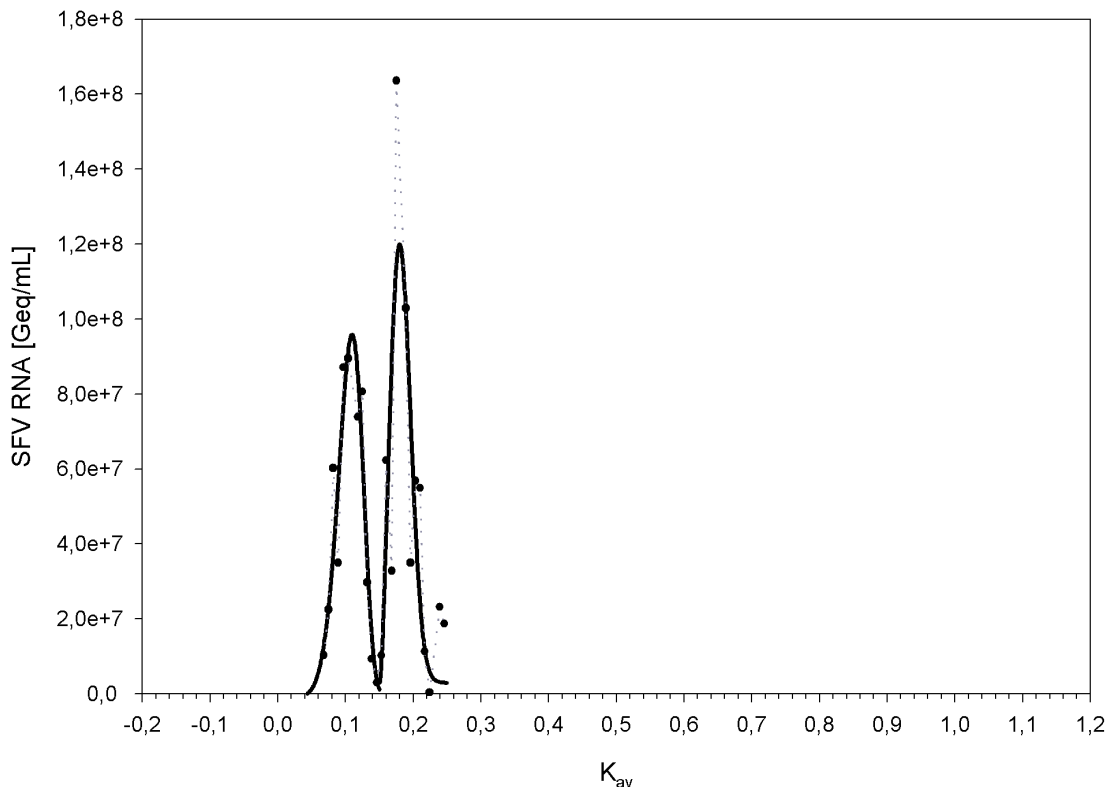


Abbildung 18: Chromatogramm von Semliki Forest Virus in der GEC; Nachweis mittels Real-time PCR: **•••** RNA Signal **—** Weibull-Regression

Von SFV ist bekannt, daß es wie andere Alphaviren neben Viren mit einer intakten Morphologie noch defekte Partikel ausbildet. Diese defekten Partikel (defective interfering particles, DI) unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihrem kleineren Genom, das durch Spleißung aus mehreren Genabschnitten des ursprünglichen Virus zusammengesetzt ist. (Thomson et al., 1994), (White et al., 1998). Aus der elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Negativkontrast ist bekannt, daß defekte SFV Partikel 16% kleiner sind als intakte (Barret et al., 1984), was in Anwendung auf die Größe aus der CryoEM 59 nm entsprechen würde.

Eine Analyse der von uns verwendeten Primer und des damit amplifizierten Templates mit den Sequenzen der defekten Partikel (Alanen et al., 1987) ergab, daß die Primer auch zu den Sequenzen der defekten Partikeln passen.

Sequenzvergleiche mit Genomsequenzen von defekten SFV-Partikeln (Ref. Seq. acc. Nr. L27470 und L27529) und kompletten SFV Genomen (X04129, NC_003215, AY112987) bestätigen die Heterogenität in diesem Sequenzabschnitt. Es kann also aufgrund der Größe der Partikel davon ausgegangen werden kann, daß es sich hierbei um defekte Partikel handelt.

Unter diesem Aspekt sind auch die Ergebnisse von C. Jursch zu erklären, der zur Eichung seiner Gelmatrix SFV aus einer vergleichbaren Präparation durchführte: Während sich beim Nachweis der Infektiosität mittels Zellkultur ein schmaler Peak ergab, wurde der Peak beim halbquantitativen PCR-Nachweis sehr viel breiter (Jursch, 2000). Da nur intakte Partikel infektiös sind und sich die Jursch'schen Primer in der selben Region wie die unsrigen befanden, ist davon auszugehen, daß auch er mit der PCR defekte Partikel nachgewiesen hat, die im kulturellen Nachweis nicht zu finden sind.

3.3.7. Beurteilung der Elutions-Symmetrie

Aus den ermittelten Parametern nach erfolgter Weibull-Analyse können Symmetrie und Weite der Elutionskurven beschrieben werden. *Tabelle 2* gibt einen Überblick über die Skalare a , b und c sowie eine Angabe des aus c abgeleiteten Symmetrieparameters s (vgl. Abschnitt 3.2.3).

Alle Trennungen liegen in einem akzeptablen Bereich der Symmetrie, wobei Parvovirus B19 mit einem $s=0,115$ den größten Tailing-Effekt, jedoch eine geringe Weite mit $b=0,119$ aufweist. Der erste Peak bei Auftrennung der SFV-Partikel zeigt als einzige Population ein Fronting-Phänomen ($s>1$).

Partikel	$K_{av}(x_0)$	c	b	a	s
IgG	0,844	1,503	0,115	3,43 mm ²	0,397
IgM	0,595	1,485	0,258	4,69 mm ²	0,386
ParvoB19	0,492	1,122	0,119	$8,52 \cdot 10^7$ Ge	0,115
Polio	0,465	2,073	0,155	$1,20 \cdot 10^6$ Geq	0,678
SV40	0,244	1,245	0,129	$2,53 \cdot 10^6$ Ge	0,217
SFV DI	0,180	2,349	0,037	$1,17 \cdot 10^8$ Geq	0,776
SFV	0,110	5,720	0,096	$9,61 \cdot 10^7$ Geq	1,282

Tabelle 2: Vergleich der Weibull-Regressionsparameter der Eichpartikel und des daraus abgeleiteten Symmetriefaktors s .

3.3.8. Beurteilung der Kalibrierung

Nach Abschluß der K_{av} -Bestimmung der Partikel zur Kalibrierung, konnten diese nun auf ihre Linearität in Bezug zum Logarithmus des Stokes'schen Durchmessers D_s dargestellt werden. Hierzu wurden die durch vorhergehende Unter-

suchungen mittels GEC (IgG, IgM), Röntgenstrukturanalyse und CryoEM ermittelten Größen für die Eichpartikel halblogarithmisch gegen die ermittelten K_{av} -Werte aufgetragen und eine Regressionsfunktion errechnet (Abb. 19).

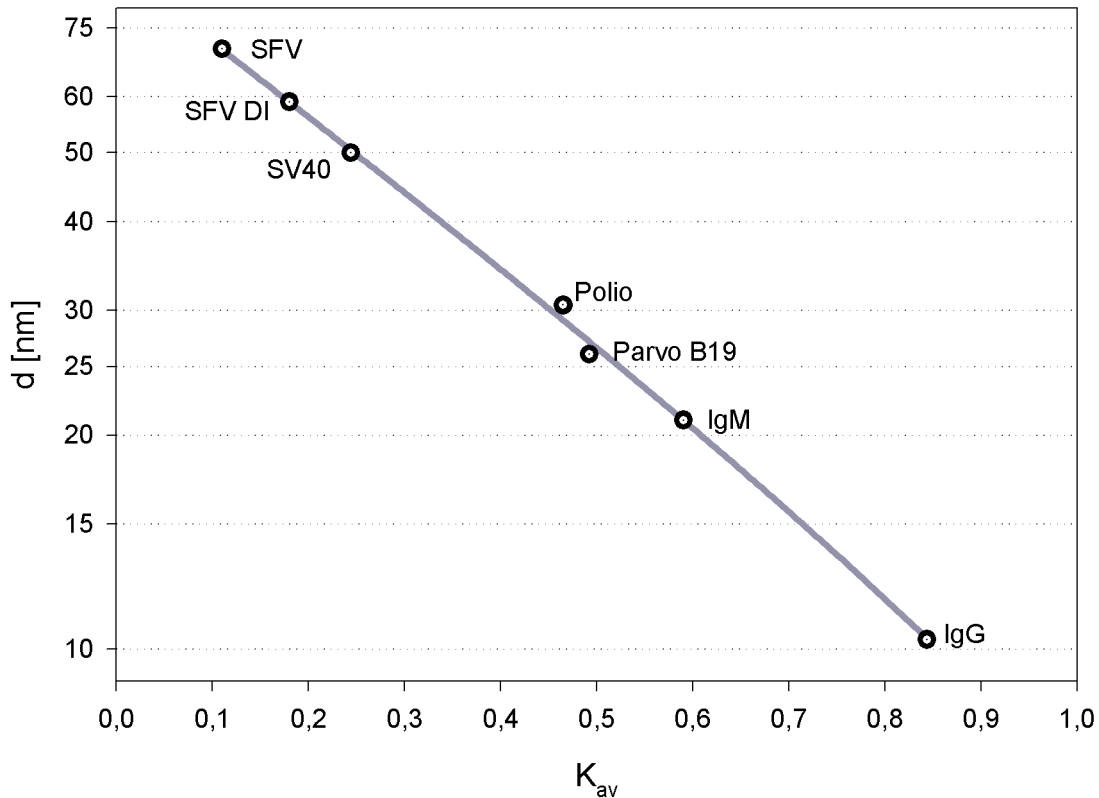


Abbildung 19: Die Durchmesser der Eichpartikel halblogarithmisch gegen das gemessene K_{av} aufgetragen. — Regressionsgerade, d: Durchmesser. DI: Defective interfering particles.

Die Regressionsfunktion kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$D_s [nm] = (-3,053) + 94,00e^{(-2,310K_{av})}$$

Der Regressionskoeffizient r^2 für die Kalibrierungsgerade beträgt 0,9988 und ist damit bemerkenswert genau. Die Kalibrierungspunkte und die Regressionsfunktion zeigen einen überraschend großen linearen Meßbereich des Durchmessers für K_{av} -Werte von 0,1 bis 0,84. Beim Vergleich der durch die GEC und anhand der Regressionsfunktion bestimmten Größe der Eichpartikel mit der erwarteten Größe sieht man, daß auch hier die Abweichungen relativ gering sind (Tab. 3). Die Kalibrierung ist also als erstaunlich genau anzusehen.

Partikel	K_{av}	D_s [nm] (erwartet)	D_s [nm] (gemessen)	Differenz [nm]	Differenz [%]
IgG	0,844	10,5	10,3	0,2	1,9
IgM	0,595	21,2	20,7	0,5	2,4
ParvoB19	0,492	26	27,2	1,2	4,6
Polio	0,465	30,5	29,1	1,4	4,6
SV40	0,244	50	50,3	0,3	0,6
SFV DI	0,18	58,8	59,0	0,2	0,3
SFV	0,11	70	69,9	0,1	0,1

Tabelle 3: Abweichung der mittels GEC bestimmten Durchmesser der Eichpartikel von ihrem erwarteten Durchmesser.

Bei den folgenden Versuchen wurde nun die ermittelte Regressionsfunktion zur Bestimmung des Stokes'schen Durchmessers für die Größenbestimmung unbekannter Partikel verwendet.

3.4. Verhalten von Hepatitis-C-Virus Partikeln in der GEC

Zur Beurteilung des Verhalten von HCV-Partikeln in der GEC wurden die sechs im Materialteil beschriebenen Seren A bis F untersucht. Die Bezeichnung erfolgte nach der Reihenfolge ihrer Analyse; für die Darstellung der Ergebnisse wurden sie jedoch nach ihren Gemeinsamkeiten neu geordnet. Gemessen wurden in den einzelnen Fraktionen die HCV-RNA Konzentration mittels rt-PCR, die HCV-Core Ag Konzentration mittels ELISA und die Extinktion bei 280 nm als Maß für die Gesamtproteinkonzentration. Da die Nachweisgrenze für den Core-ELISA nach Herstellerangaben bei 1,5 nm liegt, gelten Meßwerte unterhalb dieser Grenze als negativ. Die Maxima der einzelnen Peaks wurden mittels Weibull-Regression bestimmt. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden die Regressionskurven in eigenen Abbildungen dargestellt.

Charakteristisch für die Gesamtprotein-Konzentration (Extinktion 280 nm) in diesen Serumproben ist ein erster, kleiner Peak bei $K_{av} 0$ ($V_e = V_0$), der durch alle diejenigen Lipoproteinpartikel im Serum bedingt ist, die einen Stokes-Radius von > 80 nm besitzen. Ab einem K_{av} von ungefähr 0,25 zeigt sich eine langsam ansteigende Konzentration bis zu einem Plateau von 0,55 bis 0,7 und ein darauffolgender Peak bei 0,85, der ungefähr bei 1,1 wieder das Nullniveau erreicht. Dies entspricht dem klassischen Bild von Serumproteinen in der GEC.

3.4.1. Chronische HCV-Infektion

Bei Serum A eines asymptomatischen anti-HCV-positiven Blutspenders, der durch erhöhte Transaminasen auffiel, zeigen sich ein HCV-RNA Peak und ein Core Peak bei $K_{av} 0$. Beide Peaks sind scharf begrenzt. (Abb. 20)

Anders stellt sich das Bild bei Serum F – einem chronisch HCV infiziertem Patienten unter Immunsuppression bei Zustand nach NTX – dar: Scharfe, hohe RNA-Peaks bei $K_{av} 0$ und 0,32 sowie ein deutlich kleinerer und breitbasiger Peak bei 0,08 mit einem Tailing bis 0,25. Das Core bildet einen schmalen Peak bei $K_{av} 0$ aus. Im Gegensatz zur RNA sind die folgenden Peaks jedoch beide breitbasig: Der erste hat ein Maximum bei 0,1, der zweite bei 0,37, wobei die Core-Konzentration beim vorderen der beiden Peaks deutlich höher ist. Auffällig am Gesamtproteinpeak ist die Schulter bei 0,9 in der fallenden Flanke. (Abb. 21)

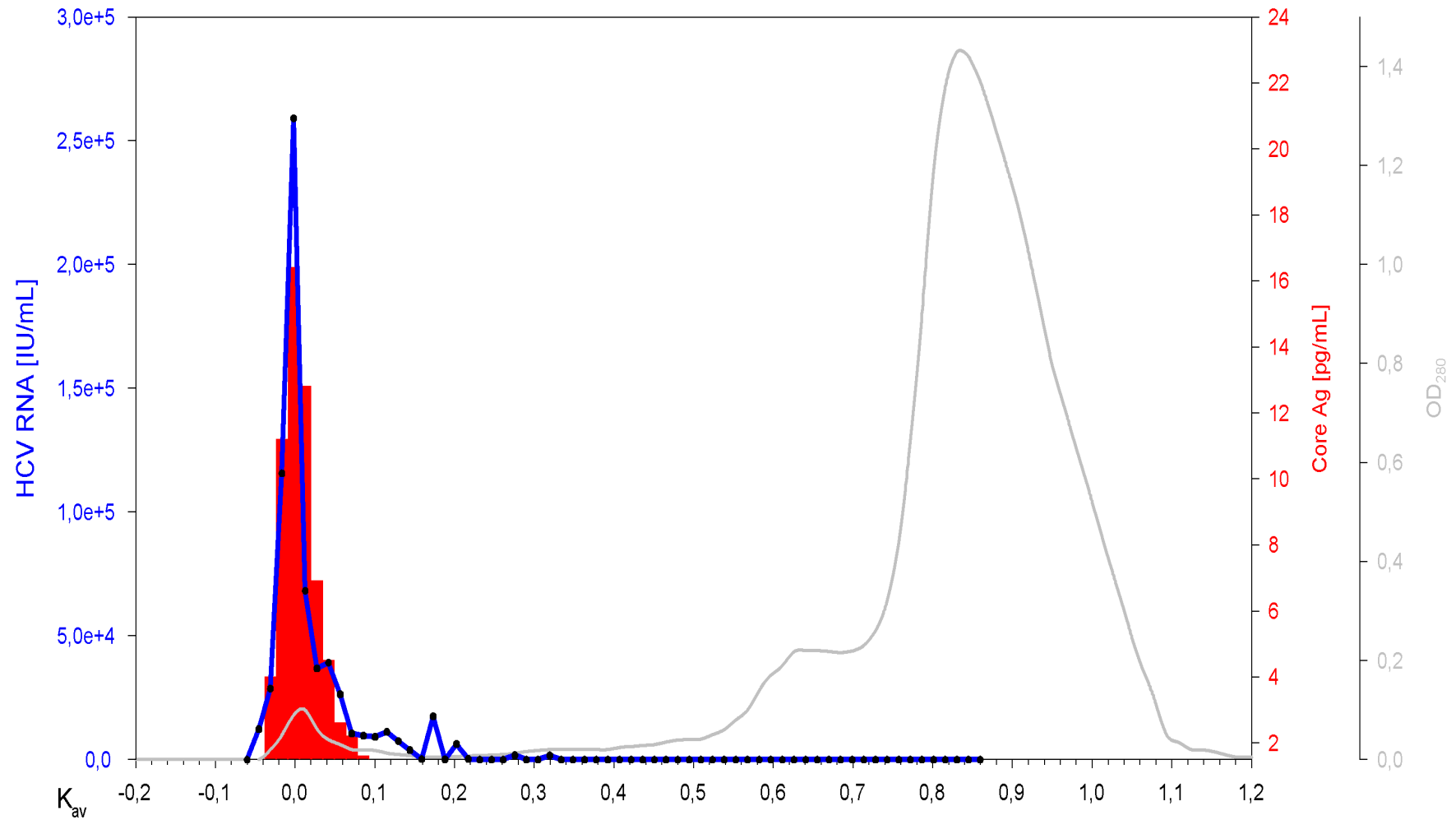


Abbildung 20: Nachweis von HCV – RNA und HCV-Core in der GEC mittels RT-PCR und ELISA

Serum A: Blutspender; chronische HCV-Infektion. Laufmittel PBS, Fraktionsgröße 1,28 mL, Fließgeschwindigkeit 3,4 mL/h

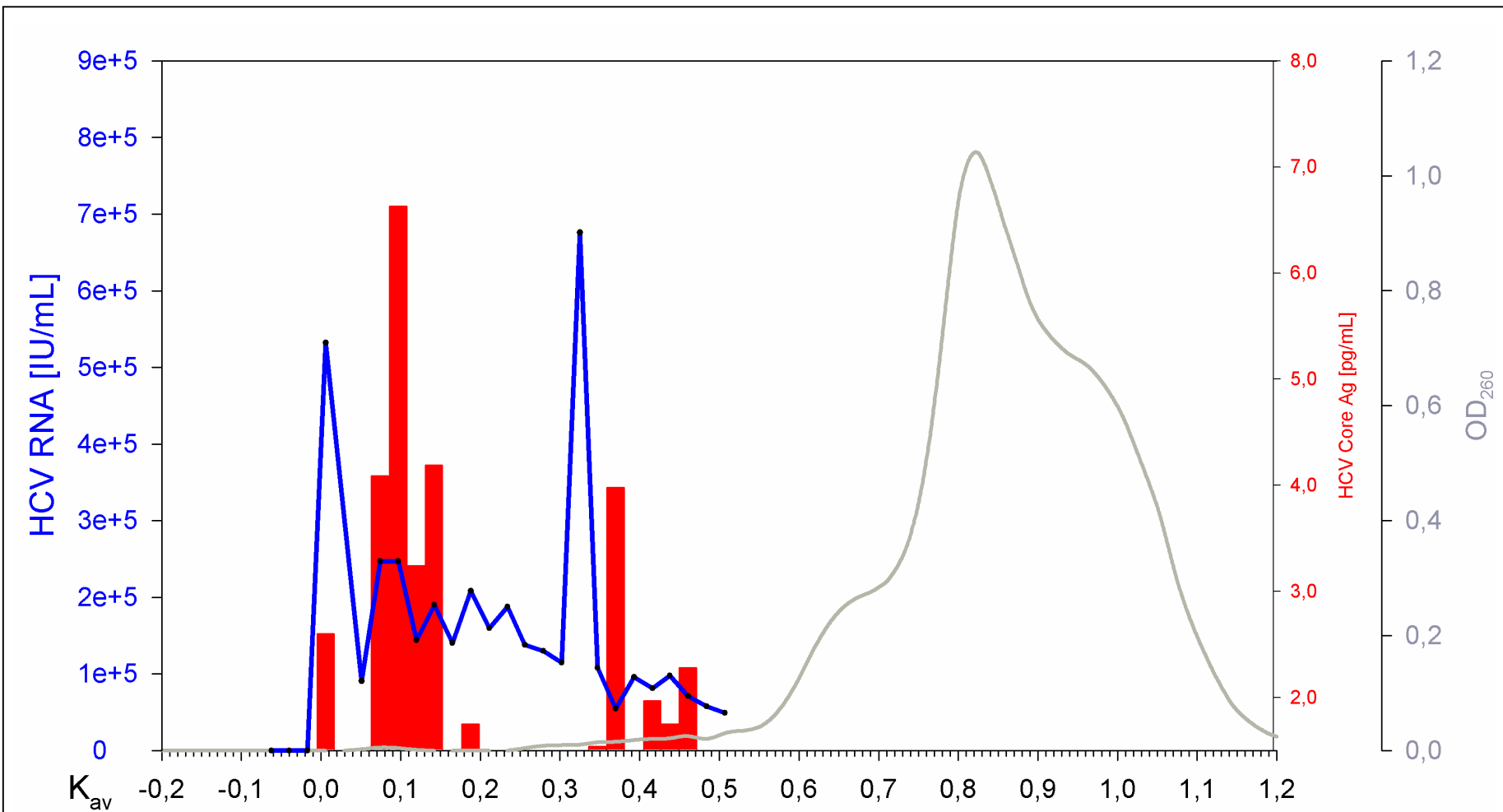


Abbildung 21: Nachweis von HCV – RNA und HCV-Core in der GEC mittels RT-PCR und ELISA

Serum F: Chronische HCV Infektion unter Immunsuppression bei Zustand nach Nierentransplantation

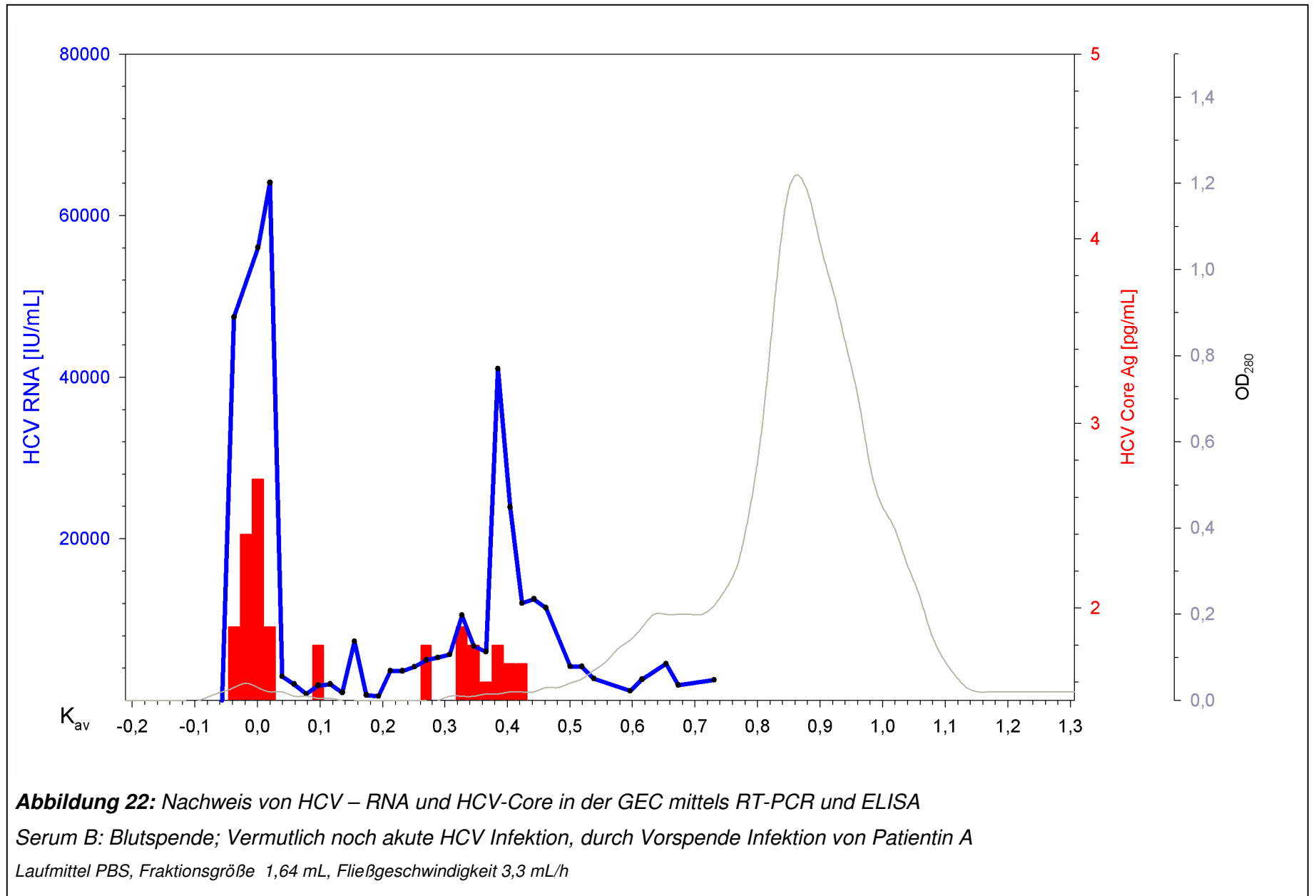
Laufmittel PBS, Fraktionsgröße 2,05 mL, Fließgeschwindigkeit 3,8 mL/h

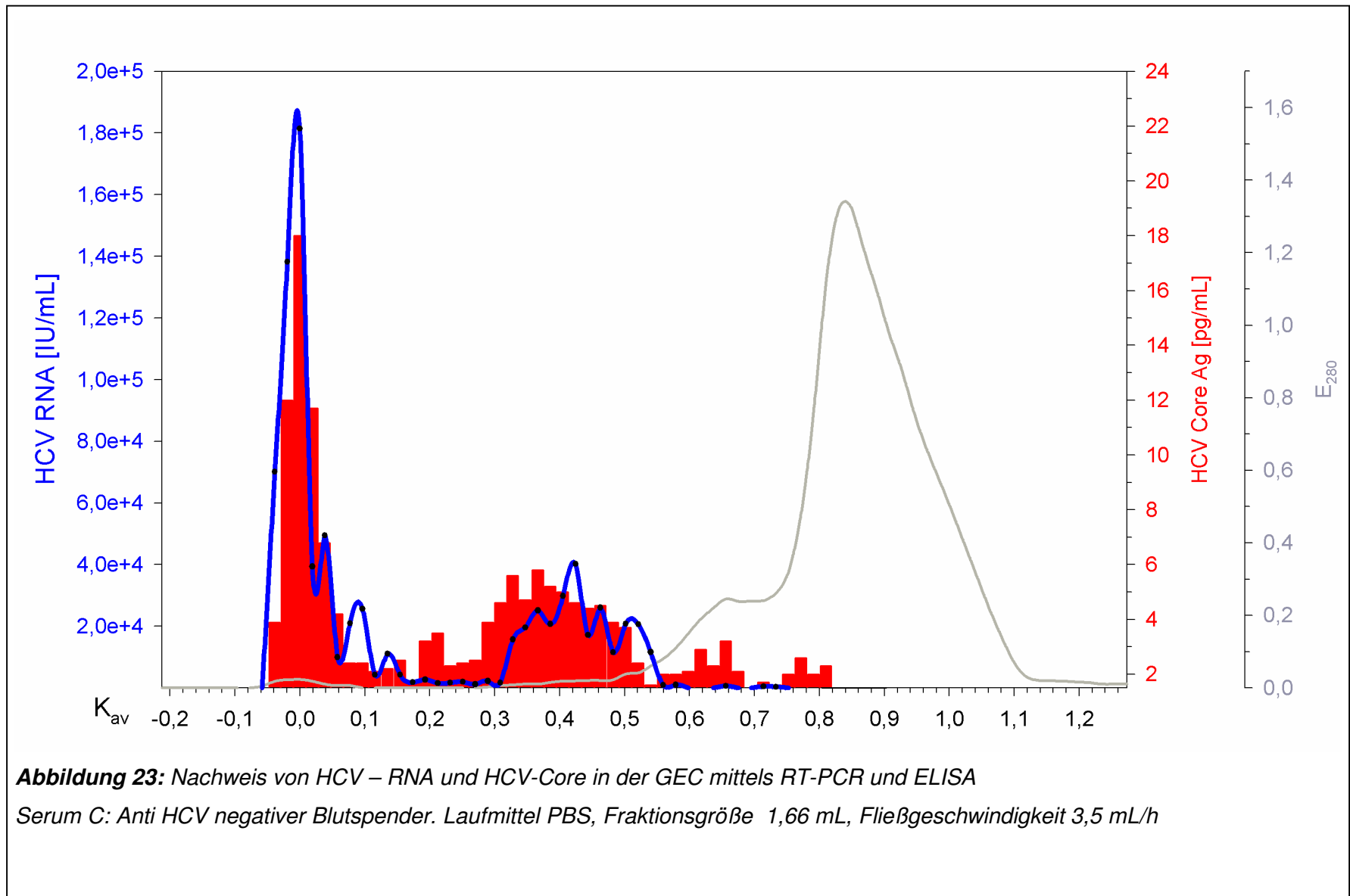
3.4.2. Frühe Infektionsphase

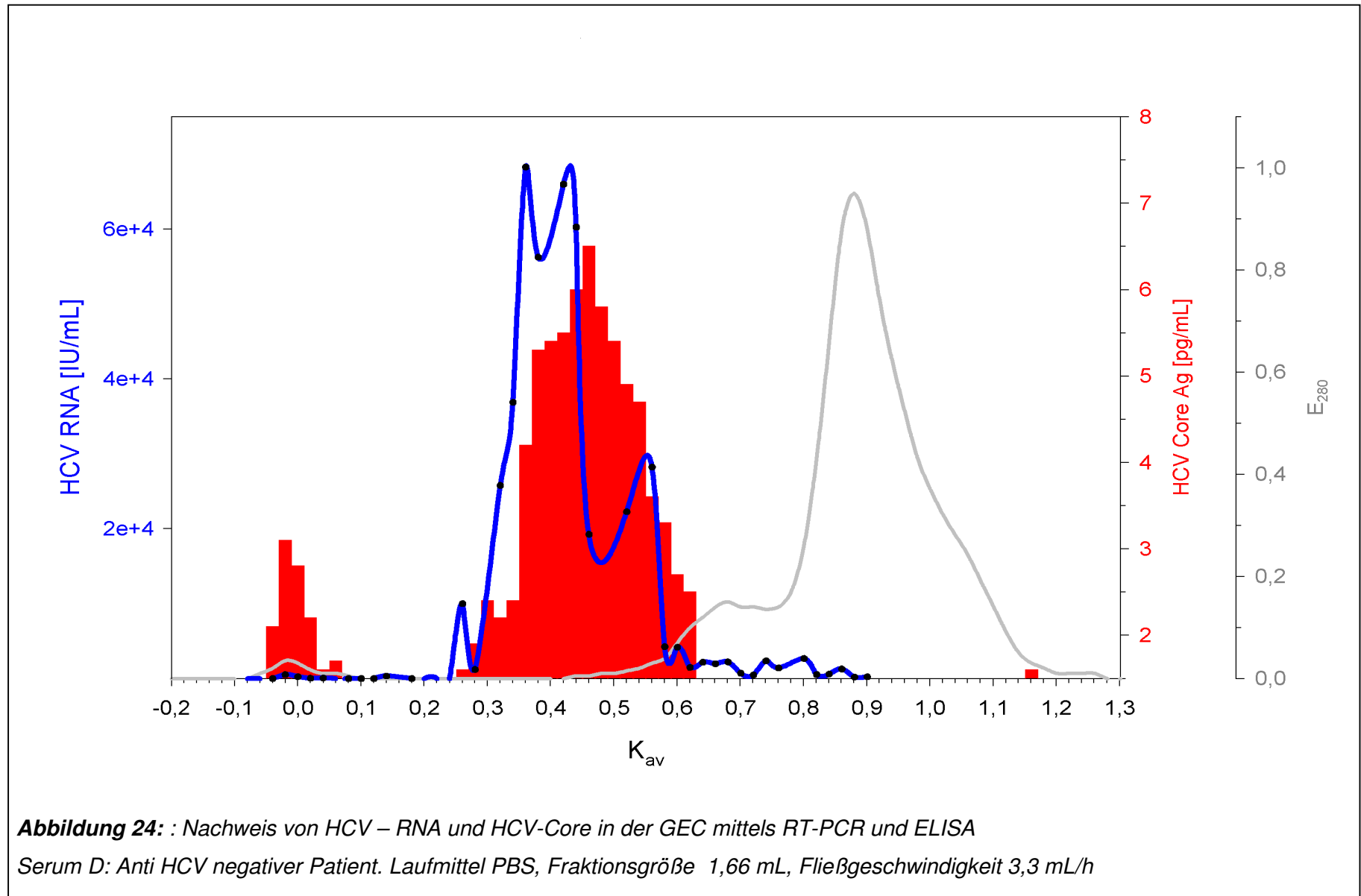
Es standen drei Seren zur Verfügung, die aus einer frühen Infektionsphase stammen. Bei Serum B ist im Vergleich zu den anderen Seren die Viruslast deutlich niedriger. Die Infektion muß jedoch mindestens zwei Monate zurückgelegen haben, da aus der Vorspende dieses Spenders ein HCV-RNA negatives Thrombozytenkonzentrat gewonnen wurde, daß zur Infektion einer immunsupprimierten Leukämie-Patientin (Serum E) führte. Es stellt sich ein scharfer RNA-Peak bei K_{av} 0,0 und ein zweiter Peak bei 0,38 dar. Das Tailing kann durch Meßschwankungen bei niedriger Viruskonzentration erklärt werden. Das Core-Protein bildet Peaks bei 0,0 und 0,36 aus. (Abb. 22)

Bei Serum C, einem Anti-HCV negativem Blutspender bilden sich bei der RNA-Messung zwei Peaks aus: Ein hoher, schmaler bei K_{av} 0,0 und ein niedriger, breitbasiger bei 0,4. Ähnlich stellt sich das Core-Signal dar: Ein hoher schmaler Peak bei K_{av} 0,0 und ein niedriger, breitbasiger bei 0,37. (Abb. 23)

Bei dem dritten Serum (Serum D, Anti-HCV negativer Patient) ist das Bild umgekehrt. Der Ausschlußpeak des Core bei K_{av} 0,0 ist zwar schmal, aber deutlich niedriger als der zweite Peak. Ein RNA-Peak ist nicht zu erkennen. Der zweite Peak ist bei beiden Signalen gewohnt breitbasig und hat bei der RNA-Messung sein mittels Weibull-Regression ermitteltes Maximum bei K_{av} 0,38 und bei der Core-Messung bei 0,44. (Abb. 24)







3.4.3. Akute Infektion unter Immunsuppression

Bei Serum E handelt es sich um eine Patientin, die unter vollständiger Immunsuppression mit HCV infiziert wurde. Bei der RNA-Messung ist zunächst ein niedriger, schmaler Peak bei K_{av} 0,0 nachweisbar, gefolgt von einem breiten, deutlich höherem Peak bei 0,38. Das Core-Protein bildet drei Peaks aus: Den ersten bei K_{av} 0,0, den zweiten – etwas schmaler, aber von der Konzentration ungefähr dem ersten entsprechend – bei 0,15 und einen dritten, breitbasigen und deutlich höheren Peak bei 0,41. Es folgt ein ausgeprägtes Tailing des Core-Antigens, das wiederum keinen vollständig parallelen Verlauf zur HCV-RNA zeigt.

Vergleichbar zum zweiten Serum unter Immunsuppression (Serum F) hat der Gesamtproteinpeak eine Schulter in der fallenden Flanke bei K_{av} 0,9 (Abb. 25).

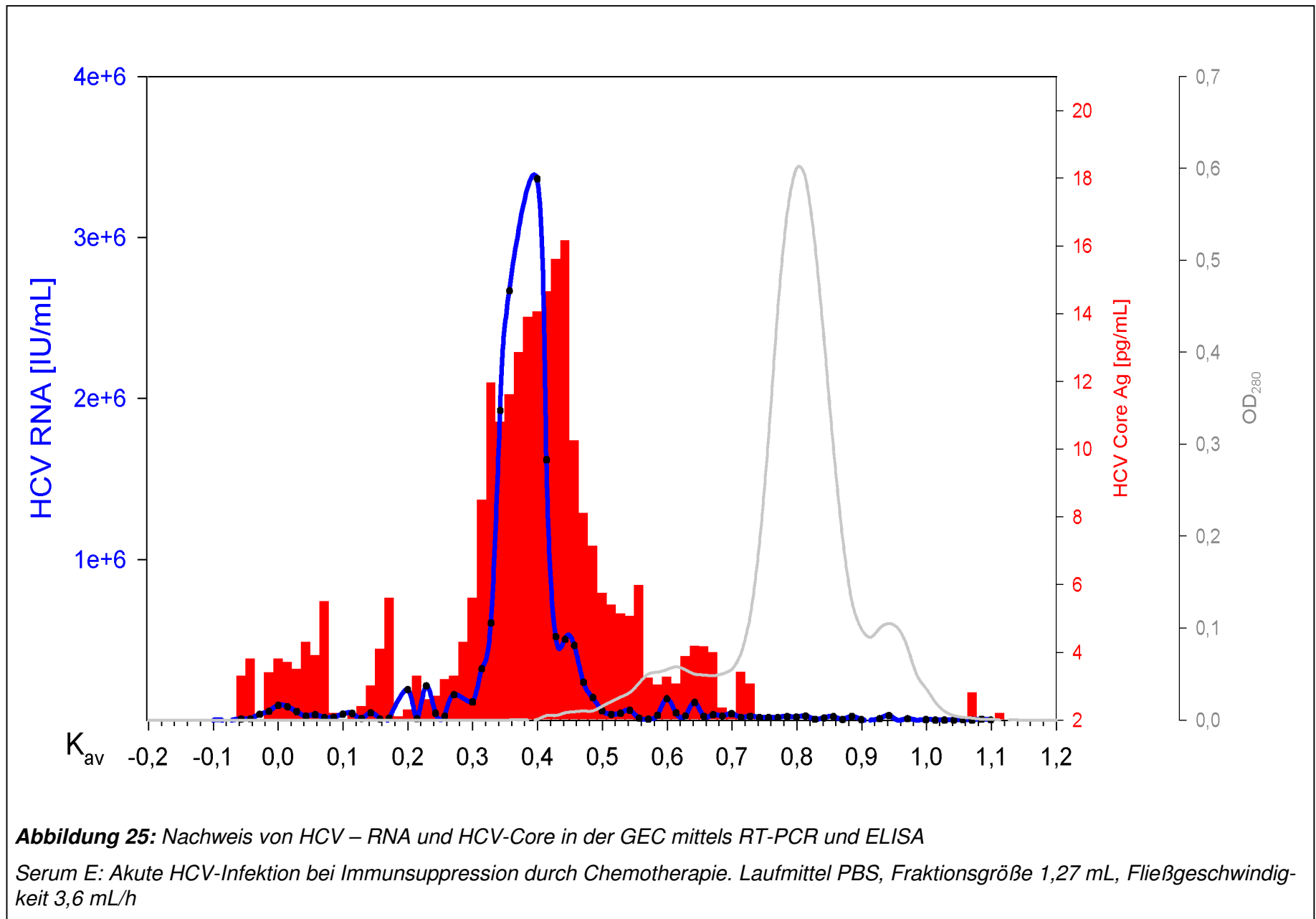


Abbildung 25: Nachweis von HCV – RNA und HCV-Core in der GEC mittels RT-PCR und ELISA

Serum E: Akute HCV-Infektion bei Immunsuppression durch Chemotherapie. Laufmittel PBS, Fraktionsgröße 1,27 mL, Fließgeschwindigkeit 3,6 mL/h

3.4.4. Stokes'scher Durchmesser freier HCV-Virionen

In den GEC-Läufen der HCV-Seren sind jeweils verschiedene Partikel-Populationen erkennbar, die getrennt einer Weibull-Analyse unterzogen wurden. Die dabei ermittelten Regressionskurven sind getrennt für die RNA (Abb. 26) und Core-Protein (Abb. 27) dargestellt, wobei jeweils die Population des Ausschlußvolumens ($K_{av}=0$) und die freien Virionen einer eigenen Analyse unterzogen wurden. Um trotz unterschiedlicher Konzentrationen die Kurven in einer Grafik vereinen zu können, wurde der Parameter a der größeren Population mit 1, die der kleineren Population als entsprechender Bruchteil der Größeren angegeben. Da aber nicht nur a , sondern auch c einen Einfluß auf den Maximalwert der Kurve hat, wird deshalb in einigen Fällen der Wert 1 von keiner der beiden Populationen erreicht. Deutlich zu erkennen ist, daß die Kurven, die nur aus wenigen Meßwerten gebildet werden, sehr spitz zulaufen und in einigen Fällen von einem extremen Tailing begleitet sind; das reale Elutionsprofil wird nur unzureichend abgebildet (RNA bei V_0 : D,E,F, Core bei V_0 : B,D). Dieses Phänomen ist besonders im Ausschlußvolumen zu beobachten, da dort die nicht mit der Matrix interagierenden Partikel relativ schnell an- und wieder abfluten und somit nur über einen kurzen Zeitraum nachweisbar sind.

Kritisch erscheint insgesamt die Verwendung der Regressionen der RNA des Serum F, da beide Peaks im Wesentlichen nur durch jeweils einen Wert gebildet werden. Der Vollständigkeit halber sind sie dennoch aufgeführt.

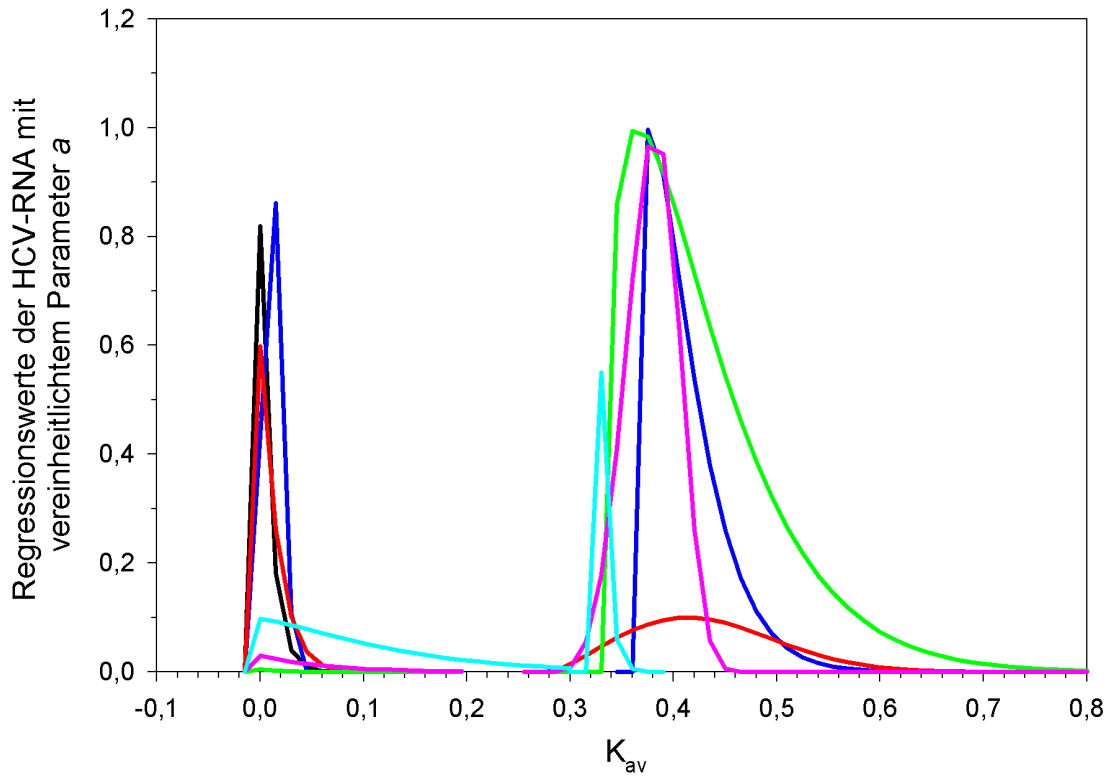


Abbildung 26: Weibullregressionen aller HCV-RNA-Messungen der Seren A-F

— A — B — C — D — E — F

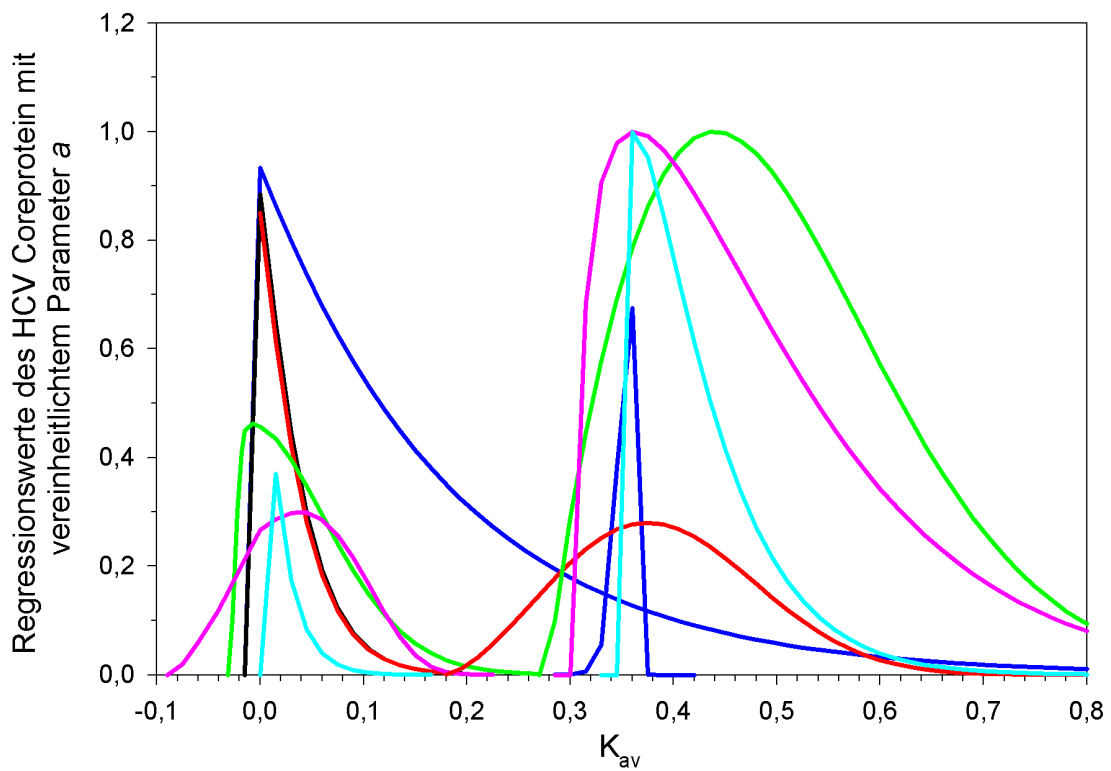


Abbildung 27: Weibullregressionen aller HCV-Coreprotein-Messungen der Seren A-F

— A — B — C — D — E — F

In *Tabelle 4* sind die ermittelten Verteilungsparameter aufgeführt, wiederum getrennt nach HCV-RNA und Core-Ag sowie nach Ausschlußpopulation und freien Virionen.

Bei Betrachtung der Ausschluß-Populationen ist zu beachten, daß die Trennfähigkeit der Säule nur bis Partikel mit einem D_s von ca. 81 nm angegeben werden kann. Die Seren A und C bzw. ihre Hauptfraktion haben hier klar auswertbare Peaks (hervorgehoben). Die freien Virionen sind als Hauptfraktion in den Seren D und E gut erkennbar. Hier ergeben die Seren B und C aufgrund geringer Signalstärke ein sehr unklares Elutionsprofil, deren resultierendes K_{av} entsprechend nicht zu verwerten ist. Die RNA-Signale in der Fraktion der freien Partikel bilden gegenüber den Core-Ag Messungen schmalere Peaks und erreichen vor dem Core ihr Maximum. Die höhere Heterogenität des Core-Ag-Verlaufes zeigt sich auch in höheren Werten für den, die Weite bestimmenden Parameter b ($b_{MW}(\text{Core})=0,426$, $b_{MW}(\text{RNA})=0,128$).

Bei der Analyse des nativen, frischen Serums F zeigte sich noch eine auswertbare Population des Core-Ag bei einem K_{av} von 0,078.

Population	Serum	x_0 (K_{av})	c	b	a	s	D_s [nm]
HCV RNA bei V_0	A	-0,002	1,00	0,01	$2,62 \cdot 10^5$	0,001	>81
	B	0,010	2,34	0,02	$9,63 \cdot 10^4$	0,771	>81
	C	-0,015	1,18	0,02	$2,83 \cdot 10^5$	0,161	>81
	D	-0,018	1,07	0,02	$6,40 \cdot 10^2$	0,071	>81
	E	0,000	1,01	0,06	$9,35 \cdot 10^4$	0,006	>81
	F	-0,016	1,228	0,13	$1,59 \cdot 10^5$	0,001	>81
HCV Core bei V_0	A	-0,011	1,14	0,04	18,5	0,131	>81
	B	-0,017	1,01	0,18	2,4	0,008	>81
	C	-0,013	1,13	0,04	20,3	0,122	>81
	D	-0,007	1,84	0,12	2,6	0,577	>81
	E	0,038	355300	25860	4,1	1,718	>81
	F	0,006	1,00	0,02	1,8	0,001	>81
HCV RNA (freie Virionen)	B	0,377	1,27	0,05	$1,78 \cdot 10^6$	0,557	36,0
	C	0,413	2,26	0,17	$2,92 \cdot 10^4$	0,745	32,9
	D	0,365	1,26	0,10	$6,70 \cdot 10^4$	0,231	37,5
	E	0,382	4,57	0,11	$4,14 \cdot 10^6$	1,184	35,7
	F	0,325	1,04	0,007	$1,56 \cdot 10^6$	0,041	41,1
HCV Core (freie Virionen)	B	0,356	885	6,27	1,97	1,715	38,3
	C	0,375	2,51	0,24	5,59	0,826	36,5
	D	0,440	1,81	0,25	5,67	0,564	30,7
	E	0,362	1,25	0,19	13,5	0,217	37,5
	F	0,362	1,17	0,08	3,09	0,160	37,4
HCV RNA K_{av} 0,1	F	0,106	1,26	0,19	$1,74 \cdot 10^5$	0,230	70,7
HCV Core K_{av} 0,1	F	0,078	1,06	0,07	6,59	0,055	75,6

Tabelle 4: Ergebnis der Weibullanalyse der HCV-Populationen und berechnete Partikelgrößen. Die grau unterlegten Daten erscheinen aufgrund ihres Elutionsprofils für die weitere Analyse nicht geeignet. Die ungewöhnlich hohen Werte für b und c bei HCV Core (V_0) des Serum E resultieren aus dem Fronting des Peaks.

3.4.5. Verhältnis des HCV-Core-Antigen zu RNA

Mit der Kenntnis des Verhältnisses von HCV-Core-Ag zu RNA wäre es – verbunden mit der Bestimmung des Molekulargewichtes des Coreproteins – möglich, näherungsweise die Anzahl von Coreproteinen pro mutmaßlichem Kerncapsid zu errechnen. Wir bestimmten daher dieses Verhältnis bei V_0 und den freien Virionen.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Meßergebnisse für die HCV RNA und das HCV Coreprotein bei allen 6 Seren aus zwei identischen Elutionsvolumina addiert und der Mittelwert gebildet. Für den Bereich von V_0 wurden die Fraktionen von K_{av} $-0,05$ bis $0,05$, für das freie Virion wurde der Bereich von K_{av} $0,3$ bis $0,55$ verwendet. Aus den errechneten Mittelwerten wurde das Verhältnis RNA/Core (q_{V_0} , bzw. q_f) gebildet. Zunächst fällt auf, daß dieses Verhältnis einer großen Schwankung zu unterliegen scheint, was bei einem hypothetischen Kerncapsid mit einer festen Struktur ein eher unerwartetes Ergebnis ist. (Tab. 5)

Serum	RNA[IU] / Core[pg] bei V_0 (q_{V_0})	RNA[IU] / Core[pg] bei freien Virionen (q_f)
A	9800	nicht vorhanden
B	21780	7843
C	8620	4950
D	775	8771
E	12990	68899
F	wegen zu geringer Signalstärken nicht auswertbar	

Tabelle 5: Verhältnis HCV RNA [IU] zu HCV Coreprotein [pg], gemittelt über repräsentative Fraktionen der GEC.

Trotz der großen Schwankungsbreite decken sich diese Ergebnisse größtenteils mit Experimenten zum RNA/Core Verhältnis aus dem Serum von Patienten unter IFN-Therapie. Bei diesen Versuchen konnte ein durchschnittliches Verhältnis von 7900 IU RNA/ pg Core mit Schwankungen von 50 bis 20 000 IU/pg nachgewiesen werden (Schüttler et al., 2004). Aus diesem Rahmen fällt die immunsupprimierte Patientin E deutlich heraus.

Auffällig ist, daß sich diese Werte deutlich von dem Verhältnis unterscheiden, das theoretisch zu erwarten wäre: Ein komplettes Core mit 240 Untereinheiten und einem RNA-Genom sollte ca. 125.000 Genome/pg Core aufweisen.

3.4.6. Inhibition der RT-PCR durch Serumbestandteile in der GEC

Aufgrund der Eigenschaft der GEC, Partikel nach ihrer Größe aufzutrennen, wäre es möglich, daß nicht nur die zu messenden Viruspartikel fraktioniert werden, sondern auch mögliche Inhibitoren. Diese Inhibitoren im Serum könnten

mithin einen unterschiedlichen Einfluß auf die Reverse Transkription bzw. PCR-Amplifikation bei der Virusquantifizierung je nach Fraktionsbereich ausüben; in diesem Falle wären rt-PCR-Signale in den einzelnen Fraktionen auch durch den Einfluß dieser möglichen Inhibitoren unterschätzt bzw. bei Entfernung dieser Serumbestandteile erhöht. Dies hätte auf die Auswertung der Chromatogramme erheblichen Einfluß. Diesen möglichen Störfaktor galt es zu überprüfen.

Zunächst wurden 20 µL des Serum A (150.000 IU HCV RNA) mit jeweils 120 µL aus Fraktionen des gesamten Spektrums von K_{av} 0 bis 1 der GEC des Serum G (HCV-negativ) vermischt, für 30 min. bei T_r inkubiert und anschließend die Menge der HCV-RNA in diesen gespickten Fraktionen quantifiziert. Es ergab sich ein Mittelwert von 136.500 IU RNA/mL (Standardabweichung (SD)= 33080), ohne daß ein definierter Bereich des K_{av} für eine Hemmung der RT-PCR erkennbar war.

Um die Gegenwart von Inhibitoren für die RNA-Quantifizierung im Serum überhaupt zu ermitteln, wurden gereinigte HCV-Partikel aus der GEC mit aufsteigenden Konzentrationen von negativem, nativen Serum versetzt.

Dazu wurde in einer aufsteigenden Reihe 0 bis 100 µL eines HCV-Ak und HCV-RNA negativen Serums in 10er Schritten mit PBS auf 100 µL ergänzt. Dazu wurden jeweils 40 µL Eluat der GEC von Serum E (ca. 90.000 IU HCV RNA) aus dem Bereich von K_{av} 0,35 gegeben, für 30 min. bei T_r inkubiert und anschließend die HCV-RNA quantifiziert. Bei einem Mittelwert von 79.700 IU RNA/mL (SD 19.700) war wiederum kein definierter Bereich einer Inhibition erkennbar.

Bei beiden Versuchen also war bei den Schwankungen um den Mittelwert keine eindeutige Tendenz zu einer Hemmung, bzw. Steigerung der rt-PCR-Effizienz im Sinne eines Peaks zu erkennen. Die rt-PCR wird also durch differentiell aufgetrennte Serumbestandteile nicht gestört.

3.4.7. Bestimmung des Fehlers für V_e

Gemeinsames Merkmal aller GEC-Läufe ist die kontinuierliche, nicht an Fraktionen gebundene Messung der Proteinkonzentration. Der Proteinpeak liegt fast

bei V_t und unterliegt somit dem größten methodischen Fehler bei der Ermittlung des Elutionsvolumens während des Laufes, da sich sein V_e aus der Addition einer maximalen Anzahl von Fraktionsvolumina ergibt. Der Peak scheint daher geeignet zu sein, um den maximalen Fehler von V_e beurteilen zu können. Der Verlauf der Extinktion bei 280 nm ist bei den Plasmen bzw. Seren uniform. Einzig die immunsupprimierten Patienten weisen eine andere Peakform auf, weshalb sie getrennt betrachtet werden. Zunächst wurden in Abbildung 28 die Photometer-Meßwerte aller Läufe der immunkompetenten Patienten in einer Grafik vereint. Um sie besser vergleichen zu können, wurde die Extinktion als Prozent des Maximalwertes angegeben. Gemeinsamkeiten der Chromatogramme sind: Ein kleiner Peak bei V_0 ($K_{av} = 0$), der durch die erwähnten Lipoproteine >80 nm bedingt ist, ein Plateau von 0,55 bis 0,7 und der darauffolgende Hauptpeak bei 0,85.

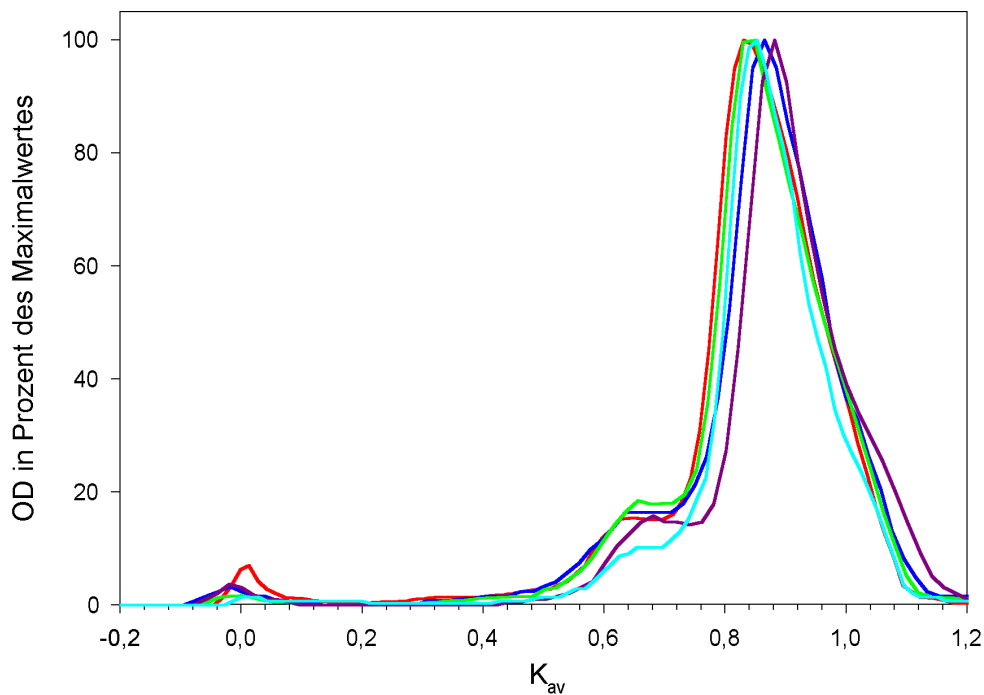


Abbildung 28: Proteinkonzentrationen (Extinktion bei 280 nm) der untersuchten Seren aller immunkompetenten Patienten, in Prozent ihres Maximalwertes.

— Serum A — Serum B — Serum C — Serum D — Serum G

Es fällt auf, daß sich bei den Seren der beiden immunsupprimierten Patienten (E und F) im Abgang des Hauptpeaks noch eine zusätzliche Schulter zeigt, die bei den Seren der nicht-immunsupprimierten Patienten so nicht vorhanden ist.

Außerdem erscheint der Hauptpeak gegenüber den übrigen Seren ein wenig nach vorne gezogen ($\Delta K_{av} \approx 0,04$). (Abb. 29)

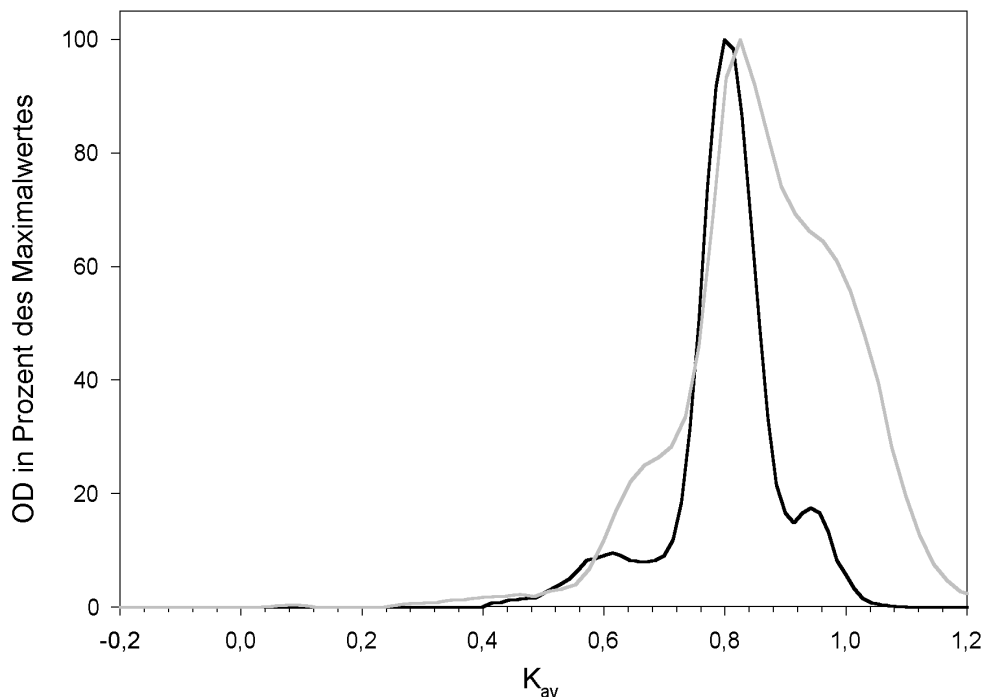


Abbildung 29: Proteinkonzentrationen (in % max. OD_{280}) der untersuchten Seren der beiden immunsupprimierten Patienten, in Prozent ihrer Maximalkonzentration
 — Serum E — Serum F

Dieses Bild kann dadurch erklärt werden, daß der IgG/M Anteil der Serumproteine unter Immunsuppression deutlich verringert ist (Vorlaender et al., 1980). Aus der Analyse der IgG-Konzentration (Abb. 14) ergab sich, daß die IgG-Konzentration in der Spitze des Hauptpeaks am größten ist. Geht man nun davon aus, daß die Form des Hauptpeak wesentlich durch das IgG definiert ist, kann die verfrühte Spitze auf das verringerte IgG unter Immunsuppression im Verhältnis zu den übrigen Proteinen zurückgeführt werden. Dies entspricht auch dem klassischen Bild einer Elektrophorese von Plasmaproteinen bei IgG-Mangelsyndrom, bzw. Immunsuppression. Bildet man bei den fünf Seren mit nicht verändertem Proteinprofil den Mittelwert des K_{av} des Hauptpeaks, dann erhält man ein K_{av} von 0,855; die Standardabweichung ergibt den Wert 0,0189, so daß eine Standardabweichung 2,2% von V_e entspricht.

3.4.8. Menge eingesetzter und eluierter Viren

Eine der methodischen Schwierigkeiten einer GEC ist, daß nicht immer alle in einen Lauf eingesetzten Partikel wieder eluiert werden. Dies kann einfach durch unspezifische Absorption an der Matrix geschehen, im Falle eines Virus zusätzlich auch dadurch bedingt sein, daß das Virus während des Laufes zerfällt, sein Genom durch im Serum oder ubiquitär vorhandene Nukleasen gespalten wird, und somit nicht mehr durch NAT nachweisbar ist. Bei den von uns verwendeten Matrices ergab sich durch Länge und Fließgeschwindigkeit eine Zeitspanne von zwei bis drei Tagen zwischen Beginn der GEC und Verarbeitung des Virus zur Analyse. In *Tabelle 6* ist die eingesetzte und wieder eluierte HCV-RNA aus den HCV-Läufe gegenüber gestellt.

Serum	eingesetzte IU (<i>ein</i>)	eluierte IU (<i>aus</i>)	Anteil <i>aus an ein</i>
A	1 400 000	845 000	60%
B	400 000	500 000	125%
C	2 500 000	830 000	33%
D	2 900 000	490 000	17%
E	3 000 000	14 800 000	490%
F	8 000 000	4 600 000	58%

Tabelle 6: Vergleich der nach GEC wiedergewonnenen HCV-RNA-Einheiten der Seren A-F.

Auffällig ist der hohe Überschuß an eluierten RNA-IU bei Serum E. Dieser liegt deutlich über dem maximalen Fehler der Meßmethode. Da das Serum E jedoch insgesamt drei mal mit vergleichbaren Ergebnissen analysiert wurde, spricht dies für einen Inhibitor im Serum der durch die GEC entfernt wurde. Dabei könnte es sich um die alkylierenden Chemotherapeutika handeln, mit denen die Patientin behandelt wurde. Der Überschuß bei Serum B ist wahrscheinlich durch den geringen initialen RNA-Level und den Fehler bei den daraus resultierenden geringen Konzentrationen in den Fraktionen entstanden.

Aus Untersuchungen zur Lagerungsfähigkeit von HCV ist bekannt, daß die RNA bei 5°C in Serum bis zu drei Monate stabil ist (Jose et al., 2003). Das Core-Protein ist bei Inkubation mit 37° über mindestens 24 h stabil (Nakamuta et al.,

2001). Leider existieren keine vergleichbaren Experimente zur Lagerung in PBS und TNE. Mögliche Erklärungen für die Verlusten der übrigen Seren wären also einerseits eine unspezifische Absorption an der Matrix, andererseits aber auch eine Instabilität des Virus in den beiden Laufpuffern. Eine unspezifische Absorption wurde stets dadurch minimiert, daß ein Sättigungslauf mit Serum vor der eigentlichen Messung vorgenommen wurde.

3.5. Elektronenmikroskopische Darstellung viraler Partikel

3.5.1. Darstellung von Eichpartikeln

Von den zur Eichung verwendeten Partikeln wurden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt (Negativ-Kontrastierung), um im Parallelansatz bei der Aufreinigung von HCV- Partikeln aus dem Serum F, als Positivkontrolle der Aufreinigung wie auch der Präparation selbst zu dienen. Zur Präparation wurden die Eichviren direkt aus Serum (Parvovirus B19, 100µl) oder Zellkulturüberstand (SFV, SV40, Poliovirus je 50 µl) in 12mL TNE durch Ultrazentrifugation pelletiert (1,5 h, 36.000 rpm, Rotor TST41.14). Die Präparation erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben.

In Abbildung 29 sind die Aufnahmen des SFV zu sehen. Man erkennt sowohl homogen weiße Partikel (a) als auch Partikel mit einer dunkleren Innenstruktur (b). Diese scheinen in mehreren Fällen aufgeplatzt zu sein (c). Die weißen Partikel weisen dagegen in vielen Fällen ein oder zwei kleinere Abschnürungen auf (d). Da es sich bei diesem Präparat um einen Zellkulturüberstand handelte, ist davon auszugehen, daß es sich bei allen Partikeln um SFV-assoziierte Partikel handeln sollte. Das heterogene Bild könnte durch präparationsbedingte Artefakte (c und d) bedingt sein, aber auch die beiden in der GEC nachgewiesenen unterschiedlich großen Viruspopulationen repräsentieren (a und b).

Die anderen Viren zeigen homogenere Bilder in der EM. SV40 (Abb. 30A) ist jedoch deutlich kleiner als die mittels CryoEM bestimmten 50 nm, was für eine Schrumpfung durch die Präparation spricht. Die Größen von Poliovirus (Abb. 30B) und Parvovirus B19 (Abb. 30C) bewegen sich in dem Bereich, der durch die CryoEM angegeben wurde.

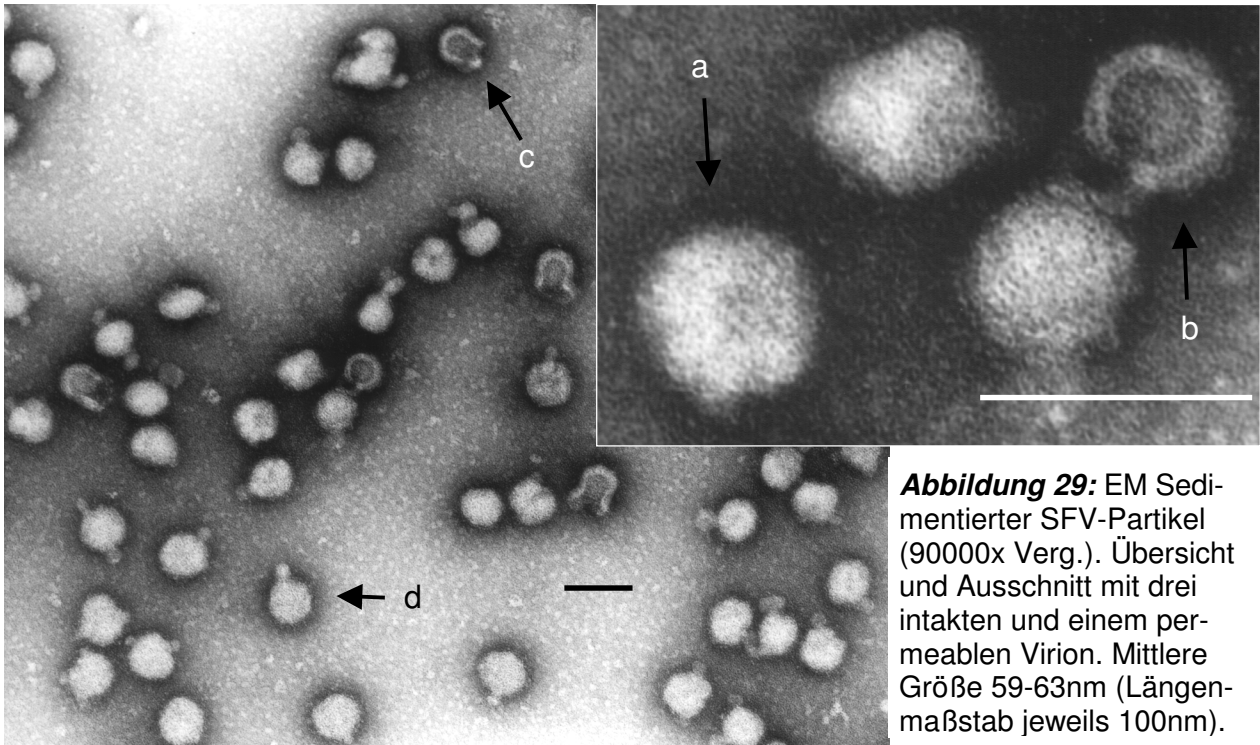


Abbildung 29: EM Sedi-
mentierter SFV-Partikel
(90000x Verg.). Übersicht
und Ausschnitt mit drei
intakten und einem per-
meablen Virion. Mittlere
Größe 59-63nm (Längen-
maßstab jeweils 100nm).

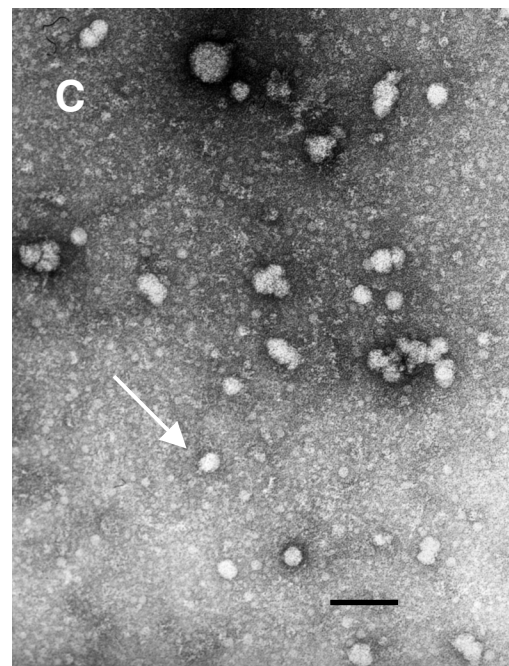
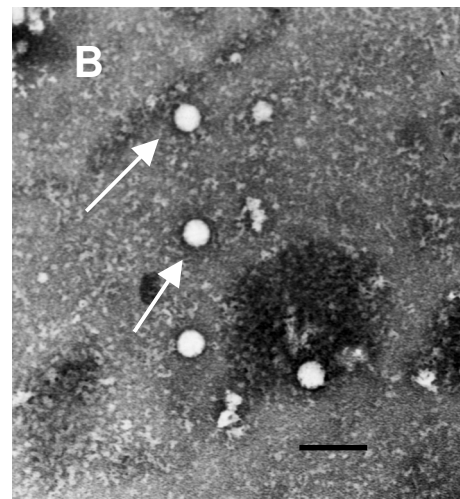
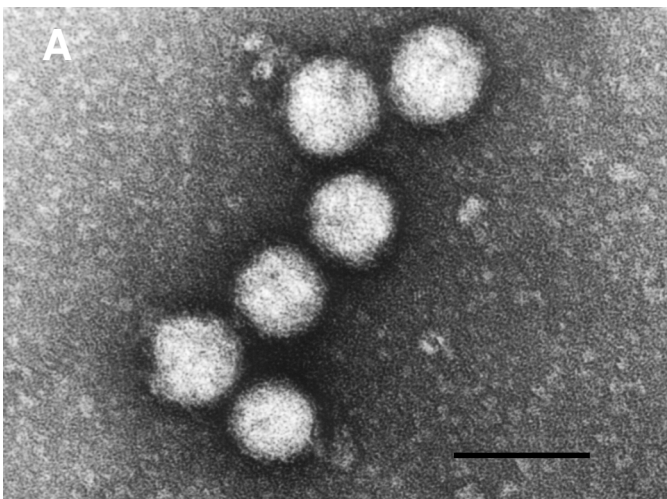


Abbildung 30: EM von sedimentierten Par-
tikeln und ihre daraus bestimmte mittlere
Größe (Längenmaßstab jeweils 50nm):

A) SV40: mittlere Größe von 40 nm
(180000x Verg.)

B) Poliovirus Sabin I: 30nm (90000x Verg.)

C) Parvovirus B19: 26nm (90000x Verg.)

Darstellung von Partikeln aus HCV-positivem Serum

Zur Darstellung von HCV-Partikeln wurde mit frischem Patientenserum F unmittelbar nach Entnahme am Patienten eine GEC durchgeführt, danach je 3 Fraktionen des Ausschlußpeaks in V_0 und im Hauptpeak um K_{av} 0,36 einer wie in 3.5.1. beschriebenen Ultrazentrifugation unterzogen und zur EM präpariert. Aufgrund des Ausgangsmaterials und der Verdünnung durch die GEC sind keine optimalen Voraussetzungen für eine EM gegeben gewesen. Durch die oben erwähnte Verwendung von direkt nach Abnahme verarbeitetem Serum und der Aufkonzentrierung mittels UZ versuchten wir, dennoch optimale Bedingungen zu schaffen.

In der Ausschlußfraktion sind größere Lipidaggregate mit einigen wenigen möglichen Virus-ähnlichen Partikeln zu erkennen (Abb. 31, E, Pfeil).

In der Hauptfraktion waren zwei Partikelpopulationen mit jeweils homogener Größe erkennbar. In einigen Partikeln (Vergrößerung F) scheint eine regelmäßige, randständige Struktur vorhanden zu sein. Obwohl diese Partikel aus Fraktionen bei einem K_{av} entsprechend ca. 40 nm isoliert wurden, zeigen sie in der EM-Präparation einen scheinbaren Durchmesser von ca. 55nm, was einem Abplattungseffekt entspräche.

Insgesamt konnten wir Partikel darstellen, die aber in einer geringen Konzentration vorliegen und keine zweifelsfrei virustypische Morphologie zeigen. Somit können wir nicht entscheiden, ob überhaupt oder welche der dargestellten Partikel HC-Virionen repräsentieren. Die regelmäßigen Strukturen machen es dennoch nicht vollkommen unwahrscheinlich, daß es sich hierbei teilweise um virale Partikel handeln könnte.

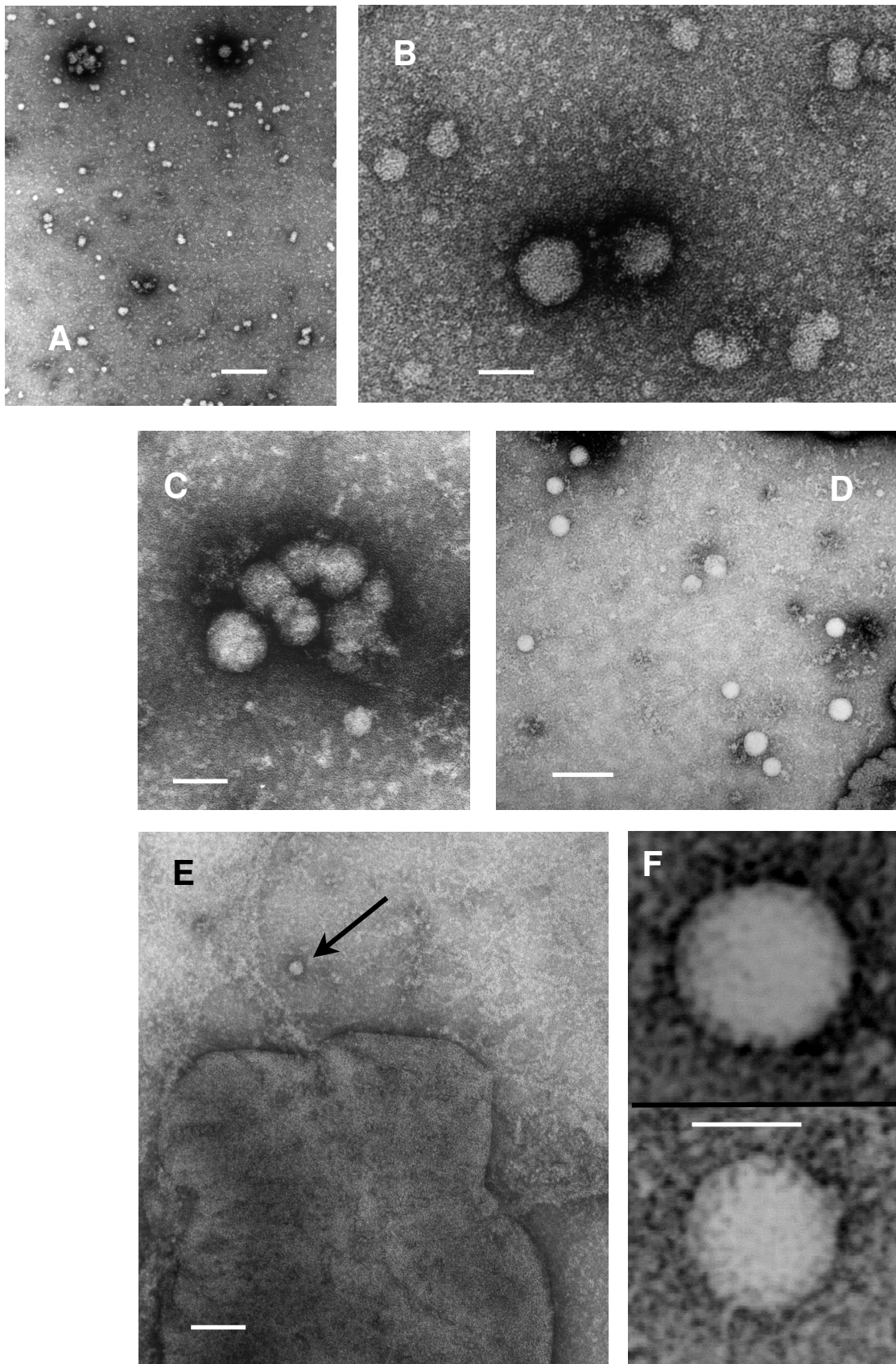


Abbildung 31: EM-Darstellung von Partikeln aus Serum F nach GEC und Ultrazentrifugation (angegeben jeweils die Vergrößerung und Länge des Eichstrichs: **A)** 35100x, 200nm, **B)** und **C)** 180000x, 50nm, **D)** 100000x, 100nm, **E)** Ausschlußfraktion 90000x, 100nm, **F)** 360000x, 50nm (Vergrößerung aus D)

3.6. Molekulargewicht des HCV-Core Proteins im Serum

Um das Molekulargewicht des HCV-Core-Protein im Serum zu bestimmen, wurden Western-Blots aus den Seren A und E angefertigt. Serum A wurde direkt mit Laemmli-Puffer/dTT inkubiert, bei Serum E wurden nebeneinanderliegende Fraktionen der GEC aus dem Bereich K_{av} 0,3 bis 0,5 vereinigt und in der Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Als Negativkontrolle diente HCV-negatives Serum, als Positivkontrolle die Positivkontrolle aus dem HCV-Core-ELISA der Firma Ortho (rekombinantes Coreprotein). Als Antikörper diente der Peroxidase-markierte aHCV-Core Antikörper aus dem HCV-ELISA.

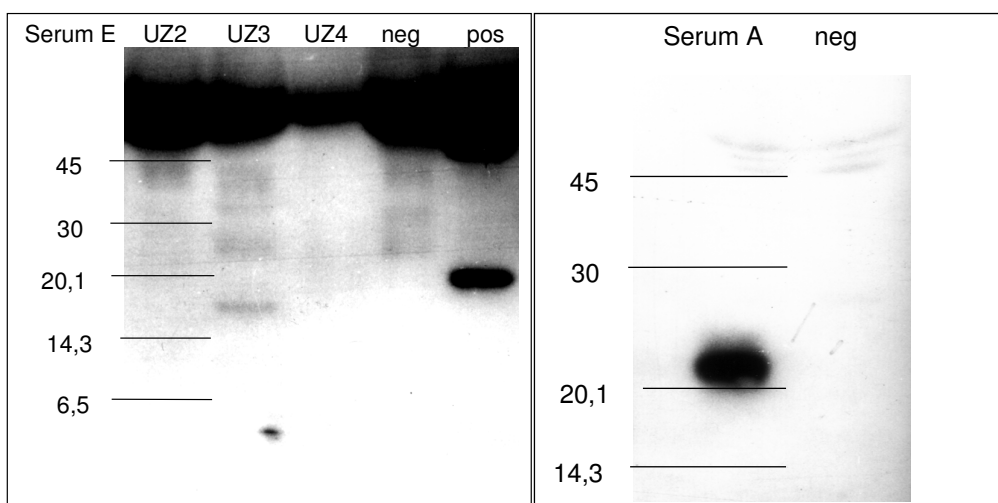


Abbildung 32: Western-Blot gegen das HCV-Core-Protein. Links wurde 1 μ L des Serum A direkt eingesetzt. Rechts wurden die Hauptfraktionen aus der GEC von Serum E vereinigt und in der Ultrazentrifugation (UZ) aufkonzentriert. UZ2 = K_{av} 0,35-0,39, UZ3 = K_{av} 0,4-0,44 und UZ4 = K_{av} 0,45-0,5.

Bei Serum E konnte eine Bande in Fraktion UZ3 (=Hauptpeak) bei ungefähr 17-18 kD nachgewiesen werden, bei Serum A eine sehr viel stärkere Bande bei ungefähr 22 kD (Abb. 32). Das HCV-Core-Protein hat stark basische Eigenschaften mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt bei pH 11,65 (bezogen auf ref. Seq. acc.no. M58335, Programm EditSeq Proteinstatistik), was zu einem anderen Bewegungsverhalten im elektrischen Feld führt, als die neutralen Proteinmarker besitzen: Dies schränkt die Beurteilung der Molekulargewichtsbestimmung ein. Gleichwohl fällt auf, daß das Molekulargewicht zwischen den beiden Seren Unterschiede aufzuweisen scheint. Dies ist im Zusammenhang mit weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe noch zu diskutieren.

3.7. Immunpräzipitation Antikörper-beladener HCV-Partikel

Bei der Auswertung der GEC Läufe stellten sich zwei Populationen des HCV dar: Die eine Population ist so groß, daß sie im Ausschlußvolumen liegt, die andere ist kleiner mit einem K_{av} bei ungefähr 0,38. Die größere Population könnte durch lipidhaltige Aggregate und/oder eine Antikörperbeladung der Viren zustande gekommen sein. Aus diesem Grunde wurden Immunpräzipitationsversuche mit Fraktionen aus beiden Populationen verschiedener Seren mit Dynabeads und nach Hijikata (Abschnitt 2.2.12.) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Methode nach Hijikata waren so starken Schwankungen unterworfen, daß davon auszugehen ist, daß diese Methode für eine quantitative Bewertung der Selektion von IgG-beladenen Viren nicht geeignet ist. Mögliche Ursache wäre das nicht genau bestimmbare – und damit meist suboptimale – Verhältnis von Antikörper zu Antigen, so daß sich kein genügend stark vernetztes Pellet ausbilden kann.

Zu besseren Ergebnissen führten die Versuche mit Dynabeads: Bei der Auftrennung der V_0 Population des Serum A konnte bei zwei nebeneinander liegenden Fraktionen einmal 55% und das andere mal 21 % der eluierten Viren mittels Dynabeads gebunden werden. Bei der Untersuchung des Serum C war es möglich in der V_0 Population in drei nebeneinander liegenden Fraktionen 79, 90 und 97 % der Viren an Dynabeads zu binden. Im Gegensatz dazu wurden aus der Population bei K_{av} 0,4 lediglich maximal 5 % der Viren an die Dynabeads gebunden (4 benachbarte Fraktionen, 1, 5, 1 und 1 %) (Tab. 7)

Serum	Fraktion Nr. (D_s [nm])	Nicht präzipitierte Viren [IU/mL]	Präzipitierte Viren [IU/mL]	Präzipitierte Viren in %
A (bei V_0)	26 (≥ 81)	23760	28890	54,9
	27 (≥ 81)	34310	9118	21,0
C (bei V_0)	13 (≥ 81)	444	1661	78,9
	14 (≥ 81)	1497	13040	89,7
	15 (≥ 81)	190	7280	97,5
C bei K_{av} 0,44	36 (≈ 35)	192200	3949	0,2
	37 (≈ 35)	159400	9012	5,3
	38 (≈ 35)	574100	7560	1,3
	39 (≈ 35)	231900	1937	0,8

Tabelle 7: Daten der Präzipitationsversuche mit Dynabeads

3.8. Versuche zur Freilegung des Capsids

Um die Größe des HCV-Core-Partikels nach Delipidisierung bestimmen zu können, wurden alle im Methodenteil beschriebenen Verfahren zur Entfernung der Lipidmembran angewandt. Verwendet wurde das Serum A. Es konnte jedoch bei keinem Verfahren nach der Detergensbehandlung bzw. Behandlung mit Ether/Butanol oder Chloroform HCV-RNA nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die Methode nach André (André et al., 2002), von dem wir uns die richtige Anwendung seiner Methode fernschriftlich bestätigen ließen. Unter der Vorstellung, daß von allen verwendeten Methoden die Entfernung der Lipidhülle durch Phospholipase C die schonendste gewesen sei, wurde das entsprechende Specimen trotz nicht nachweisbarer RNA durch GEC analysiert. Dabei konnte über das gesamte Elutionsvolumen ein knapp an der Nachweisgrenze gelegenes Core-Signal gemessen werden. Ein Peak war nicht auszumachen. Eine Entfernung der Virushülle ohne gleichzeitige Freilegung bzw. Zerstörung des Genoms war somit nicht möglich.

3.9. Versuche mit Superose 6 auf analytischen Säulen

Nachdem sich durch die Versuche auf Biogel A50m herausstellte, daß das HCV deutlich kleiner zu sein schien, als zunächst angenommen, entschlossen wir uns, auch Matrices aus Superose 6 mit langer Laufstrecke zu gießen. Dies war zunächst nicht geplant gewesen, da das Ausflußvolumen von Superose 6 unter der vorher vermuteten Größe der freien HCV-Partikel liegt.

Zur Kalibrierung wurden die bekannten Partikel verwendet, sofern sie kleiner als 55 nm waren. Dem zu kleineren Partikeln verschobenen Meßbereich wurde mit der Bestimmung von Ferritin (Fa. Sigma, USA, Kat.Nr. F-4503) und α -Makroglobulin (Nachweis im Serum G) Rechnung getragen. Der Nachweis erfolgte mittels Durchflußphotometer. Die Filtration wurde in üblicher Weise durchgeführt, die Maxima der Peaks wurden mittels der Weibullfunktion bestimmt. Die Regression durch die ermittelten Punkte führt zu folgender Funktion:

$$D_s(\text{Superose 6}) = 8,73 + 72,53e^{(-7,34K_{av})}$$

Der Regressionskoeffizient r^2 beträgt 0,9996 und ist damit wiederum sehr klein. Die Anwendung der Weibullverteilung scheint also auch auf andere Gel-Matrices übertragbar zu sein (Abb. 33).

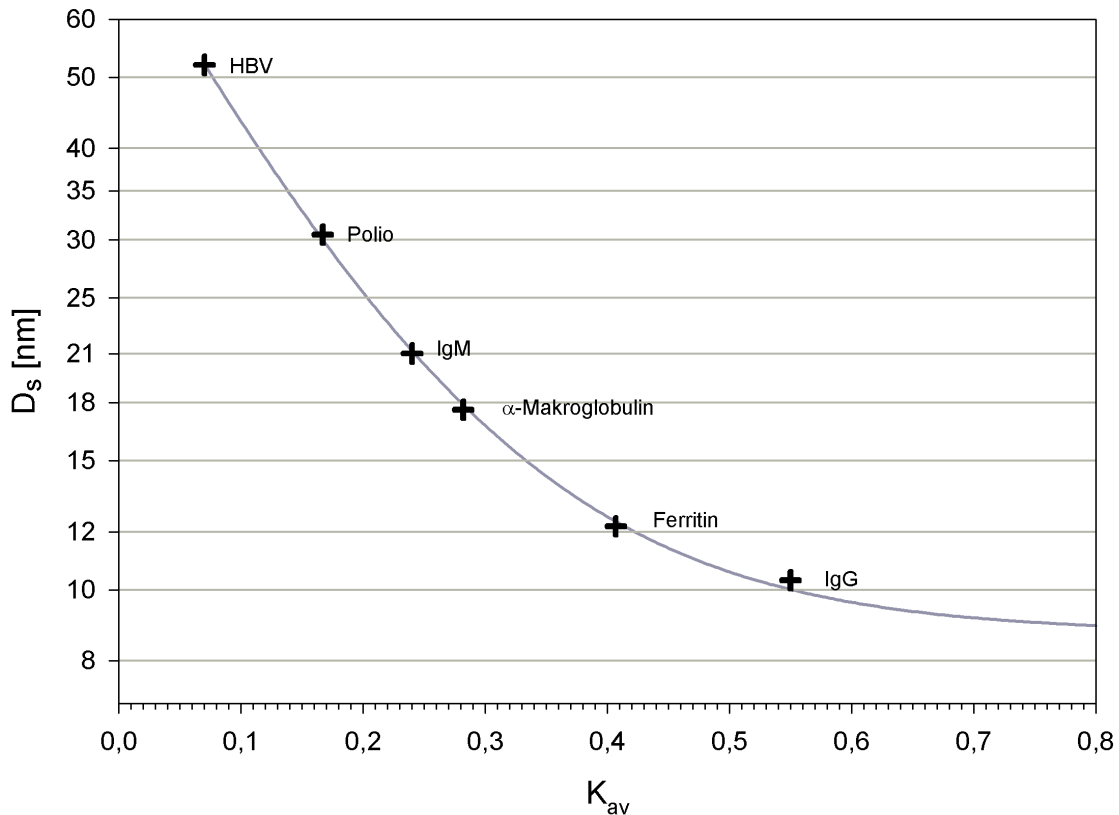


Abbildung 33: Kalibrierungskurve zur Anwendung der GEC mit Superose 6. Die y-Achse für D_s ist logarithmisch dargestellt.

Das Serum F wurde zur Charakterisierung der freien HCV Population auf Superose6 getestet. Der Peak der RNA wurde mittels WV zu 0,133 bestimmt (Abb. 34) und entspricht somit einem D_s von 36,1 nm, was im Bereich der mit Biogel bestimmten Größen liegt und damit die Unabhängigkeit der Größenverteilung von diesen verschiedenen Matrices demonstriert.

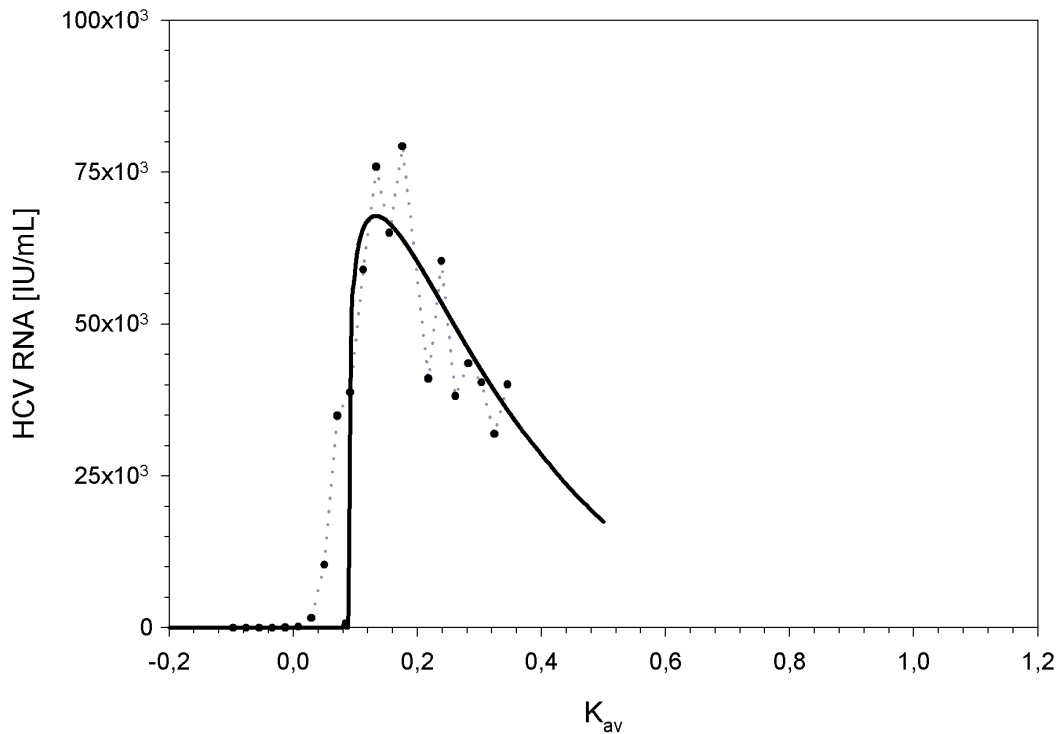


Abbildung 34: Nachweis von HCV RNA (Serum F) auf Superose 6

•• HCV-RNA — Weibull-Regression

3.10. Anwendung der GEC auf HBV, BVDV und B19

3.10.1. GEC von HBV-positivem Serum auf Biogel A50m

Das Serum G wurde verwendet, um die Elutionsvolumina von IgM und IgG zu bestimmen. Gleichzeitig wurde das Elutionsverhalten von HBV analysiert. Dazu wurden HBV-DNA und HBsAg nachgewiesen. Da die durch OD₂₈₀ ermittelten Ausschlußvolumina auch bei unmittelbar nacheinander auf der gleichen Matrix durchgeführten Versuchen nicht vollständig zur Deckung kamen, wurde der Ausschlußpeak von HBV-DNA zusätzlich zur Bestimmung von V_0 verwendet, um einen einheitlichen Meßpunkt auch bei später gegossenen Matrices zu gewährleisten.

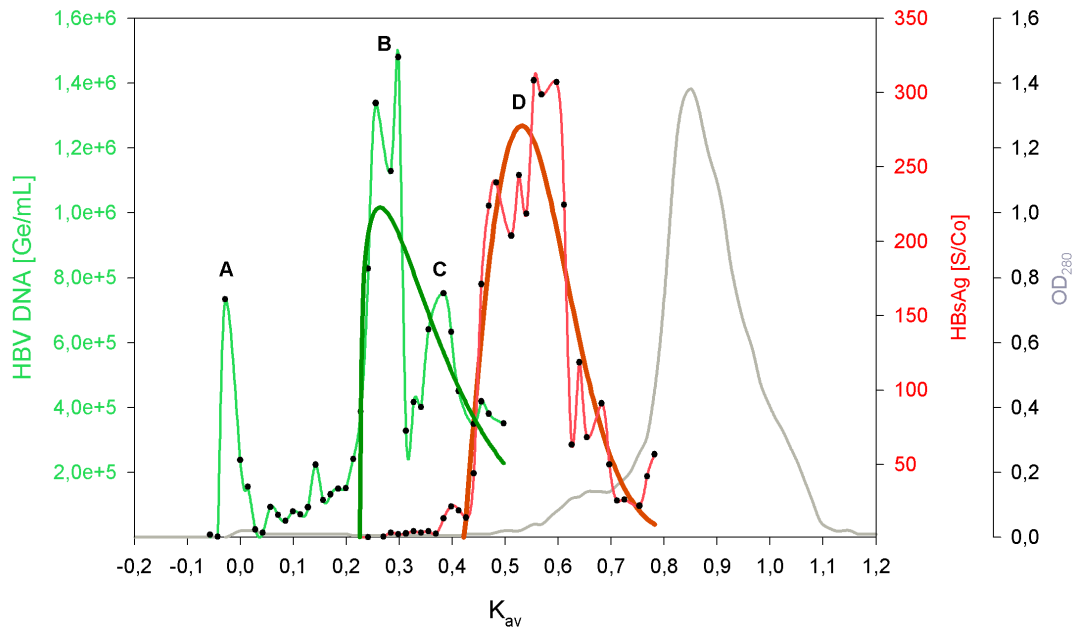


Abbildung 35: Nachweis von HBV und HBsAg in der GEC auf Biogel A50m

— DNA Signal — Weibull-Kurve der HBV-DNA — HBsAg — Weibull-Kurve des HBsAg — Optische Dichte

Zusätzlich zum Peak in V_0 (A) konnte ein weiterer HBV-DNA Peaks nachgewiesen werden, der das freie HBV repräsentiert (B). Der K_{av} Wert war mit 0,246 (50,2 nm) gut bestimmbar. Man könnte jedoch meinen, daß der Peak von einem zweiten, kleineren begleitet wird, der durch eine Senke in der Eluatkonzentration von drei Fraktionen vom vorderen Peak abgrenzbar ist (C). Dieser würde bei 0,379 (36 nm) liegen (Abb. 35). Diese Beobachtung konnte bei Versuchen mit demselben Serum auf Superose 6 nicht bestätigt werden, so daß es sich um ein Artefakt zu handeln scheint. Der HBsAg-Peak zeigte einen K_{av} Wert von 0,531 was einer Größe von 24,6 nm entspricht (D).

3.10.2. Vergrößerung des Stokes'schen Durchmessers durch Antikörper

Um die Vergrößerung des Stokes'schen Durchmesser eines Virions durch die Beladung mit humanen Antikörpern zu quantifizieren, wurden zwei Chromatogramme erstellt: Für das Parvovirus B19 wurde ein Serum analysiert, daß sowohl einen hohen anti-B19-IgG-Titer als auch eine hohe Viruslast aufwies (Abb. 36).

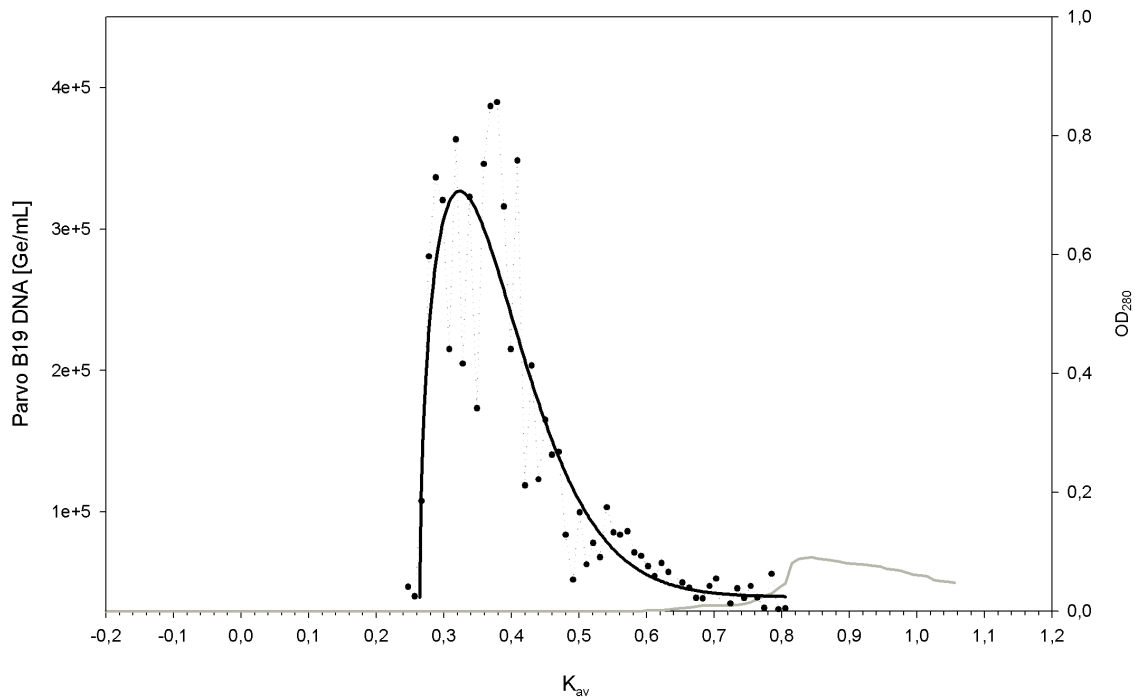


Abbildung 36: Nachweis von Parvovirus B19 aus dem verdünnten Serum eines PVB19-Ak(IgG) positiven Patienten auf Biogel A50m: ■■ DNA Signal — Weibull-Regression — Optische Dichte

Der K_{av} Wert beträgt 0,312 (42,5 nm). Dies bedeutet eine Vergrößerung des Durchmessers gegenüber dem nicht Ak-beladenem Virus um 17 nm, was einer Radiusvergrößerung von 8,5 nm durch statistische Bindung eines IgG-Moleküls pro Untereinheit entsprechen könnte.

Für die Umsetzung dieses Versuches mit dem Polio-Impfvirus Sabin 1 wurde zunächst das Impfvirus aus dem Zellkulturüberstand mit dem Serum eines Impflings inkubiert, der vier Monate zuvor eine Auffrischung des Impfschutzes mit Salk-Totimpfstoff erhalten hatte. Anschließend erfolgte die Analyse mittels GEC. (Abb. 37)

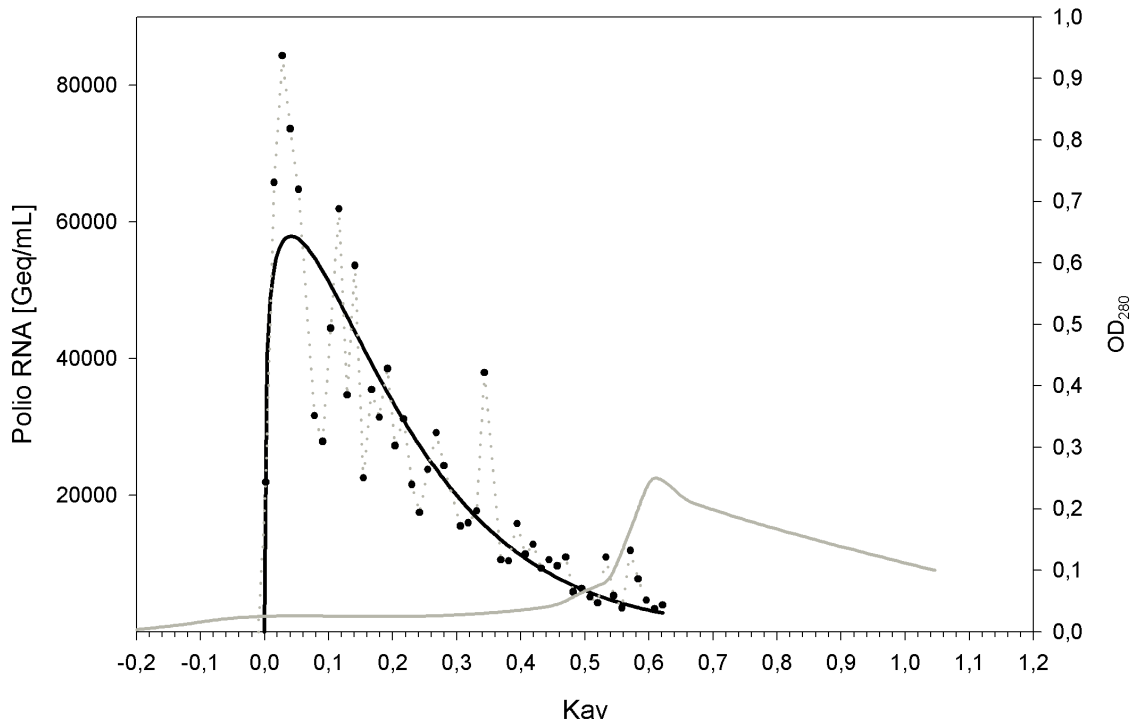


Abbildung 37: Nachweis von Poliovirus in der GEC auf Biogel A50m, das mit Polio-Ak positivem Serum inkubiert wurde: --- RNA Signal — Weibull-Regression — Optische Dichte

Der K_{av} Wert des inkubierten Poliovirus beträgt 0,041 und liegt damit nahezu bei V_0 . Insgesamt ist der Peak stark asymmetrisch mit einem breiten Tailing bis K_{av} 0,5. Es hat den Anschein, daß der Peak sehr nahe an V_0 , wenn nicht gar in V_0 liegt, was für Aggregate aus mehreren Partikeln spricht.

3.10.3. Größenbestimmung von BVDV

Das Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVDV) hat bezüglich der Erforschung von HCV eine gewisse Bedeutung, da es aufgrund seiner taxonomischen Nähe als Pestivirus und seiner leichten experimentellen Zugänglichkeit in Zellkulturen vielfach als Modellvirus für HCV genutzt wird. Dies gilt insbesondere für Filtrationen zur Viruselimination in Gerinnungsfaktoren (Johnston et al., 2000) (Chandra et al., 1999). Die Größe von BVDV war also durch sein Verhalten in der GEC zu bestimmen, da man bisher annahm, daß diese mit der Größe von HCV vergleichbar sei.

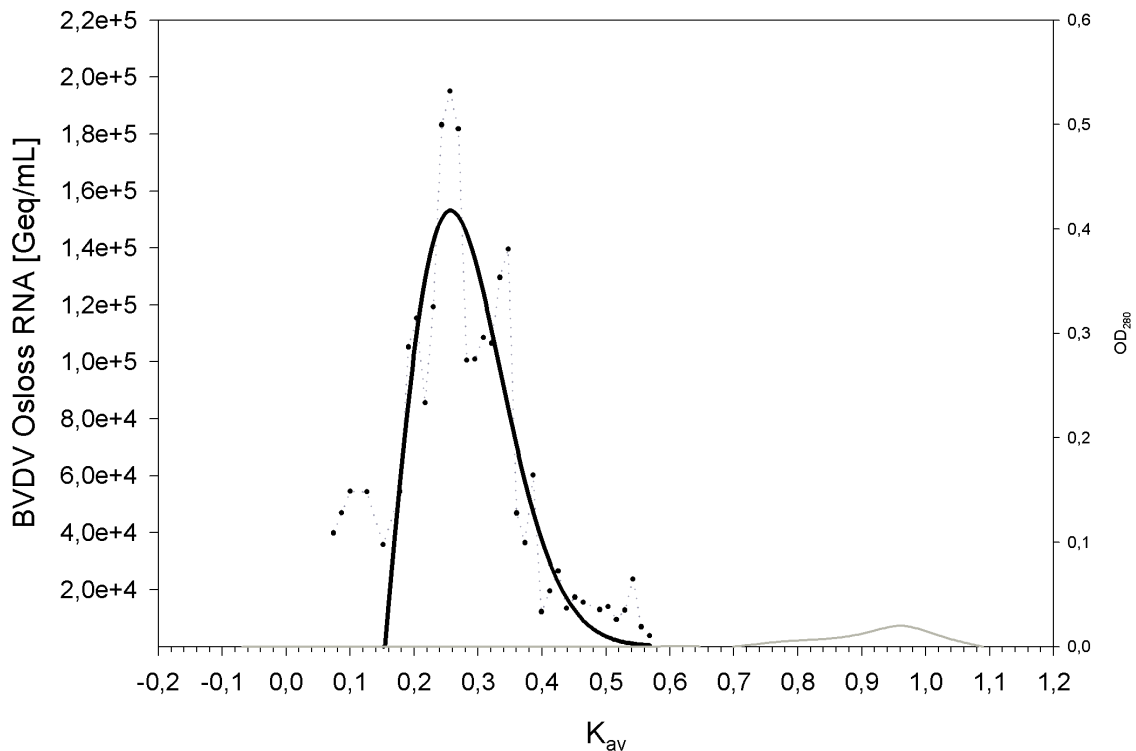


Abbildung 38: Nachweis von BVDV in der GEC auf Biogel A50m mittels Real-time PCR: **...** RNA Signal **—** Weibull-Regression **—** Optische Dichte

Der K_{av} Wert von BVDV wurde mit 0,256 bestimmt (Abb. 38). Daraus ergibt sich ein Stokes'scher Durchmesser von 48,6 nm. Da der Stamm Osloss von BVDV jedoch eine Gemisch aus zwei verschiedenen Viruspartikeln ist, könnte aus der Form der Elutionskurve auch geschlossen werden, daß es sich hierbei wiederum um die Überlagerung von zwei verschieden großen Populationen handelt: Nach dem ersten Peak ist eine durch vier Fraktionen definierte Senke zu erkennen. Eine einzelne darauf folgende Fraktion mit höherer Konzentration würde einen Ausreisser vermuten lassen. Da sich jedoch ein kleiner Peak aus zwei Fraktionen herausbildet, könnte hier durchaus von einer zweiten, kleineren Population ausgegangen werden. Eine Weibullanalyse unter der Prämisse, hier zwei Peaks vorzufinden, ergibt folgende Werte:

Peak 1: $K_{av} = 0,260$ (48,4 nm), Peak 2: $K_{av} = 0,318$ (41,8 nm)

Erstaunlicherweise wird der durch die Weibullregression berechnete K_{av} –Wert des gesamten Datensatzes durch den zweiten Peak fast nicht berührt; gegenüber dem herausgelösten größeren Peak divergiert der errechnete Durchmesser nur um 0,2 nm.

4. Diskussion

Seit dem Beweis der Infektiosität eines Ultrafiltrates aus Tabak-Mosaik-Virus-haltigem Pflanzensaft durch Ivanovskij (Ivanovskij, 1892, Ivanovskij, 1903), ist die Bestimmung von Größe und Morphologie von Viren grundlegend für die Erforschung dieser subzellulären Erreger. Auch heute stellen Ultrafiltration, Elektronenmikroskopie und Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifugation erste Schritte zur Charakterisierung von Viren dar.

Wegen fehlender Nachweissysteme liefen diese klassischen Methoden bei der Entdeckung des HCV zunächst ins Leere, und erst mit der damals neuartigen Technik der Selektion einer Vielzahl von cDNA-Klonen wurde das Genom des HCV entdeckt.

Die Filtrationsexperimente von D. Bradley (Bradley, 1985) gaben erste Hinweise auf die Morphologie des HCV, doch seither ist die weitere Charakterisierung von nativen HCV-Partikeln nicht wesentlich fortgeschritten: zum einen ergaben Untersuchungen mittels Dichtgradienten keine einheitlichen Partikelpopulationen, zum anderen sind keine überzeugenden EM-Darstellungen gelungen; in gewisser Weise blieb das HCV jenes „unsichtbare“ Virus, das es seit den ersten Hinweisen auf eine Non-A-Non-B-Hepatitis war.

Die Angaben zur Größe des HCV fußen im wesentlichen auf Filtrationsexperimenten wie auch auf Analogieschlüssen von Größen bekannter Flavi- und Pestiviren. Dieses Vorgehen ist methodisch wenig befriedigend. Auch die Ermittlung der Größe dieser verwandten Viren durch die artefaktanfällige Messung mittels konventioneller EM ist nicht wirklich zuverlässig.

Da die konventionellen Methoden zur Größenbestimmung des HCV ungenau (Filtration) bzw. ohne befriedigendes Ergebnis (EM) blieben, galt es in dieser Arbeit einen alternativen methodischen Zugang zu wählen. Die für die Separation von Viren schon fast in Vergessenheit geratene Gel-Ausschlußchromatographie (GEC) konnte unter Verknüpfung mit zwei modernen Verfahren neue Möglichkeiten eröffnen:

- Es konnten Größendaten von Viren zur Kalibrierung aus der früher nicht zur Verfügung stehenden CryoEM herangezogen werden
- Die Quantifizierung der Viren nach GEC wurde durch die Möglichkeit einer real-time PCR Methode mit großem linearem Meßbereich erheblich präzisiert.

Eine methodische Schwachstelle der GEC, die es im Rahmen dieser Arbeit zu überwinden galt, ist die objektive Bestimmung des Signalmaximums (K_{av}), wenn das Meßverfahren eine große Streubreite aufweist. Zur objektiveren Auswertung wurde ein mathematisches Verteilungsmodell entworfen.

4.1. Die Beschreibung der GEC im Verteilungsmodell

Bei Verwendung einer Methode zur Virusquantifizierung, die einen großen linearen Meßbereich besitzt (Real-time PCR), ist es evident, daß das erzeugte Elutionsprofil der Nukleinsäurehaltigen Viruspartikel der tatsächlichen Verteilung eher entspricht als Meßdaten, die Sättigungsbereiche aufweisen (Hybridisierungen, branched-DNA), nur funktionelle Eigenschaften messen (Infektiositäts-Assays, Plaque-Assays) oder in Form von Verdünnungsreihen nur eingeschränkte quantitative Aussagen zulassen. Dennoch hat auch dieses Verfahren eine größere Ungenauigkeit als rein physikalische Meßverfahren, wie z.B. die UV-Lichtabsorption.

Bisher wurde das Signalmaximum eines Elutionsprofils mittels einer Gauss-Verteilung oder einer manuellen, abschätzenden Iteration bestimmt. Um mögliche Ungenauigkeiten bei der Interpretation der Rohdaten zu vermeiden, wurde das in Kap. 3.2 beschriebene neuartige Verteilungsmodell auf die GEC angewendet. Hierbei konnte nicht nur das Signalmaximum objektiv bestimmt werden, es ergaben sich auch aus den Skalaren der Verteilung neue Parameter, um Eigenschaften der GEC-Trennung wie Heterogenität und Symmetrie zu quantifizieren.

Abb. 39 gibt einen Vergleich der Auswertung gleicher Rohdaten der Kalibrierung mittels Gauss-Verteilung, visuell-subjektiver Iteration durch einen erfahrenen GEC-Anwender und dem in dieser Arbeit dargestellten mathematischen Modell (Weibull-Verteilung, WV).

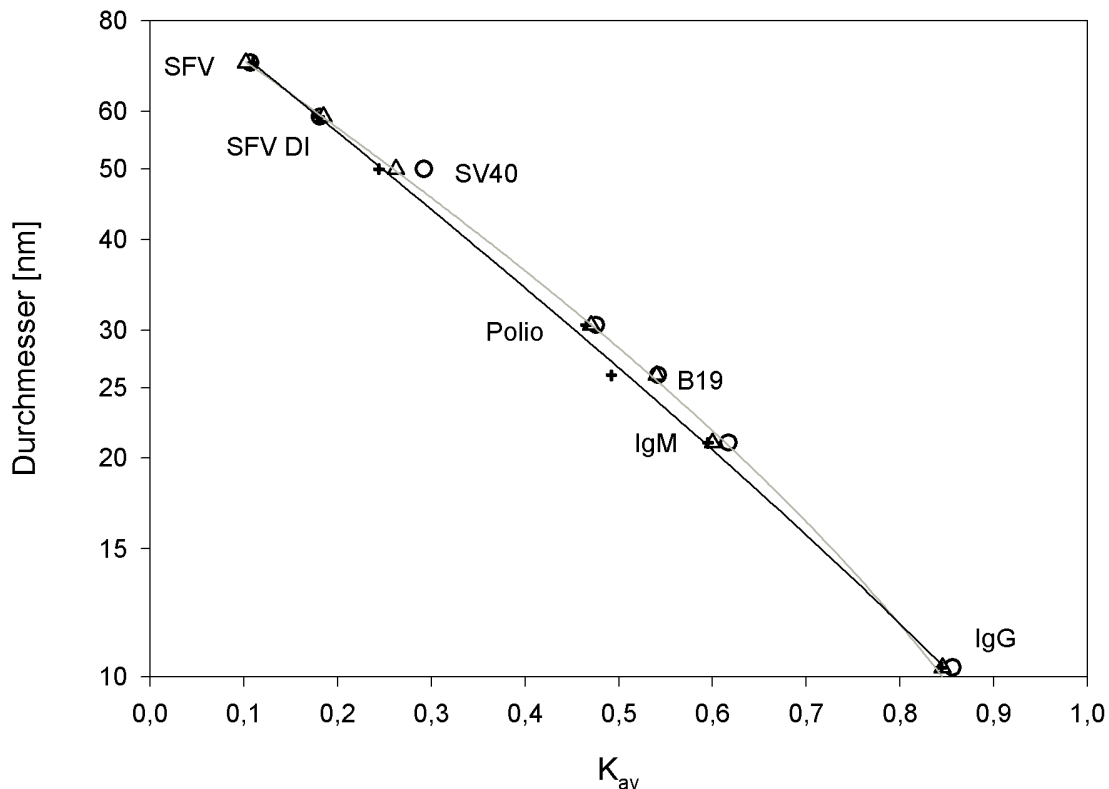


Abbildung 39: Bestimmung der K_{av} -Werte mit drei verschiedenen Methoden:

+ WV, o Gauss Regression, Δ erfahrener GEC-Auswerter („manuell“)

Regressionsfunktion — der Weibull-Werte, — der manuell ermittelten Werte

Bei Ermittlung der exponentiellen Regressionsfunktion $D_s = a_1 + a_2 e^{(-a_3 \times K_{av})}$ für diese Auswertungsarten ergibt sich für die Gauss-Verteilung ein Regressionskoeffizient r^2 von 0,9917, für die subjektive Auswertung 0,9935 und für die WV 0,9988. Die Gaussverteilung zeigt sich damit als ungenaueste Auswertungsmethode, da sie *a priori* als symmetrische Verteilung die normalerweise asymmetrischen Verläufe der GEC nicht hinreichend abbilden kann. Die Asymmetrie wird bei der subjektiven Auswertung partiell berücksichtigt und eine Gewichtung der Fraktionen vorgenommen; sie ist gegenüber der Gauss-Verteilung genauer jedoch auch von der Interpretationsfähigkeit des Auswerter abhängig. Die WV zeigt bei der Kalibrierung die höchste Genauigkeit und erfüllt damit jene Kriterien, die an ein mathematisches Modell im Rahmen dieser Arbeit gestellt wurden. Ein ähnlicher Vorteil der Weibullverteilung gegenüber einer symmetrischen Log-Verteilung konnte bei der Größenbestimmung von artifiziellen Membranvesikeln nach Auswertung mittels „Flow Field-Flow“ Fraktionierung und Multiangle Light Scattering (MLS) gezeigt werden (Korgel et al., 1998).

Die in *Abb. 19* dargestellte Kalibrierung der verwendeten Gelmatrix BioGel A50m, wurde durch die Ermittlung des Elutionsprofils und der Auswertung mittels WV von sieben Eichpartikeln bestimmt. Der Bereich des K_{av} , der noch eine lineare Beziehung zuläßt, stellt sich von 0,05 bis 0,85 dar und entspricht damit dem linearen Bereich, der an vernetzten Dextrangelen (Determann et al., 1966) und Sepharose 6B (Gerlich et al., 1970) bereits für kleinere Partikelgrößen gezeigt wurde.

Eine Berechtigung, die oben angeführte logarithmische Beziehung zwischen D_s und K_{av} zur Ermittlung der Kalibrierung anwenden zu können, ergibt sich aus den physikalischen Modellen nach Laurent und Killander (Laurent et al., 1964) sowie dem Ogston-Verteilungsmodell (Ogston, 1958), die 1988 eine empirische Bestätigung bei der Größenbestimmung von Dextranen mittels Sephadex-Gelen erfahren haben (Poitevin et al., 1988).

Die Güte einer Kalibrierung ergibt sich auch unmittelbar aus der Genauigkeit der für die Eichpartikel angegebenen Größe. Seit ausreichend CryoEM-Abbildungen von Viren veröffentlicht wurden, ist es möglich, diese sehr präzisen Daten von Viruspartikeln für die GEC zu nutzen. Durch die Trennung, Quantifizierung und mathematischen Auswertung von Semliki-Forest-Virus (komplette und inkomplette Partikel), SV40, Poliovirus, Parvovirus B19, IgM und IgG (Größenangabe aus GEC-Untersuchungen vgl. (Andrews, 1970, Gerlich, 1971) wurde die in Abschnitt 3.3.8 dargestellte Beziehung ermittelt.

$$D_s [nm] = (-3,053) + 94,00e^{(-2,310K_{av})}$$

Auf der von uns verwendeten Säulenmatrix ergibt sich aus dieser Beziehung für ein $K_{av} = 1$ eine empirische untere Meßgrenze von 6,2 nm; aus der Regressionsgleichung läßt sich ein theoretischer unterer Wert von ca. 3 nm ($a_1 = 3,053$) ableiten, was der möglichen unteren Grenze der GEC von 2 nm für diese Art von Trenngel bei kritischer Würdigung nahekommt (Gerlich et al., 1970).

Die aus der ermittelten Beziehung gewonnene theoretische Obergrenze bei $K_{av}=0$ ergibt sich zu 91 nm. Da zwei große Partikel (also nahe dem Ausschlußvolumen) eine hinreichend große Differenz der K_{av} -Werte zeigen müssen, um noch als zwei Peaks unterscheidbar zu sein, begrenzten wir diesen oberen Be-

reich auf den linearen Meßbereich bis 0,05, was einer Partikelgröße von 81 nm entspricht. Außerdem macht der Bereich von K_{av} 0 bis 0,05 bereits einen Größenunterschied von 10,2 nm aus, so daß bereits kleinste Fehlbestimmungen des K_{av} einen erheblichen Einfluß auf die Validität der Größenbestimmung haben würde (Gerlich et al., 1970). Partikel, die bei einem $K_{av} < 0,05$ eluieren, werden folglich als >81 nm angegeben.

Alle Größen von Partikeln, die mit dieser Kalibrierung bestimmt wurden, geben strenggenommen nur eine „cryo-elektronenmikroskopische Äquivalenzgröße“ an. Aus der Genauigkeit, mit der die CryoEM-Größen der Eichpartikel der Regressionsgleichung folgen kann geschlossen werden, daß sich die cryoEM-Größen dem Stokes'schen Durchmesser äquivalent verhalten, was die Güte der CryoEM-Daten über einen großen Bereich bestätigt. Ebenfalls konnte durch dieses lineare Verhältnis die äquivalente Bestimmung des Radius durch CryoEM und GEC gezeigt werden.

Eine bedeutsame Entscheidung bei der Auswertung einer GEC ist die Frage, ob eine Trennung „erfolgreich“ war und damit auswertbar ist. Neben der präzisen Bestimmung des K_{av} -Wertes gibt es aus der Chromatographie gewisse Mindestanforderungen an einen Peak, z.B. das Verhältnis von Höhe zu Weite oder eine noch akzeptable Asymmetrie. So ist unmittelbar einsehbar, daß ein Peak, der doppelt so weit wie hoch ist, keine hinreichend genaue Bestimmung des Maximums zuläßt, bzw. eine zu große Weite eine unsaubere Trennung anzeigt. Ähnlich verhält es sich mit Asymmetriephänomenen: ein zu starkes Nachschleppen („Tailing“) der Elution spricht auch für eine inakzeptable Trennung.

Da aus der Weibull-Analyse der Verteilung Parameter für Symmetrie und Weite abgeleitet werden können (s. Absch. 3.2.3 und 3.2.4), ist es nun möglich, numerische Kriterien für die Auswertbarkeit festzulegen. Nach den vorliegenden Daten sollte der Symmetrie-Parameter c 1,02 nicht unter- und 6,0 nicht überschreiten. Hieraus folgt eine minimale Symmetrie von $s > 0,1$. Bei anderen Werten für c ist ein extremes Asymmetrieverhalten beschrieben, das einem natürlichen Elutionsverhalten nicht mehr gerecht wird. Der Parameter b (Weite des Peak) sollte nicht größer als 0,3 sein, da sich bei höheren Werten der Peak extrem flach darstellt, eine sinnvolle Ermittlung des Maximums wäre damit nicht möglich.

Eine Schwäche zeigt die Weibullfunktion bei dem Versuch, den Peak im Ausschluß zu beschreiben: Der mathematische Algorithmus benötigt für eine Regressionsanalyse eine steigende und eine fallende Flanke des Peaks. Gerade die steigende Flanke wird aber im Bereich des Ausschlusses verfälscht: Durch das Prinzip der GEC fluten innerhalb kürzester Zeit alle Partikel gleichzeitig an, die über dem Auflösungsvermögen der Matrix liegen. Dieses Elutionsverhalten kann durch die Weibullregression nicht immer korrekt erfaßt werden; es wird ein Peak errechnet, der von einem extremen Tailing geprägt ist. Dies wird deutlich bei der Auswertung der HCV-Läufe in *Tabelle 4*: Bei der Bestimmung des K_{av} im Bereich von V_0 werden teilweise sogar negative Werte ermittelt, was allein schon aus der Definition des K_{av} her nicht möglich ist. Die schon oben gemachte Einschränkung auf einen Bereich $K_{av} > 0,05$ ist also auch für die Anwendung der WV gültig.

Trotz dieser Einschränkung muß jedoch festgehalten werden, daß die WV ein leicht anwendbares und gegenüber Meßwertstreichungen äußerst inertes Werkzeug ist.

Es kann also festgestellt werden, daß die Anwendung einer Weibull-Verteilung auf hinreichend linear gemessene Elutionsprofile eine wesentliche Steigerung der Genauigkeit sowie der Objektivierbarkeit erlaubt. Darüberhinaus ermöglichen die Skalare c und b , die sich durch Iteration der Rohdaten unmittelbar ergeben, Aussagen über Trennungsgüte, Asymmetrie und Heterogenität einer GEC zu treffen. Prinzipiell könnte dieses Verfahren auf jede chromatographische Verteilung angewendet werden, unabhängig davon, welcher Trennungsmechanismus zugrundeliegt.

4.2. Das Verhalten von HCV-Partikeln in der GEC

4.2.1. Populationsverteilung und Größe des HCV

Zur Quantifizierung von HCV-Partikeln wählten wir die Bestimmung von HCV-RNA, da aufgrund ubiquitärer RNasen (besonders in Serum) freie RNA augenblicklich degradiert würde; im Eluat nachgewiesene HCV-RNA kann daher nur in verpackter Form innerhalb eines Partikels vorliegen.

Nach GEC der humanen HCV-RNA-positiven Seren konnten prinzipiell zwei in ihrem Elutionsverhalten verschiedene Partikelpopulationen beobachtet werden:

eine Population liegt über dem Meßbereich der Säule und erscheint daher bei einem K_{av} von 0 im Ausschlußvolumen V_0 . Einige Seren zeigten zusätzlich oder ausschließlich eine kleinere Population bei einem K_{av} von 0,36 bis 0,38.

4.2.2. HCV-Partikel bei V_0

Die Viruspopulation bei V_0 (bzw. bei einem $K_{av} < 0,05$) besitzt eine Größe von $>81\text{nm}$. Alle untersuchten HCV-Seren A-E zeigen, in unterschiedlicher Ausprägung, einen RNA- bzw. Core-Ag-Peak bei V_0 (vgl. *Tabelle 4*, Absch. 3.4.4); auswertbar nach Weibullanalyse ist diese Population jedoch nur bei Serum C und Serum A.

Das Serum A wurde von einem chronisch infizierten, anti-HCV-positiven Patienten gewonnen; als einziges der untersuchten Seren besitzt es keine weitere Partikelpopulation.

Das Erscheinen von HCV-Partikel $>81\text{nm}$ kann mit zwei Phänomenen interpretiert werden: Zunächst kann das Vorhandensein von Partikeln in V_0 darauf hindeuten, daß die Partikel mit Antikörpern komplexiert sind und/oder durch die Assoziation an Lipoproteinpartikel gemeinsam mit diesen eluieren.

Um die Beladung der Partikel mit Ak zu prüfen, wurden die in Absch. 3.7 dargelegten Immunpräzipitationen durchgeführt. Zur Immunpräzipitation wurde das Serum C verwendet, das einen ausreichend hohen Peak bei V_0 besitzt und gleichzeitig (als verwendete Präzipitationskontrolle) eine Population bei K_{av} 0,36-0,42 aufweist.

Durch Fällungsversuche mit Fraktionen aus V_0 und Fraktionen der kleineren Partikel konnte klar gezeigt werden, daß die Partikel im Ausschluß mit anti-human-IgG fast vollständig fällbar waren (79-98%), während in der parallelen Fällung der kleinen Partikel nur ein minimales Signal (0,2-5%) vorhanden war (vgl. *Tab. 7*). Dieses minimale Signal ist unter Berücksichtigung der methodischen Anfälligkeit einer Immunpräzipitation und der Empfindlichkeit des RNA-Nachweises als Nullsignal zu interpretieren. Bei Fällung des reinen Serums A mit anti-Kaninchen-IgG als Negativkontrolle ergaben sich vergleichbare unspezifische Signale unter 5%.

Hieraus ist also zu folgern, daß die Fraktionen in V_0 Ak-beladene HCV-Partikel darstellen, während die Fraktionen ab K_{av} 0,36 als IgG-freie Viruspartikel anzusprechen sind.

Die Fällung von HCV-Partikeln mit anti-human-IgG aus hochtitrigen Peakfraktionen des Serums A erbrachte eine Präzipitationsrate von 21 bzw. 55%. Neben der Möglichkeit einer methodischen Schwäche bei der Präzipitation ist hier die Assoziation mit Lipoproteinen zu diskutieren. Bereits 1992 konnte R. Thomssen eine Assoziation von HCV an β -Lipoproteine in humanem Serum zeigen (Thomssen et al., 1992), die gemeinsam mit der Bindung von Immunglobulinen Grund für die heterogene Dichteverteilung von HCV-Partikeln darstellt (Thomssen et al., 1993). Auch Thomssen und Mitarbeiter beobachteten bei mehreren Seren sehr unterschiedliche Fällungsergebnisse bei der Präzipitation mit polyklonalen anti- β -Lipoproteine-IgG. Im Falle unserer Präzipitation der HCV-Partikel aus V_0 des Serums A, ist die Fällung von max. 55% mit einer weiteren Bindung der HCV-Partikel an Lipoproteine im Sinne der Ergebnisse von Thomssen zu deuten; eine solche Assoziation von Partikeln an Lipoproteine würde eine Beladung des HCV mit Ak überlagern und präzipitierbare Epitope überdecken.

Daß die Bildung von Komplexen aus kompletten Viren und Lipoproteinen bei der Entstehung verschiedener Größenpopulationen von Bedeutung ist, wurde von anderen Autoren bestätigt: Eine Genotyp-abhängige Bindung an verschiedene Lipoproteinklassen wurde bereits beschrieben (Kono et al., 2003), ebenso konnte gezeigt werden, daß die Viruslast im Serum durch eine Entfernung von Lipoproteinen aus dem Serum gesenkt werden kann (Schettler et al., 2001). In diesen Arbeiten wurde jeweils nur eine RT-PCR zum Partikelnachweis in der Präzipitation verwendet, so daß nur über Viruspartikel, nicht jedoch über die HCV-Antigen-Verteilung Aussagen zu treffen waren.

In den V_0 -Fraktionen der Seren D und E wird der (im Verhältnis zum Hauptpeak der freien Partikel) sehr kleine Peak der gebundenen Partikel fast nur durch das Signal des Core-Antigens definiert. Vergegenwärtigt man sich einen gewissen Zerfall von HCV-Partikeln im Serum (z.B. durch Lagerung, Auftauen), so kann davon ausgegangen werden, daß diese Peaks durch Assoziation von freigesetztem Core-Ag an Lipoproteine entstehen könnten. Für diese Möglichkeit spricht auch die stark lipophile Eigenschaft des Core-Proteins, die auch bei der Einlagerung von Core in lipidhaltige Kompartimente innerhalb von Hepatozyten *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden konnte (Hope et al., 2000, McLauchlan et al., 2002).

4.2.3. Freie HCV-Partikel

Hauptziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Größe des HCV in seiner nativen Form. Daher sind die Viruspopulationen in V_0 zur Beantwortung dieser Frage ungeeignet.

Ein zu lösendes Problem bei der Analyse der freien Partikel war, Serumproben zu finden, die diese freien Partikel überhaupt enthielten; darüberhinaus mußten diese freien Partikel in einem hinreichend hohen Titer vorliegen, um ein auswertbares Signal im Eluat zu liefern. Die Konstellation anti-HCV-negativ und HCV-RNA hochtitrig ($>1 \cdot 10^6$ IU/mL) ist jedoch nur in Ausnahmefällen zu erwarten.

Diese Konstellation, die zur Analyse freier Partikel mittels GEC Voraussetzung ist, ist bei zwei Patientenkollektiven zu erwarten: bei hochtitrigen, frisch Infizierten, die noch keine ausreichenden Ak-Konzentrationen gebildet haben sowie bei Patienten, die bei bestehender HCV-Infektion einer Immunsuppression zugeführt wurden. Bei Screening nach frisch HCV-Infizierten in einem Kollektiv von 82 Blutplasmen, die aufgrund erhöhter Serum-ALT zur Transfusion gesperrt waren (Blutspendedienst des ÖRK, Linz, Österreich), konnten verwertbare Proben nicht gefunden werden.

Das Serum B entstammt einem Spender mit erhöhter ALT und Anti-HCV, durch dessen Thrombozytenspende 8 Wochen zuvor eine HCV-Übertragung verursacht wurde (Busch et al., 2003, Schüttler et al., 2000). Im Serum B fanden sich neben viel Ak-gebundenen auch freies HCV, dieses jedoch leider mit einem geringen Maximalpeak bei ca. $4 \cdot 10^4$ IU/mL (bzw. 1,5 pg Core-Ag), was eine verlässliche Bestimmung des K_{av} der freien Partikel unmöglich machte. Das Serum C repräsentiert ebenfalls ein frühes Stadium der HCV-Infektion, das bei einer Blutspende auffiel. Hier ist die Fraktion der freien Partikel bei einem Maximalpeak von ca. $4 \cdot 10^4$ IU/mL (höchster Peak bei V_0 $2 \cdot 10^5$ IU/mL) zwar homogener als bei Serum B, jedoch wiederum zu flach, als daß man ein klares Maximum ermitteln könnte. Angedeutet ist lediglich ein Peak des Core-Ag bei K_{av} 0,356. Trotz der großen Meßwertschwankungen kann das Elutionsprofil und die Anwesenheit von freiem HCV bei Serum B und C (im Gegensatz zur chronischen Infektion bei Serum A) als Beispiele der Populationsverteilung in einem frühen Stadium einer HCV-Infektion angesehen werden, wo noch nicht alle HCV-Partikel durch Antikörper komplexiert sind.

Eine deutlichere Ausprägung der freien Partikel bei einem anti-HCV-negativen Patienten konnte bei Serum D gefunden werden, wobei hier fast keine Population von gebundenen Viren vorhanden ist. Dadurch zeigte sich der auswertbare Peak bei einem max. Signal von $7 \cdot 10^4$ IU/mL relativ schmal, was die Bestimmung des K_{av} zu 0,365 ermöglichte.

Die zweite mögliche Quelle für Seren mit überwiegend freien Viruspartikeln war bei Patienten zu erwarten, die eine ungenügende Ak-Produktion aufweisen. Dies ist in der Regel nur bei Patienten unter iatrogenen Immunsuppression zu erwarten. HIV-positive Seren waren hierbei aus Sicherheitserwägungen für die GEC auszuschließen.

Beispiele für eine Immunsuppression bei bestehender HCV-Infektion sind die Seren E und F. Serum E repräsentiert hierbei den sehr seltenen Fall einer HCV-Infektion unter Chemotherapie bei Leukämie, so daß die Immunsuppression die zelluläre und humorale Abwehr gleichermaßen betrifft. Das Serum E ist mit einem max. RNA-Peak von $3,2 \cdot 10^6$ IU/mL in der GEC auch hinreichend auswertbar. Das K_{av} des RNA-Peaks wurde zu 0,382 ermittelt.

Bei dem Serum F handelt es sich um einen chronisch HCV-infizierten Patienten, der seit einer Nierentransplantation unter Langzeit-Immunsuppression steht. Dieses Serum unterscheidet sich von allen anderen dadurch, daß es bereits 3 h nach der Blutabnahme auf die GEC-Matrix aufgetragen wurde. Es sind also keine Artefakte durch Einfrieren und Auftauen zu erwarten gewesen. Da die Fraktionen zur elektronenmikroskopischen Auswertung genutzt wurden, ist die Fraktionsgröße aus präparativen Gründen vergleichsweise groß (2,05 mL). Die K_{av} -Werte und die damit bestimmbaren Größen der freien Partikel, die nach den oben dargestellten Kriterien auswertbar waren, sind also D: 0,365 (37,5 nm) und E: 0,382 (35,7 nm).

In dieser Gruppe erscheint die Größe des HCV bei Serum E mit 35,7 nm als sehr klein. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts des Core-Proteins mittels Westernblot aus Fraktionen vor, nach und im Hauptpeak (Absch. 3.6) fand sich in diesem Serum überraschenderweise ein niedrigeres Molekulargewicht von ca. 17 kDa, in einem Kontrollserum die erwarteten 21 kDa. Bei weiteren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Dissertation B. Tkaczick), die sich mit der Verteilung der Populationen im Dichtegradienten befassen, fiel dieses Serum zusätzlich durch seine höhere Dichte (1,14 g/mL) gegenüber dem Se-

rum F (1,09 g/mL) und weiteren Seren chronisch infizierter Patienten auf. Es könnte sich hier um ein außergewöhnliches Phänomen bei hoher Replikationsrate und gleichzeitiger kompletter Immunsuppression handeln.

Unter der Verwendung der Elutionsprofile der HCV-RNA ergibt die Weibull-Verteilung für die Seren D und E einen Stokes'schen Durchmesser von 37,5, bzw. 35,7 nm, im Mittel also 36,6 nm. Bei Berücksichtigung der maximalen Schwankungsbreite von 2,2% bei der Bestimmung des Elutionsvolumens sollte dieser Wert eine Standardabweichung von ca. 2 nm aufweisen. Gestützt wird diese Folgerung durch die Elutionsprofile des HCV-Core-Ag in den Seren C,E und F wo jeweils ein Peak bei 37 nm gefunden wurde.

4.3. Bisherige Bestimmungen der HCV-Partikelgröße

Zur Bestimmung der Größe des HCV wurden in der Vergangenheit die verschiedensten Anstrengungen unternommen. He bestimmte die Größe durch Filtration und wies das Virus durch Infektionsversuchen an Schimpansen nach (He et al., 1987). Yuasa und Burnouf führten Filtrationsexperimente durch und wiesen das Virus mittels PCR nach (Burnouf et al., 2003, Yuasa et al., 1991). De Vos und Kaito benutzten die ImmunEM mit Ak gegen unterschiedliche Epitope des E-Protein (De Vos et al., 2002, Kaito et al., 1994). Bei Anwendung der GEC auf HCV Seren durch Jursch kam die nested-PCR zum Einsatz (Jursch, 2000). Die unterschiedlichen Größenbereiche sind in *Abb. 40* vergleichend gegenüber gestellt.

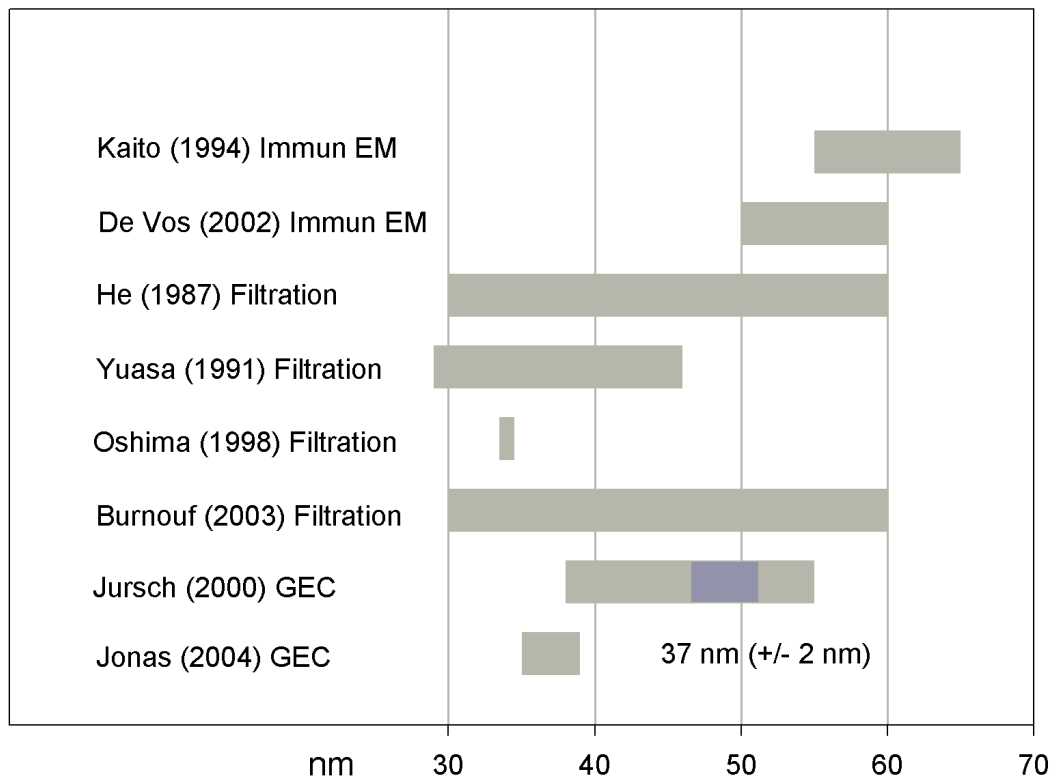


Abbildung 40: Vergleich der bisher angegebenen Größe für HCV mit den Ergebnis dieser Arbeit. Der unterlegte Bereich bei Jursch bezeichnet den von ihm angegebenen Überlappungsbereich mehrerer HCV Seren.

Die vorliegenden Ergebnisse sind also mit den bisher durch Filtration Größenbereichen von HCV vereinbar, stellen jedoch eine wesentliche Präzisierung dar. Diskrepanz sind die Größenangaben der beiden Arbeiten, die mittels ImmunEM die Größe des HCV zu ermitteln suchten. Dies könnte jedoch an den bereits in der Einleitung beschriebenen möglichen Artefakten bei der Aufarbeitung der Präparate zur EM – insbesondere der Markierung mit Antikörpern – gelegen haben. In den erwähnten Arbeiten werden die bekannten EM-Präparationsartefakte jedoch nicht diskutiert. Ein Abplattungseffekt im dehydrierten Präparatzustand konnte in gleicher Weise auch bei BVDV beobachtet werden (s.u.), was aufgrund einer möglichen ähnlichen Morphologie auch bei HCV zu erwarten sein müßte. Die durch Negativkontrastierung im EM zu groß dargestellten mutmaßlichen HCV Partikel würden unsere Messung von virusähnlichen Partikeln im EM aus Serum F (55-60nm) und damit diesen Abplattungseffekt bei HCV nahe legen. Den Beweis, daß es sich hierbei wirklich um native HCV-Partikel handelt, konnten wir letztendlich jedoch nicht führen.

Erwähnenswert ist im Zusammenhang mit der Größenbestimmung des HCV noch die Arbeit der Gruppe um Oshima (Oshima et al., 1998): Mittels eines dreilagigen Carbonatfilters untersuchte er den Abfall der Viruskonzentrationen verschiedener Viren durch Ultrafiltration bei ca. 3 bar. Über einen Reduktionsquotienten, für den er einen logarithmischen Zusammenhang mit der Partikelgröße postulierte, bestimmte er daraufhin die Größe von HCV auf 34 nm. Die Angabe dieser Größe ohne eine sinnvolle Fehlerbreite sowie die Messung von HCV aus einer einzigen nicht näher spezifizierten Quelle und der unbewiesene Zusammenhang von Reduktionsquotient und Partikelgröße, schränkt den Wert der Arbeit erheblich ein. Allerdings benutzte er zur Kalibrierung seiner Methode anscheinend keine CryoEM-Daten. Verwendet man die mittels CryoEM bestimmten Durchmesser in Verbindung mit den von ihm ermittelten Reduktionsquotienten, so erhöht sich der Durchmesser von HCV bereits auf fast 37 nm, was von uns nach den Rohdaten aus der Publikation abgeleitet wurde. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Auswahl geeigneter Kalibrierungspunkte bei der indirekten Größenbestimmung.

Eine weitere Publikation (Maillard et al., 2001) beschäftigte sich mit der Größenbestimmung von HCV-Populationen mittels EM und kommt zur Darstellung von partikulären Strukturen mit einem Durchmesser von 38-43 oder 54-62 nm, die jedoch als nackte Corepartikel des HCV angesprochen werden. Gewonnen wurden sie aus Serum, das mit Detergens (Tween 80) behandelt wurde bzw. aus Serum mittels anti-Core Affinitätschromatographie. Insgesamt sind die Daten jedoch nicht stimmig, da die angegebenen Dichten bei genauer Betrachtung nicht der postulierten Morphologie entsprechen: so muß man für intakte Partikel mit Hülle eine Dichte zwischen 1,1 und 1,22 g/mL erwarten, für nackte Partikel jedoch >1,3 g/mL, was aus den vorgelegten Daten so nicht hervorgeht.

Selbst eine Markierung von partikulären Strukturen mit Gold-konjugierten Ak in der Immun-EM ist kein hinreichender Beweis für die Spezifität der Partikel. Aus den oben angeführten Gründen kann sich auch freies Core-Ag in Lipoproteine einlagern, die unter dem EM sehr stark den veröffentlichten amorphen VLPs (virus-like particles) ähneln und einen breiten Größenbereich (ca. 30-200nm) umfassen. Die Lösung des Problems liegt unserer Meinung in der Serumprobe selbst, da eine hinreichende Spezifizierung meist unterbleibt oder die meisten Partikel Ak-gebunden vorliegen. Die nach langem Suchen gefunden Serumpro-

ben D und E stellen daher eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg der vorliegenden Arbeit dar. Trotz erheblich gesteigerter Präzision gegenüber bisherigen Publikationen zur Größenbestimmung des HCV bleibt eine gewisse Schwankungsbreite, die nicht nur ausschließlich mit einer verbleibenden Meßungenauigkeit bei der Bestimmung des Elutionsvolumens erklärt werden kann. Prinzipiell spiegelt bei einem behüllten Virus *in vivo* eine präzise Größenangabe nicht tatsächlich vorliegende Heterogenitäten wider. Diese Heterogenitäten, innerhalb einer Serumprobe wie auch zwischen verschiedenen Seren, konnten für das HCV gezeigt werden.

Überraschend ist die relativ große Divergenz zu den Ergebnissen von C. Jursch, der 47 bis 51 nm als hydrodynamisch wirksamen Durchmesser für das HCV angab (Jursch, 2000). Allerdings fand Jursch auch BVDV mit 51-55 nm ca. 5 nm größer als die Ergebnisse in dieser Arbeit (48 nm, s.u.). Erklärt werden könnte diese Diskrepanz durch die unsichere Festlegung des Elutionsvolumens mittels konventioneller PCR und der nachfolgenden visuellen Bewertung der mit Ethidiumbromid gefärbten Amplifikatbanden. Angesichts der breiten Verteilung der HCV-Partikel auch in der vorliegenden Arbeit erscheint es plausibel, daß es hier zu Fehlbewertungen gekommen ist. Weiterhin gab es noch nicht so viele durch das CryoEM analysierte Eichpartikel, so daß C. Jursch zum Teil mit Korrekturfaktoren gearbeitet hat, welche offensichtlich zu einer gewissen Überschätzung der Teilchengröße geführt haben. Zu beachten ist schließlich noch, daß Jursch für seine Untersuchungen das 1% Agarosegel A150M verwendet hat, während in dieser Arbeit A50M verwendet wurde.

4.4. Divergentes Verhalten von RNA und Core

In den Fraktionen der GEC-Läufe der Seren D, E und F wurde neben der HCV-RNA auch das Core-Ag mittels ELISA bestimmt. Für eine homogene Population von intakten Partikeln müßte man das gleichzeitige Vorhandensein von viralem Genom und Virus-Antigen fordern. Dies ist bei der Population, die wir als freie HCV-Partikel angesprochen haben, auch der Fall. Auffällig ist jedoch, daß die Verteilung der Peaks und deren Maxima für RNA und Core-Ag bei den Seren C und D jeweils gleichförmig derart inkongruent sind, daß es zu einem späteren Elutionsmaximum bei der Verteilung des Core-Antigens kommt.

Dieser Befund ist überraschend, würde dies doch implizieren, daß es neben den vollständigen Partikeln auch solche gibt, die keine HCV-RNA enthielten, bzw. keine bezüglich des zur Amplifikation gewählten Abschnittes (5'-NCR) vollständigen Genome. Partikel mit diesen Eigenschaften würde man als sog. subvirale Partikel bezeichnen.

Subvirale Partikel sind in verschiedenen Publikationen unterschiedlich – auch abhängig vom Virus – definiert worden. Allen Definitionen gemeinsam ist jedoch, daß das subvirale Partikel nicht alle Merkmale des kompletten Virus aufweist. So kann das Fehlen der Lipidhülle oder des gesamten oder eines Teils des Genoms das subvirale Partikel vom Virus unterscheiden. Beim HBV ist dies beispielsweise das DNA-freie HBs-Partikel oder das hüllenlose Core-Capsid. Beim SFV ist das defekte – und somit subvirale – Partikel durch das Fehlen von Genomabschnitten und des Zusammenbaus des Capsids aus kleineren Capsomeren gekennzeichnet was sich auf Größe und Pathogenität des Virus auswirkt. Ob diese subviralen Partikel eine Funktion in der Pathogenese der Infektion im Sinne einer Ablenkung des Immunsystems haben oder einfach „Fehlproduktionen“ sind, ist nicht immer eindeutig erkennbar, aber oft der Fall.

Für das HCV sind derzeit noch keine subviralen Partikel beschrieben worden. Nach den vorliegenden Untersuchungen der Seren A-F scheint HCV auch kein unbehülltes Core-Partikel wie beispielsweise HBV auszubilden. Gleichwohl fällt auf, daß der RNA-Peak nicht eindeutig mit dem Core-Peak zur Deckung kommt. Es ist daher aus den Elutionsprofilen in der GEC abzuleiten, daß sich neben den RNA-haltigen Partikeln eine weitere, fast gleichgroße Population im Serum befindet, die keine RNA enthält.

Ein Hinweis darauf, ob das HCV subvirale Partikel generiert, ist nicht nur aus dem inkongruenten Verhalten von RNA und Core-Ag bei der GEC zu entnehmen. Eine weitere von uns abgeleitete Kenngröße ist das Verhältnis von RNA zu Core-Ag. Dieses ist schon beim Vergleich zwischen verschiedenen Seren ohne vorherige Trennung aus nicht näher geklärten Gründen durch eine große Schwankung charakterisiert (Bouvier-Alias et al., 2002, Schüttler et al., 2004). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß das Verhältnis von HCV RNA zu Core-Ag nicht nur zwischen verschiedenen Patientenproben inkonstant ist, sondern auch unter einer Interferon-Therapie in den ersten 48 Stunden nach erster Gabe einer regelmäßigen Verkleinerung auf etwa ein Drittel des Aus-

gangsverhältnisses abfällt (Thomas, 2004). (Tabelle 5, Absch. 3.4.5) Dies stützt die Annahme, daß zusätzlich zu den kompletten Viren abhängig vom Replikationsstatus Core-Ag produziert oder akkumuliert wird.

Durch die größenabhängige Trennung der Partikelpopulationen konnte nun ergänzend gezeigt werden, daß dieses Core-Ag in partikulärer Gestalt vorliegt.

Wegen der Position der verwendeten Primer im 5'-NCR des HCV-Genomes wäre es aber auch möglich, daß bei der Verpackung Partikel produziert werden, in denen das 5'-Ende des Genoms nicht komplett enthalten wäre. Aufgrund der Replikation einer plus-strängigen RNA über ein minus-strängiges Intermediat, würde man jedoch eher fehlende Abschnitte in Richtung des 3'-Endes erwarten.

Unter der Annahme, daß bei einer T4-Symmetrie 240 (180 bei T3) Capsomere ein mögliches Capsid bilden, würde man für ein Core-Protein von 20 kD ein Gewicht von $8 \cdot 10^{-18}$ ($6 \cdot 10^{-18}$) g/Capsid erwarten. Dies hätte schließlich 125.000 (168.000) Partikel pro pg Core-Protein zur Folge. Unter der weiteren Annahme, daß 1 IU HCV-RNA 3 HCV-Genomen entspräche würde das bei verschiedenen Patientenserum ermittelte RNA/Core-Verhältnis von 7900 IU/pg bedeuten, daß lediglich 19% (14%) des Core-Proteins RNA-assoziiert vorliegt (Schüttler et al., 2004).

Betrachtet man mit einer entsprechenden stöchiometrischen Rechnung der RNA/Core-Verhältnisse die GEC-Fractionen von Serum E, so erscheint das Bild gänzlich differenzierter: Erhält man in den Ausschlußfraktionen ein mittleres Verhältnis von 12.990 IU/pg (vgl. Tab. 5) so ist dies in den Fraktionen der freien Partikel 68.889 IU/pg, was der stöchiometrisch erwarteten Partikelmenge pro pg Coreprotein wesentlich näher kommt. Die relativ bessere Übereinstimmung von stöchiometrisch erwartetem und gemessenem Verhältnis in den Fraktionen der freien Partikel, untermauert die Anwesenheit kompletter HCV-Partikel in diesen Fraktionen.

Das in der GEC gezeigte Vorhandensein großer Mengen an Core-Ag haltigen jedoch mutmaßlich RNA-freien Partikeln würde zum einen die überraschend große Sensitivität des Core-Ag-Assays bei der klinischen Anwendung erklären (Nachweis des sog. Ag-Überschusses) zum anderen jedoch bedeuten, daß der Nachweis des Core-Ag kein direkter Marker für die Viruslast darstellen kann. Auch Aussagen über die Zahl von infektiösen Partikeln verbieten sich daher von selbst.

4.5. Core-Protein oder Matrix-Protein?

Betrachtet man den Befund der Partikelheterogenität des HCV vor dem Hintergrund, daß die Isolation von hüllenlosen, RNA-haltigen Core-Partikeln auch nach Anwendung verschiedenster Methoden nicht gelingt, mithin die Zerstörung der Hülle der Auflösung der gesamten Partikelmorphologie gleichkommt, kann von der Existenz eines gleichförmigen, stabilen Capsids bei HCV nicht ausgegangen werden.

Ein *in vitro* Assembly von Core-Partikeln mithilfe transfizierter eukaryoter oder prokaryotischer Zellen oder mittels gereinigtem rekombinantem Core-Ag ist bislang nicht glaubhaft geglückt. Genausowenig gelang eine akzeptable elektronenoptische Darstellung des vermuteten Capsids. So wird bei der Expression von HCV-Core-Protein im bakteriellen System von einem RNA-abhängigen Self-Assembly berichtet (Kunkel et al., 2001), das zu durchschnittlich 60nm großen Capsiden („Nucleocapsid-like Particles“) mit einer Streuung von 20 bis 110 nm (teilweise >400 nm) führen soll; die Dichten dieser Partikel wurde nicht angegeben. Bezüglich der möglichen Größe eines angenommenen Capsids eines Flavivirus erscheinen diese Befunde nicht relevant. Ebenso sind Berichte über den Nachweis von VLPs in Lebergewebe kritisch zu sehen, die behüllte Viren mit Größen zwischen 30 und 65 nm in Cytoplasma nachgewiesen haben wollen (Falcon et al., 2003), und ebenso unbehüllte Strukturen von 30 nm Größe identifiziert haben wollen.

Die Existenz des Kerncapsids wurde seit der ersten Klonierung des Gesamtgenoms lediglich aus dem Vorhandensein Arginin-reicher Domänen zur RNA-Bindung und aus der genetischen Nähe zu den Pestiviren geschlossen, die ein solches Capsid ausbilden. Nach der Größenbestimmung des gesamten HCV-Virion lag es also nahe, zu versuchen, das Capsid freizulegen und auch dessen Größe zu bestimmen.

Bei allen unseren Versuchen die Lipidhülle zu entfernen, konnte keine virale RNA mehr nachgewiesen werden. Dies könnte daran gelegen haben, daß mit dem Lösen der Lipidmembran auch das Core aufgebrochen worden wäre, wonach die im Serum befindlichen RNAsen die RNA degradiert hätten. Thomssen hat ähnliche Experimente an nativen Seren durchgeführt. Auch er wies einen starken Abfall der Viruskonzentration nach und legte die Vermutung nahe, daß

die Stabilität des Core von einem intakten Envelope abhängt (Thomssen et al., 2002).

Diese Befunde im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Größenbestimmung führten uns zu der Vermutung, daß der Aminoterminus des HCV-Polyproteins ein Nukleoprotein generiert, daß auch Eigenschaften eines ein Matrixproteins hat. Würde daher die Gestalt des HCV nicht durch ein stets gleich großes Capsid bestimmt, sondern seine Größe von der Verpackung der RNA in ein Nukleo-Matrixprotein und eine Hülle bestimmt werden, erklärte dies eine stets vorhandene Inhomogenität bezüglich Größe und Dichte der Partikel. Auch die Schwierigkeit mehrerer Arbeitsgruppen, elektronenmikroskopisch homogene, und eindeutig mit Virus-typischen Merkmalen versehene Partikel darzustellen, stützt die Annahme des Fehlens eines Capsids bei HCV ebenso wie die Inkonstanz des RNA/Core-Ag-Verhältnisses.

Maillard beschrieb, daß er mit gegen das Coreprotein gerichteten Ak in der Lage war, natives HCV an einem Grid zu binden. Er folgerte daraus, daß er damit das vermutete subvirale Partikel isolieren konnte (Maillard et al., 2001). Andererseits gibt es bei der Analyse der Primärstruktur des Coreproteins Hinweise für transmembranäre Anteile (Schüttler, 2001), so daß ein entsprechender Ak auch an ein Coreprotein binden könnte, das in einer intakten Lipidhülle eingebettet wäre. Ob ein solchermaßen eingebettetes Core allerdings in der Lage wäre, eine Capsidstruktur auszubilden, ist nicht bekannt. Dagegen konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, daß es Interaktionen zwischen dem Core-Protein und E1 gibt (Lo et al., 1996). Bei dem HCV-verwandten GBV-C ist überhaupt keine Core-Proteinsequenz bekannt.

Zusammengenommen könnte dies also bedeuten, daß es sich bei dem sogenannten Coreprotein vielmehr um ein in die Lipidhülle eingelagertes Matrixprotein mit Eigenschaften zur RNA-Bindung handelt, das kein festes Capsid ausbildet, sondern lediglich die Innenseite der Lipidhülle auskleidet oder lose an die RNA gebunden zwischen Hülle und RNA vermittelt.

4.6. Elektronenmikroskopische Darstellung von HCV-Partikeln

Wie bereits dargestellt, bereitet die eindeutige Identifizierung von HCV-Partikeln mittels EM erhebliche Schwierigkeiten. Dies liegt nicht nur an relativ niedrigen Virustitern (z.B. im Vergleich zu Parvovirus B19) sondern auch am Fehlen einer

eindeutigen viralen Morphologie aller bislang als HCV vermuteten Partikel. Selbst Darstellungen in der Immun-EM lassen Zweifel zu, da runde amorphe Partikel, die Core-Ag positiv sind, auch Lipoproteine mit eingelagertem Core-Ag sein können. So variiert die Güte und Größe der publizierten VLPs in der EM bei biopsierten Hepatozyten zwischen 50-60 nm (De Vos et al., 2002) und 30-65 nm (Falcon et al., 2003). Im Serum zeigen sich nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden sehr vereinzelt VLPs, die vermutetermaßen mit HCV in Verbindung gebracht werden zwischen 55-65 nm (ein einzelnes Partikel abgebildet; (Kaito et al., 1994), 25-35 nm (nach Butanol-Behandlung von LDL-Fractionen; (Andre et al., 2002) oder 38-43 bzw. 54-62 (nach Affinitäts-Chromatographie und CsCl-Gradient; (Maillard et al., 2001). Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, so kann man im Größenbereich von 25-65 nahezu beliebige Größen annehmen. Wesentliche Kritikpunkte an diesen Darstellungen, weshalb sie in der wissenschaftlichen Welt keine große Akzeptanz erfuhren, sind das Vorhandensein von nur vereinzelt amorphen Partikeln, eine nicht klar definierte Vorbehandlung mit Detergenzien oder die fehlende Erklärung für eine dargestellte Größenstreuung (nackte Core-Partikel, ganze Virionen, Ak-Bindung).

Bei unserem Versuch, HCV-Partikel im EM darzustellen war ausschlaggebend, daß uns im Vergleich zu allen anderen publizierten Quellen, frisches Patientenserum zur Verfügung stand, daß einen nachgewiesenen Anteil freier Partikel aufwies. Die rasche Aufreinigung mittels GEC erhöhte ebenfalls die Chance, tatsächlich HCV-Partikel darzustellen. Um die Aufreinigungsbedingungen zu kontrollieren, wurden parallel aus einigen Eichviren ebenfalls EM-Präparate angefertigt.

Bei GEC-Fractionen aus dem Bereich von V_0 waren nahezu keine Partikel zu sehen, die man noch als virusähnlich bezeichnen könnte. Im Bereich des maximalen Peaks konnten einige Partikel dargestellt werden, die jedoch nicht in der Menge und Homogenität vorliegen, wie man das von einer erfolgreichen Präparation erwarten würde und wie es auch mit den Eichpartikeln gelungen ist. Da die Präparation jedoch aus GEC-Fractionen geschah, in denen nachgewiesenermaßen HCV vorhanden war und durch die UZ von einer Aufkonzentrierung auszugehen ist, wird im folgenden dennoch auf diese Partikel eingegangen:

Die Partikel zeigten Größen bei 30 nm (subviral?) und überwiegend 55 nm. Da die 55 nm Partikel bei Fractionen entsprechend 40 nm isoliert wurden, ist von

einem artifiziellen Abplattungseffekt durch die EM-Präparation auszugehen. Obwohl der Beweis für das tatsächliche Vorliegen von HCV-Virionen nicht erbracht werden kann, so ist doch bemerkenswert, daß bei maximaler Vergrößerung die Partikel regelmäßige Oberflächenstrukturen erkennen lassen, die man als virustypische Valley-Formationen interpretieren könnte. Vergleicht man den Winkel dieser „Valleys“ bzw. ihre sichtbare Anzahl (18 Grad, bzw. 20 radiäre Valleys in der Aufsicht) auf der Darstellung im EM mit jenen bei Flaviviren durch CryoEM ermittelten (18-22,5 Grad bzw. 16-20 sichtbare Spikes je nach Perspektive; Zhang et al., 2003), so spricht auch die Verteilung dieser Strukturen für eine mögliche virale Morphologie.

Insgesamt sind in der Literatur kaum EM-Bilder von Flaviviridae veröffentlicht, ihre Präparation, zumindest aus infizierten Menschen oder Tieren als *ex vivo*-Partikel, bereitet offenbar prinzipiell Schwierigkeiten. Bei dem Pestivirus BVDV, das in Zellkulturen relativ leicht in hohen Titern anzuzüchten ist, zeigen sich in der EM-Darstellung ca. 60 nm große, relativ strukturlose unregelmäßige Partikel (EM-Aufnahme von M. König in Heinz et al., 2000). Dies zeigt sich auch bei BVDV- und CSFV-Partikeln (55-60nm) in infizierten Zellen (Weiland et al., 1999).

Erst kürzlich wurden umfangreichere CryoEM-Untersuchungen an Flaviviren durchgeführt. Bei reifen Denguevirus-Partikeln konnte ein Durchmesser von 42nm bestimmt werden (Kuhn et al., 2002), während eine andere Arbeitsgruppe reife und unreife (preM-Partikel) Denguevirus- und YFV-Partikel mittels CryoEM jeweils zu 50 bzw. 60 nm bestimmte (Zhang et al., 2003). Obwohl bei beiden ein Capsid abgrenzbar war, das über Brücken mit der Hülle verknüpft erschien, ist doch die Größe nicht von einer festen Corestruktur abhängig. Da bei beiden Arbeitsgruppen dieses Capsid nicht für sich alleine (also ohne Hülle) darstellbar war, kamen Zhang et al. zu der Vermutung, daß die Größe von Flaviviren von der Größe des verpackten Genoms abhängt, diese Core-Protein-Verpackung wiederum die Größe der umgebenden Virushülle bestimmt. Ein solches Phänomen ist seit längerem vom alfalfa-Mosaik-Virus (Fam. Bromoviridae, Genus Alfamovirus; segmentierte +ssRNA) bekannt, dessen drei mögliche Capsidgrößen von den drei unterschiedlich verpackten ssRNA-Segmenten abhängt (Hull, 1970).

So können wir also unsere im EM dargestellten VLPs von 55nm mit der GEC-Größe von ca. 40 nm in Einklang bringen, da die CryoEM-Aufnahmen des kom-

pletten reifen Denguevirus-Partikels (42nm) mit jenem aus der konventionellen EM (ca. 50 nm) einer gleichgerichteten scheinbaren Vergrößerung unterliegt. Bezüglich der Existenz von HCV-Partikeln mit inkompletter RNA, müßte man aus den obigen Darlegungen zu Denguevirus und YFV analog folgern dürfen, daß diese HCV-Partikel auch in einer geringeren Größe imponieren, was unserem zu größeren K_{av} -Werten verschobenen HCV-Core-Signalen entsprechen könnte.

4.7. Größe von HBV und sphärischen HBs-Partikeln

Das HBV ist in wasserfreier, fixierter Form ca. 45 nm groß (Gerlich et al., 2002). Bis vor kurzem gab es keine cryoEM Aufnahmen. Aus diesem Grunde bestimmte auch Chr. Jursch die Größe des HBV mit der GEC, um einen Durchmesser in hydratisiertem Zustand zu erhalten (Jursch, 2000). Er gab die Größe mit 52 nm an, ein Wert, der sich fast mit dem von uns bestimmten Durchmesser von 50,2 nm deckt. Erste cryoEM Aufnahmen, die bisher nicht veröffentlicht sind, zeigen, daß sich auch Größe des HBV bei dieser Meßmethode im gleichen Größenbereich bewegt (Urban, 2004).

Das K_{av} des HBsAg zeigte einen Peak bei 0,53, was einem D_s von 24,5 nm entsprechen würde. Wie in Abschnitt 3.9.1 dargelegt, könnte es sich bei diesem Peak aber um die Überlagerung zweier ähnlich großer HBs-Partikel. Die Größen wurden für das größere Partikel mit 26,9 nm und für das kleinere Partikel mit 22,5 nm bestimmt. Die früher durch GEC bestimmte Größe von 21 nm (Gerlich, 1971) für das HBsAg entspricht damit annähernd dem hier gefundenen Durchmesser der kleineren und häufiger vorkommenden Partikelpopulation.

4.8. BVDV als Modellvirus für HCV?

BVDV wird vielfach als Modellvirus für HCV angesehen. Insbesondere bei der Filtration von Blutprodukten wurde es häufig als Marker für die Elimination des Virus aus dem Plasma verwendet, da es in großen Mengen aus Zellkulturen gewonnen werden kann. Seine Größe in der konventionellen EM wird mit 40-60 nm angegeben (Ohmann, 1990). Neuere Untersuchungen zeigen ca. 60 nm große Partikel (Heinz et al., 2000). Die von uns bestimmte Größe von 48 nm für

BVDV liegt damit etwa 20% unter der EM-Größe, was dem Abplattungsartefakt in der EM zuzuschreiben ist. Dieser Effekt zeigt sich auch beim Abgleich von konventionellen EM-Größen zu CryoEM Darstellungen bei Flaviviren (s.o.).

Mit 48 nm in der GEC ist es jedoch deutlich größer als die von uns bestimmte Größe des HCV von ca. 40 nm. Sicher ist der Vergleich von drei HCV-Seren gegen einen analysierten BVDV Stamm keine hinreichende Grundlage für eine grundsätzliche Aussage. Trotzdem fällt auf, daß die Größe von BVDV und HCV deutlich zu divergieren scheinen. Ähnliche Ergebnisse erzielte Jursch (Jursch, 2000). Er gab für BVDV einen Größenbereich von 51-55 nm für das Verteilungsmaximum an und liegt damit wiederum ein wenig über der von uns bestimmten Größe, konnte aber auch schon feststellen, daß BVDV deutlich größer als HCV ist. Die vorliegenden Ergebnisse würden die Verwendung von BVDV in Filtrationsexperimenten als Modellvirus für Virussicherheit von Blutprodukten bezüglich HCV erheblich einschränken.

4.9. Größenzunahme durch Antikörper-Beladung

Unter der Vorstellung, daß ein Teil der in V_0 nachgewiesenen HCV-Population seinen Stokes'schen Durchmesser deshalb verändert haben könnte, weil die Viren mit Antikörpern beladen sind, stellt sich die Frage, um wieviele nm sich der Durchmesser gegenüber der nativen Form eines Virus verändert. Die bloße Addition von D_s und zwei IgG Durchmessern scheint aus mehreren Gründen nicht gerechtfertigt, da zunächst die Form der Antikörper nicht globulär ist sowie die Absättigung der Partikel mit Ak und ihre räumliche Anordnung auf der Partikeloberfläche nicht notwendigerweise gleichförmig ist.

Bei der Untersuchung der Ak-Bindung an Partikel in der GEC wählten wir Parvovirus B19, daß uns *ex vivo* hochtitrig mit und ohne anti-B19-IgG zugänglich war. Die Verteilung in der GEC offenbarte eine Vergrößerung des Durchmessers in Gegenwart von anti-B19-IgG um 17 nm (Abb. 32, Absch. 3.9.2). Dies würde eine durchschnittliche Radiusvergrößerung durch ein gebundenes IgG von 8,5 nm bedeuten. Die Größe von freiem IgG wurde chromatographisch zu 10,5 nm bestimmt (Andrews, 1970). Der fehlende Betrag von 2 nm liegt innerhalb der Fehlergrenze, könnte aber auch mit der sterischen Veränderung und dem Verlust der Hydrathülle im Bereich der Bindungsstelle erklärt werden. Die Bindung von Ak an Viruspartikel konnte von Smith et al. auch mittels CryoEM dargestellt werden (Smith et al., 1993). Das hierzu verwendete Humane Rhino-

virus Typ 14 hat im freien Zustand einen Durchmesser von 30 nm, während die bivalent gebundenen IgG-Ak eine Vergrößerung der Partikel auf ca. 42 nm hervorriefen. Dies bedeutet für eine einzelne Ak-Bindung 6,0 nm Radiusvergrößerung. Problematisch bei dieser CryoEM-Untersuchung ist jedoch, was die Autoren besonders betonten, daß der Fc-Teil der Ak sich aufgrund der hohen Kettenflexibilität nicht vollständig darstellen ließ, lediglich die Bindung des Fab und der Ansatz des Fc konnte cryoelektronenmikroskopisch erfaßt werden. Somit wäre die im CryoEM gegenüber unseren GEC-Daten fehlende Länge von 2,5 nm dem in der GEC miterfaßten, flexiblen Fc des IgG zuzuordnen. Dieser Abgleich unterstreicht wiederum die Präzision der GEC-Messung gerade im Hinblick auf zugängliche CryoEM-Daten.

Ein gänzlich anderes Phänomen der Größenverschiebung zeigt sich, wenn man Viruspartikel aus Zellkultur mit entsprechend polyklonal geboostertem Serum eines Patienten inkubiert. Dies wurde für das Poliovirus SABIN 1 durchgeführt, wobei zur Inkubation das Serum eines Impflings verwendet wurde, der 6 Monate zuvor mit Salk-Impfstoff geboostert wurde. Es kam hier zu einer größeren Verschiebung der Polioviren in Richtung des Ausschlußvolumens mit einem sehr großen Tailing, was die erhebliche Inhomogenität der entstandenen Population anzeigt (s. Abb. 33) ($c=1,17$, $b=0,2$). Dies läßt vermuten, daß der Antikörper-Titer im Serum nicht ausreichte, um die Viren vollständig mit Antikörpern zu bedecken; vielmehr wurden die Viren wahrscheinlich durch die Antikörper vernetzt. Bislang durchgeführte Versuche mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen konnten leider kein eindeutigeres Bild erbringen.

Eine Anwendung der bei der Untersuchung von B19 gewonnenen Annahme auf die bei der GEC von HCV erhobenen Daten erscheint allerdings nicht so leicht möglich zu sein. Unter der Vorstellung, daß HCV 37 nm groß ist, wäre ein Peak von Ak-beladenen Viren mit ca. 55 nm D_s bei K_{av} 0,2 zu erwarten. Eine solche Fraktion ist nur in einem einzigen Serum zu beobachten gewesen, und zwar jene Messung mit Serum F, daß zuvor niemals eingefroren war mithin eine durch Einfrieren bedingte Komplexierung von Ak-beladenen Partikeln und Lipoproteinen nicht stattgefunden hat. Von solchen 60nm-HCV-Partikeln berichtet auch schon Jursch (Jursch, 2000). Diese Partikel können also als Ak-beladene, jedoch (noch) nicht mit Lipoprotein komplexierte Partikel angesprochen werden. Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung von Ultrafiltrat bei Dialysepatienten (Valtuille et al., 1998), daß bei 6 HCV-positiven Patienten im Ultrafil-

trat keine Virus-RNA detektierbar war, hingegen es bei einem Dialysepatienten konstant zum Nachweis von HCV kam. Dies impliziert, daß bei den verwendeten Filtern (Cuprophane Membrane CF25 Baxter) Ak-beladene HCV-Partikel (mindestens 60 nm) nicht passieren, während freie Partikel (37 nm) filtriert wurden.

4.10. Ausblick

Die Morphologie eines viralen Erregers bietet vielfach Ansätze zum Verständnis pathogenetischer Mechanismen. Für das HCV sind viele morphologische Erkenntnisse noch verschlossen, dies schließt die Röntgenstrukturanalyse viraler Proteine, den Aufbau des Virions wie selbst grundlegende Eigenschaften wie die Größe mit ein.

Zur Aufklärung der genauen Morphologie des HCV wäre weiterhin eine Cryo-EM-Darstellung der Goldstandard. Solange jedoch keine Zellkultur vorliegt, die ausreichende Mengen an möglichst kompletten Viren produziert, ist dieser Weg schon im Ansatz versperrt. Die Darstellung einzelner Strukturproteine, insbesondere von E1 und E2 mittels Röntgenstrukturanalyse, wird zur Zeit durch ein europäisches Forschungsnetzwerk (ENHCV) versucht, an dem unsere Arbeitsgruppe seit 2002 mitwirkt. Doch selbst die Strukturaufklärung einzelner Proteine kann das Rätsel um die tatsächliche Anordnung im Virion nur bedingt beantworten.

Neben der Größenbestimmung freier HCV-Partikel mittels GEC boten unsere Daten darüberhinaus Anhaltspunkte für weitere morphologische Phänomene des HCV. Zunächst wäre die weitere Untersuchung der subviralen HCV-Partikel im Zusammenhang mit Krankheits- bzw. Therapiestadium von großem Interesse, sind solche Partikel doch möglicherweise an der Immunpathogenese (Immunkomplexe etc.) wie auch der Chronifizierung der Hepatitis C beteiligt. Ein erster morphologischer Abgleich dieser leeren *ex vivo* Partikel mit *in vitro* generierten leeren VLPs im Baculovirussystem in Insektenzellen (Baumert et al., 1998), wäre ein erster methodischer Zugang. Auch die Frage, ob inkomplette Partikel Teile des Genoms enthalten, und ob diese Bruchstücke gleichförmig oder statistisch verteilt vorliegen, ist nur durch nähere Quantifizierung mehrerer verschiedener Genomanschnitte mittels real-time PCR und deren Sequenzierung möglich. Mögliche regelmäßige Kettenabbrüche könnten einen Einblick in die Replikation des HCV erlauben.

Ein nicht unerheblicher Seitenaspekt der vorliegenden Arbeit ist die Korrelation der in unserer Arbeitsgruppe bestimmten Dichten zu verschiedenen Größen von RNA-haltigen Partikeln und wiederum verschieden sich in der Elektrophorese darstellenden Molekulargewichten des Core-Proteins. Die Möglichkeit, daß hier durch verschiedene Prozessierung weitere Partikelmorphologien entstehen, ist zu prüfen.

Die entworfene Methodik, besonders die Auswertung der GEC-Fraktionen, könnte ganz prinzipiell als für die Größenbestimmung der CryoEM gleichwertigen Methode in weiteren Bereichen der Virologie Verwendung finden. Gerade Viren, bei denen methodische Schwierigkeiten in der EM-Darstellung bestehen, könne so untersucht werden. Die GEC hat neben der hohen Präzision den Vorteil, daß so gewonnenen Partikel differentiell weiteren Funktionsuntersuchungen bezüglich Rezeptorbindung an Hepatozyten und Lymphozyten unterworfen werden können; diese Untersuchungen werden für HCV z.Zt. ebenfalls im Rahmen des ENHCV Netzwerkes fußend auf diese Arbeit durchgeführt.

Bei Vorliegen eines möglichen Infektionsmodells (z.B. primäre Hepatozyten humanen oder tierischen Ursprungs) können die dargestellten verschiedenen HCV-Populationen auf ihre Infektiosität untersucht werden; hierfür ist die präparative Reinheit nach GEC ein besonderer Vorteil. Aus klinischen Berichten ist bekannt, daß Anti-HCV-negative Seren besonders infektiös sind, selbst bei Vorliegen geringster RNA-Titer. Dieses mögliche unterschiedliche Verhalten der in der GEC getrennten freien und Ak-beladenen Partikel wäre weiterhin zu untersuchen.

Neben der speziellen Anwendung der GEC auf Viruspartikel kann das dargestellte mathematische Auswertung mittels Weibull-Verteilung die Präzision von GEC-Messungen ganz generell steigern. Prinzipiell ist diese Auswertungsmethode auf jede beliebige symmetrische und asymmetrische Chromatographieverteilung anwendbar.

Die dargelegte Größenbestimmung des HCV könnte insofern bei der noch unsicheren taxonomischen Einteilung der GB-Viren hilfreich sein, als man das Verhalten von HCV und GBV-A, B oder C mit anderen Vertretern der Flaviviridae vergleicht. Durch die GEC ist nicht nur die einfache Größenbestimmung eröffnet, sie ist gerade bei der Untersuchung von viralen Partikel *ex vivo* bezüglich ihrer realen Populationsverteilung und der Entdeckung gebundener Wirtskomponenten von erheblicher Bedeutung.

5. Literaturverzeichnis

Alanen M, Wartiovaara J und Soderlund H: Sequences conserved in the defective interfering RNAs of Semliki Forest Virus: an electron microscopic heteroduplex analysis, *Hereditas* (1987) 106, 1, 19-29

Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, Pol S, Brechot C, Paranhos-Baccala G und Lotteau V: Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles, *Journal of Virology* (2002) 76, 14, 6919-6928

Andrews P: Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gelfiltration (1970) *Interscience Publishers, New York, London*

Baker TS, Olson NH und Fuller SD: Adding the third dimension to virus life cycles: Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (1999) 63, 4, 862-922

Barret AD, Cubitt WD und Dimmock NJ: Defective interfering particles of Semliki Forest virus are smaller than particles of standard virus, *Journal of General Virology* (1984) 65, 12, 2265-2268

Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, Scarselli E, Cortese R, Nicosia A und Cosset F: Cell entry of hepatitis C virus requires a set of coreceptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor, *J Biol Chem* (2003) 278, 43, 41624-41630

Baumert TF, Ito S, Wong DT und Liang TJ: Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells, *Journal of Virology* (1998) 72, 5, 3827-3826

Behrens SE, Tomei L und De Francesco R: Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus, *EMBO J* (1996) 15, 1, 12-22

Berns KI, Bergoin M, Bloom M, Lederman M, Muzyczka N, Siegl G, Tal J und Tattersall P: Parvoviridae in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wickner: *Virus Taxonomy- 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2000) *Academic Press, San Diego*

Bonino F, Heermann KH, Rizetto M und Gerlich WH: Hepatitis Delta Virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope, *Journal of Virology* (1986) 58, 3, 945-950

Bonnal S, Boutonnet C, Prado-Lourenco L und Vagner S: I.R.E.S. Database, <http://fr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESdatabase>, (2001)

Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchinson JG und Pawlotsky JM: Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication, *Hepatology* (2002) 36, 1, 211-218

Bradley DW: The agents of Non-A, Non-B viral hepatitis, *Journal of Virologic Methods* (1985) 10, 307-319

Brady JN, Winston VD und Consigli RA: Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions., *Journal of Virology* (1977) 23, 3, 717-724

Brown E, Zhang H, Ping L und Lemon S: Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs, *Nucleic Acids Research* (1992) 20, 19, 5041-5

Bukh J, Purcell R und Miller R: Sequence analysis of the 5'-non coding region of hepatitis C virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1992) 89, 11, 4942-4946

Burger R, Gerlich WH, Gürtler L, Heiden M, Hitzler W, Jansen B, Klamm H und andere: Hepatitis C Virus- Stellungnahme des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit, *Bundesgesundheitsblatt* (2003) 46, 712-722

Burnouf T, Radosevich M, El-Ekiaby M, Satoh S, Sato T, Amin N, Savidge GF und Goubran HA: Nanofiltration of single plasma donations: feasibility study, *Vox Sanguinis* (2003) 84, 111-119

Busch MP, Tobler LH, Gerlich WH, Schaefer S, Giachetti C und Smith R: Very low level viremia in HCV infectious unit missed by NAT, *Transfusion* (2003) 43, 1173-1174

Chandra S, Cavanaugh JE, Lin CM, Pierre-Jerome C, Yerram N, Weeks R, Flanigan E und Feldman F: Virus reduction in the preparation of intravenous immune globuline: in vitro experiments, *Transfusion* (1999) 39, 3, 249-257

Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K und Kumada H: Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1B hepatitis C virus infection, *Hepatology* (1997) 25, 3, 745-749

Chipman PR, Agbandje-McKenna M, Kajigaya S, Brown KE, Young NS, Baker TS und Rossmann MG: Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1996) 93, 7502-7506

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW und Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome, *Science* (1989) 244, 359-362

Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C und Gallegos C: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1991) 88, 6, 2451-2455

Chung RT, Monto A, Dienstag JL und Kaplan LM: Mutations in NS5A region do not predict interferon-responsiveness in American patients infected with genotype 1b hepatitis C virus, *Journal of Medical Virology* (1999) 58, 4, 353-358

Cocquerel L, Kuo CC, Dubuisson J und Levy S: CD81-dependent binding of the hepatitis C virus E1E2 heterodimers, *Journal of Virology* (2003) 77, 19, 10677-10683

Cornberg M, Wedemeyer H und Manns MP: Treatment of chronic hepatitis C with PEGylated interferon and ribavirin, *Curr Gastroenterol Rep* (2002) 4, 1, 23-30

De Vos R, Verslype C, Depla E, Fevery J, Van Damme B, Desmet V und Roskams T: Ultrastructural visualization of hepatitis C virus in human and primate liver biopsies, *Journal of Hepatology* (2002) 37, 3, 370-379

Determann H: *Gelchromatographie* (1967) Springer, Berlin Heidelberg New York

Determann H und Michel W: The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins, *Journal of Chromatography* (1966) 25, 211-218

Di Bisceglie AM, Conjeevaram HS, Fried MW, Sallie R, Park Y, Yurdaydin C, Swain M, Kleiner DE, Mahaney K und Hoofnagle JH: Ribavirine as therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial., *Annals of Internal Medicine* (1995) 123, 897-902

Didenko VV: DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications, *Biotechniques* (2001) 31, 5, 1106-1116

- Dondi F, Cavazzini A, Remelli M, Felinger A und Martin M:** Stochastic theory of size exclusion chromatography by the characteristic function approach, *Journal of Chromatography A* (2002) 943, 185-207
- Dow BC, Follet EAC, Jordan T, McOmish F, Davidson J, Gillon J, Yap PL und Simmonds P:** Testing of blood donations for hepatitis C virus, *The Lancet* (1994) 343, 477-478
- Dynal:** Technical Handbook, Second edition (1996) Oslo, Norwegen
- EASL-Jury:** Consensus Panel (1999)- EASL international consensus conference on hepatitis C. Consensus statement, *Journal of Hepatology* (1999) 30, 956-961
- Failla C, Tomei L und De Francesco R:** Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins, *Journal of Virology* (1994) 68, 6, 3753-3760
- Falcon V, Acosta-Rivero N, Chinea G, Gavilondo J, de la Rosa M, Menendez I, Duenas-Carrera S, Vina A, Garcia W, Gra B, Noa M, Reytor E, Barcelo M, Alvarez F und Morales-Grillo J:** Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 305, 1085-1090
- Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B und Purcell RH:** A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis, *New England Journal of Medicine* (1991) 325, 98-104
- Flodin P:** Dextran Gels and their Applications in Gelfiltration (*Dissertation*, 1962), Uppsala
- Frisque RJ, Barbanti-Brodano G, Crawford LV, Gardner SD, Howley PM, Orth G, Shah KV, van der Noordaa J und zur Hausen H:** Polyomaviridae in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wickner: *Virus Taxonomy- 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2000) Academic Press, San Diego
- Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkühler C und De Francesco R:** Modulation of hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities through the interaction with NS4A, *Biochemistry* (1999) 38, 17, 5620-5632
- Gerlich WH:** Größenbestimmung biologischer Partikel durch Gelchromatographie an Sepharose 6B, *Zeitschrift für Naturforschung* (1971) 26b, 10, 1040-1044
- Gerlich WH, Determann H und Wieland T:** Die Gelchromatographie großer Partikel und ihre Grenzen, *Zeitschrift für Naturforschung* (1970) 25b, 11, 1235-1239
- Gerlich WH und Schaefer S:** Hepadnaviren: Hepatitis B Virus in H. W. Doerr und W. H. Gerlich: *Medizinische Virologie* (2002) Thieme, Stuttgart - New York
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM und Rice CM:** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products, *Journal of Virology* (1993) 67, 3, 1385-1395
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP und Rowlands DJ:** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by antiviral drug Amantadine, *FEBS letters* (2003) 535, 1-3, 34-38
- Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M und Rowlands DJ:** A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion-channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria, *Journal of General Virology* (2004) 85, 2, 451-461
- Hagedorn CH, van Beers EH und De Staercke C:** Hepatitis C virus RNA-dependent RNA-polymerase (NS5B polymerase), *Current Topics of Microbiology an Immunology* (2000) 242, 225-260

- Harada T, Tautz N und Thiel HJ:** E2-p7 region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and functional studies, *Journal of Virology* (2000) 74, 20, 9498-9506
- He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ und Purcell RH:** Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration, *Journal of Infectious Diseases* (1987) 156, 4, 636-640
- Heermann KH, Gültekin H und Gerlich WH:** Protein blotting: techniques and application in virus hepatitis research, *Ric Clin. Lab.* (1988) 18, 2,3, 103-221
- Heintges T, Niederau C, Mohr L, Hensel F und Häussinger D:** Diagnose und Therapie der chronischen Virushepatitis C, *Zeitschrift für Gastroenterologie* (1996) 34, 159-166,
- Heintges T und Wands J:** Hepatitis C: epidemiology and transmission, *Hepatology* (1997) 26, 521-526
- Heinz FX, Collet MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM und Thiel HJ:** Flaviviridae in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wickner: *Virus Taxonomy- 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2000) Academic Press, San Diego
- Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K und Shimotohno K:** Two distinct protease activities required for the processing of a putative non-structural precursor protein of hepatitis C virus, *Journal of Virology* (1993) 76, 8, 4665-4675
- Hijikata M, Shimizu Y, Kato H, Iwamoto A, Shih J, Alter H, Purcell R und Yoshikura H:** Equilibrium Centrifugation Studies of Hepatitis C Virus: Evidence for Circulating Immune Complexes, *Journal of Virology* (1993) 67, 4, 1953-1958
- Hogle JM, Chow M und Filman DJ:** Three-dimensional Structure of Poliovirus at 2,9 Angström Resolution, *Science* (1985) 229, 1358-1365
- Honda M, Beard M, Ping L und Lemon S:** A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of Hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation, *Journal of Virology* (1999) 73, 2, 1165-74
- Hoofnagle JH:** Hepatitis C: The clinical spectrum of disease, *Hepatology* (1997) 26, 3 Suppl 1, 15S-20S
- Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y und Jones EA:** Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report, *New England Journal of Medicine* (1986) 315, 25, 1575-1578
- Hope RG und McLauchlan J:** Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein, *Journal of General Virology* (2000) 81, Pt 8, 1913-1925
- Hornbeck CL, Gravelle CR, Hollinger FB und Bradley DW:** Agarose gel filtration of concentrated fetal extracts containing virus-like particles associated with hepatitis A, *Intervirology* (1975) 6, 4, 309-314
- Hu KQ, Vierling JM und Redeker AG:** Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection, *J Viral Hepat.* (2001) 8, 1-18
- Hull R:** Studies on alfalfa mosaic virus. 3. Reversible dissociation and reconstruction studies, *Virology* (1970) 40, 1, 34-47
- Hultgren C, Milich DR, Weiland O und Sällberg M:** The antiviral compound ribavirin modulates the T-helper (Th)1/ Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune response, *Journal of General Virology* (1998) 79, 2381-2391

- Ivanovskij DI:** O dvuch boleznyach tabaka. Tabacnaja pepliza. Mozatcnaja bolezni tabaka, *Sel'skoje chozajstvo i lesovodstvo (St. Petersburg) (1892)* 169, 104-121
- Ivanovskij DI:** Über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (1903)* 13, 1, 1-41
- Jaeckel E, Cornberg M, Wedemeyer H, Santantonio T, Mayer J, Zankel M, Pastore G, Dietrich M, Trautwein C und Manns MP:** Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b, *New England Journal of Medicine (2001)* 345, 20, 1452-1457
- Johnston A, Macgregor A, Borovec S, Hattarki M, Stuckly K, Anderson D, Goss N, Oates A und Uren E:** Inactivation and clearance of viruses during the manufacture of high purity factor IX, *Biologicals (2000)* 28, 3, 129-136
- Jose M, Curtu S, Gajardo R und Jorquera JI:** The effect of storage at different temperatures on the stability of Hepatitis C virus RNA in Plasma samples., *Biologicals (2003)* 31, 1, 1-8
- Jursch CA:** Größenbestimmung von Viren in menschlichem Blutplasma durch Ausschlußchromatographie (*Dissertation, 2000*), FB Biologie, JLU, Giessen
- Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O und Thraenhart O:** Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus, *Med Microbiol Immunol (2002)* 190, 4, 189-197
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S und Kohara M:** Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study, *Journal of General Virology (1994)* 75, 1755-1760,
- King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T und Stanway G:** Picornaviridae in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wickner: *Virus Taxonomy- 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2000)* Academic Press, San Diego
- Kolykhalov A, Mihalik K, Feinstone S und Rice C:** Hepatitis C virus encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo, *Journal of Virology (2000)* 74, 4, 2046-51
- Kono Y, Hayashida K, Tanaka H, Ishibashi H und Harada M:** High density lipoprotein binding rate differs greatly between genotypes 1b and 2a/2b of hepatitis C virus, *Journal of Medical Virology (2003)* 70, 1, 42-48
- Korgel BA, van Zanten J und Monbouquette H:** Vesicle Size Distributions Measured by Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multiangle Light Scattering, *Biophysical Journal (1998)* 74, 3264-3272
- Kuhn R, Zhang W, Rossmann M, Pletnev S, Corver J, Lenches E, Jones C, Mukhopdhyay S, Chipman P, Strauss E, Baker T und Strauss J:** Structure of Denguevirus: Implications for flavivirus organization, maturation and fusion, *Cell (2002)* 108, 715-725
- Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM und Watowich SJ:** Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein, *Journal of Virology (2001)* 75, 5, 2119-29
- Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (1970)* 227, 680-685
- Lanford RE, Notvall L, Chavez D, White R, Frenzel G, Simonsen C und Kim J:** Analysis of hepatitis C virus capsid, E1 and E2/NS1 proteins expressed in insect cells, *Virology (1993)* 197, 1, 225-235
- Laurent TC und Killander J:** A theory of gelfiltration and its experimental verification, *Journal of Chromatography (1964)* 14, 317-330

- Li RM, Mannon RB, Kleiner D, Tsokos M, Bynum M, Kirk AD und Kopp JB:** BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy, *Transplantation* (2002) 74, 11, 1497-1504
- Liddington R, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin T und Harrison S:** Structure of simian virus 40 at 3,8-Ångström resolution, *Nature* (1991) 354, 278-284
- Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW und Rice CM:** Processing in the hepatitis C virus E2-NS2-region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini, *Journal of Virology* (1994) 68, 8, 5063-5073
- Lin C, Pragai BM, Grakoui A, Xu J und Rice CM:** Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: transcleavage requirements und processing kinetics, *Journal of Virology* (1994) 68, 12, 8147-8157
- Lin C, Wu JW, Hsiao K und Su MS:** The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins, *Journal of Virology* (1997) 71, 9, 6465-6471
- Liu Q, Bhat RA, Prince AM und Zhang P:** The hepatitis C virus NS2 protein generated NS2-3 autocleavage is required for NS5A phosphorylation, *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 254, 3, 572-577
- Lo SY, Selby MJ und Ou JH:** Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein, *Journal of Virology* (1996) 70, 8, 5177-5182
- Lottspeich F und Zorbach H:** Bioanalytik (1998) Spektrum-Verlag, Heidelberg
- Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R und Budkowska A:** Nonenveloped Nucleocapsids of Hepatitis C Virus in the Serum of Infected Patients, *Journal of Virology* (2001) 75, 17, 8240-8250
- Mancini G, Carbonara AO und Heremans JF:** Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion, *Immunochemistry* (1965) 2, 235
- Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N und Lai MM:** Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein, *Virology* (1996) 218, 1, 43-51
- Maynard M, Pradat P, Berthillon P, G P, Voirin N, Martinot M, Marcellin P und Trepo C:** Clinical relevance of total HCV core antigen testing for hepatitis C monitoring and for predicting patients' response to therapy, *Journal of Viral Hepatitis* (2003) 10, 4, 318-323
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G und Martoglio B:** Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets, *EMBO Journal* (2002) 21, 15, 3980-3988
- Meisel H, Reip A, Faltus B, Luh M, Porst H, Wiese M, Roggendorf M und Krueger DH:** Transmission of hepatitis C virus to children and husband by women infected with contaminated anti-D immunoglobulin, *The Lancet* (1995) 345, 1209-1211
- Mele A, Corona R, Tosti ME, Palumbo F, Moriaghi A, Novaco F, Galanti C, Bernacchia F und Ferraro P:** Beauty treatments and risk of parenterally transmitted hepatitis: Results from the hepatitis surveillance system in Italy, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (1995) 27, 441-444
- Miller RH und Purcell RH:** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1990) 87, 6, 2057-2061
- Modrow S, Falke D und Truyen U:** Molekulare Virologie (2003) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Nakamuta M, Shimohashi N, Tada S, Kinkuwa N, Enjoji M, Uchimura K, Motomura K, Sugimoto R, Kato M, Iwamoto H, Kuniyoshi M, Sakai H und Nawata H:** Serum

levels of HCV RNA and core protein before and after incubation at 37 degrees C for 24 h, *Hepato Res* (2001) 19, 3, 254-262

Nakashima K, Ikematsu H, Hayahashi J, Kishihara Y, Mutsutake A und Kashiwagi S: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan, *JAMA* (1995) 274, 18, 1459-1461

Ogston AG: The spaces in a uniform random suspension of fibres, *Transactions of the Faraday Society* (1958) 54, 1754-1757

Ohba K, Mizokami M, Lau JY, Orito E, Ikeo K und Gojobori T: Evolutionary relationship of hepatitis C, pest-, flavi-, plantviruses, and newly discovered GB hepatitis agents, *FEBS letters* (1996) 378, 3, 232-234

Ohmann HB: Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus, *Rev Sci Tech* (1990) 9, 1, 61-73

Omar A und Kempf C: Removal of neutralized model parvoviruses in human IgG solutions by nanofiltration, *Transfusion* (2002) 42, 8, 1005-1010

Oshima K, Evans-Strickfaden T und Highsmith A: Comparison of Filtration Properties of Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus and Simian Virus 40 Using a Polyvinylidene Fluoride Membrane Filter, *Vox Sanguinis* (1998) 75, 181-188

Par G, Rukavina D, Podack ER, Horanyi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G, Paal M, Szereday L, Moszlik L und Par A: Decrease in CD3-negative-CD8dim(+) and Vdelta2/Vgamma9 TcR+ peripheral blood lymphocyte counts, low perforin and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection, *J Hepatol* (2002) 37, 4, 514-522

Parks JS, Yang JM und Min MK: Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with Ha-ras oncogene, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000) 267, 2, 581-587

Patterson JL und Fernandez-Larsson R: Molecular mechanisms of action of ribavirin, *Rev Infect Dis* (1990) 12, 1139-1146

Pavlovic D, Neville DCA, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB und Zitzmann N: The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (2003) 100, 10, 6104-6108

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Pertacca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G und Abrignani S: Binding of hepatitis C virus to CD81, *Science* (1998) 282, 938-941

Poitevin E und Wahl P: Study of the translational diffusion of macromolecules in beads of gel chromatography by the FRAP method, *Biophysical Chemistry* (1988) 31, 3, 247-258

Porath J und Flodin P: Gel filtration: A method for desalting and group separation, *Nature* (1959) 183, 1657-1659

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk G, Ideo G und Bain V: Randomized trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis c virus, *Lancet* (1998) 352, 1426-1432

Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW und Milian SJ: Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus, *Lancet* (1974) ii, 241-246

Reed KE und Rice CM: Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing and protein properties, *Current Topics of Microbiology an Immunology* (2000) 242, 55-84

- Rijnbrand R und Lemon S:** Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication, *Current Topics of Microbiology and Immunology* (2000) 242, 85-116
- Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin i T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L und Weiner A:** Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy, *Archives of Virology* (1998) 143, 12, 2493-2503
- Roggendorf M:** Hepatitis C Virus in H. W. Doerr und W. H. Gerlich: *Medizinische Virologie* (2002) Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M, Musso R, Santoro R und Schiavoni M:** Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 degrees C heat after lyophilization, *Transfusion* (1997) 37, 5, 517-522
- Santolini E, Migliaccio G und La Monica N:** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein, *Journal of Virology* (1994) 68, 6, 3631-3641
- Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Ruster B, Kronenberger B, Roth WK und 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, *Journal of Infectious Diseases* (2000) 181, 2, 432-441
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R und Vitelli A:** The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for hepatitis C virus, *EMBO Journal* (2002) 21, 19, 5017-5025
- Schettler V, Monazahian M, Wieland E, Thomssen R und Mueller GA:** Effect of heparin-induced extracorporeal low-density lipoprotein precipitation (HELP) apheresis on hepatitis C plasma virus load, *Ther. Apher.* (2001) 5, 5, 384-386
- Schüttler CG:** Einfluß des Hepatitis C Virus Core-Proteins auf Transkriptionselemente des Hepatitis B Virus- Ein Modell zur viralen Koinfektion (*Dissertation, 2001*), Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Giessen
- Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems W, Gerlich WH und Schaefer S:** Hepatitis C Virus transmission (HCV) by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests (NAT) for viral RNA, *The Lancet* (2000) 355, 41-42
- Schüttler CG, Fiedler N, Schmidt K, Repp R, Gerlich WH und Schaefer S:** Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein, *Journal of Hepatology* (2002) 37, 6, 855-862
- Schüttler CG, Thomas C, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, Schuster R, Schaefer S und Gerlich WH:** Variable ratio of hepatitis C virus RNA to viral core antigen in patients sera, *Journal of Clinical Microbiology* (2004) 42, 5,
- Seeff L:** Natural history of chronic hepatitis C, *Hepatology* (2002) 36, 5 Suppl 1, S35-46
- Selby MJ, Glazer E, Masiarz F und Houghton M:** Complex processing and protein: protein interactions in the E2:NS2 region of HCV, *Virology* (1994) 204, 1, 114-122
- Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY und Lee YH:** Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells, *Journal of Virology* (1993) 67, 10, 5823-5832
- Shivapurkar N, Harada K, Reddy J, Scheuermann RH, Xu Y, McKenna RW, Milchgrub S, Kroft SH, Feng Z und Gazdar AF:** Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas, *The Lancet* (2002) 359, 9309, 851-852
- Smith D, Mellor J, Jarvis L, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap P und Simmonds P:** Variation of the hepatitis C virus 5' non coding region: implications for

secondary structure, virus detection and typing, *Journal of General Virology* (1995) 76, 7, 1749-1761

Smith TJ, Olson N, Cheng R, Chase E und Baker T: Structure of a human rhinovirus-bivalently bound antibody complex: implications for virus neutralization and antibody flexibility, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1993) 90, 15, 7015-7018

SPSS: Sigma Plot 5.0 Programming Guide (1998) Chicago

Steere RL und Ackers GK: Purification and separation of tobacco mosaic virus and southern bean mosaic virus by agar-gel filtration, *Nature* (1962) 194, 114-116

Tai CL, Chi WK, Chen DS und Hwang LH: The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3, *Journal of Virology* (1996) 70, 12, 8477-8484

Tanaka T, Kato N, Cho M, Sugiyama K und Shimotohno K: Structure of the 3' terminus of the hepatitis C genome, *Journal of Virology* (1996) 70, 5, 3307-3312

Thomas C: Die Kinetik des Hepatitis C Virus unter Interferontherapie (Dissertation, 2004), FB Humanmedizin, JLU, Gießen

Thomson M und Dimmock NJ: Common Sequence Elements in Structurally Unrelated Genomes of Defective Interfering Semliki Forest Virus, *Virology* (1994) 199, 354-365

Thomssen R und Bonk S: Virolytic action of lipoprotein lipase on hepatitis C virus in human sera, *Med Microbiol Immunol* (2002) 191, 17-24

Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel H und Uy A: Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein, *Med. Microbiol. Immunol* (1992) 181, 293-300

Thomssen R, Bonk S und Thiele A: Density heterogeneities of Hepatitis C Virus in human sera due to the binding of β -lipoprotein and immunoglobulins, *Med. Microbiol. Immunol.* (1993) 182, 329-334

Tsu TC: Discussion to: A statistical distribution function of wide applicability., *Journal of Applied Mechanics* (1952) June, 233-234

Urban S: Aufnahmen von HBV mittels CryoEM (2004) Persönliche Mitteilung

Valtuille R, Fernandez JL, Berridi J, Moretto H, del Pino N, Rendo P und Lef L: Evidence of HCV Passage Across Dialysis Membrane, *Nephron* (1998) 80, 194-196

Vorlaender KO und Schmolke B: Diagnostik unter Verwendung immunologischer Methoden (1980) Thieme, Stuttgart

Weaver SC, Dalgarno L, Frey TK, Huang HV, Kinney RM, Rice CM, Roehrig JT, Shope RE und Strauss EG: Togaviridae in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wickner: *Virus Taxonomy- 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2000) Academic Press, San Diego

Weibull W: A statistical distribution function of wide applicability, *Journal of Applied Mechanics* (1951) September, 293-297

Weiland F, Weiland E, Unger G, Saalmüller A und Thiel HJ: Localization of pestiviral envelope proteins E^{rn}s and E2 at the cell surface and on isolated particles, *Journal of General Virology* (1999) 80, 1157-1165

Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, Richman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo QL und 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, 2, 842-848

Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, Hall JE, Mason TJ, Saracco G und Bonino F: Evidence for immune selection of hepatitis C virus putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (1992) 89, 8, 3468-3472

Wettstein M, Erhardt A, Petry W, Niederau C und Häussinger D: Hepatozelluläres Karzinom bei Hepatitis-C-Infektion in D. Häussinger und C. Niederau: *Hepatitis C* (2001) Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, Wien

White CL, Thomson M und Dimmock NJ: Deletion Analysis of a Defective Interfering Semliki Forest Virus RNA Genome Defines a Region in the nsP2 Sequence That is Required for Efficient Packaging of the Genome into Virus Particles, *Journal of Virology* (1998) 75, 5, 4320-4326

Yamada N, Tanihara K, Takada A, Yoriyuzi T, Tsutsumi M, Shimomura H, Tsuji T und Date T: Genetic organisation and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome, *Virology* (1996) 223, 1, 255-261

Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR und Kohara M: The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein, *Journal of Virology* (1998) 72, 7, 6048-6055

Yuasa T, Ishikawa G, Manabe S, Sekiguchi S, Takeuchi K und Miyamura T: The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre, *Journal of General Virology* (1991) 72, 2021-2024

Yuki N, Hayashi N, Kasahara A, Hagiwara H, Ohkawa K, Fusamoto H und Kamada T: Hepatitis C virus replication and antibody responses toward specific Hepatitis C virus proteins, *Hepatology* (1994) 19, 1360-1365

Zanetti AR, Romano L, Brunetto M, Colombo M, Bellati G und Tackney C: Total HCV core antigen assay: a new marker of hepatitis C viremia for monitoring of the progress of therapy, *Journal of Medical Virology* (2003) 70, 1, 27-30

Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Plernev S, Sedlak D, Baker T, Strauss J, Kuhn R und Rossmann MG: Structures of immature flavivirus particles, *EMBO Journal* (2003) 22, 11, 2604-2613

6. Appendix

6.1. Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und daraus abgeleitete Einheiten werden nach der üblichen Art abgekürzt. Nukleotide und Aminosäuren wurden gemäß der internationalen Nomenklatur abgekürzt. Aminosäuren werden im internationalen Einbuchstaben-Code wiedergegeben.

μ	mikro (10^{-6})	Ig(M/G)	Immunglobulin der Klassen M/G
a	Skalar der WV für die Höhe	IU	Internationale Einheiten
$a_1/a_2/a_3$	Skalare für D_s	K_{av}	Verteilungskoeffizient
aa	Aminosäuren	kb	Kilobasen
Abb.	Abbildung	kD	Kilo-Dalton
Absch.	Abschnitt	LC	Lightcycler
Ag	Antigen	min.	Minute
Ak	Antikörper	NANB	Non-A-Non-B
b	Skalar der WV für die Weite	NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Test
bp	Basenpaare	NS	Nichtstrukturprotein
BSA	Bovines Serum Albumin	nt	Nukleotid
BVDV	Bovines-Virus-Diarrhoe-Virus	ORF	Open reading frame
c	Symmetrieskalar der WV	OD	Optische Dichte
cDNA	komplementäre DNA	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CryoEM	Cryoelektronenmikroskopie	PBS	Phosphate buffered saline
D	Dalton	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
D_s	Stokes'scher Durchmesser	RNA	Ribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	RNase	Ribonuklease
DEPC	Diethyl-Pyrokohlensäureester	rt	real time
DI	defective interfering	RT	Reverse Transkription
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	s	Symmetriequotient der WV, abgeleitet aus c
DMSO	Dimethylsulfoxid	s.o.	siehe oben
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate	SFV	Semliki Forest Virus
DTT	Dithiothreitol	SL	stem loop
E	Envelope (Hüllprotein)	SV40	Simian Virus 40
ECL	Enhanced Chemiluminescence	Tab.	Tabelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	TCID	Tissue Culture Infectious Dose
EHTP	theoretische chromatographische Bodenhöhe	TE	Tris-EDTA-Puffer
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
ER	Endoplasmatisches Retikulum	T_m	Schmelztemperatur
GEC	Gelausschlusschromatographie	T_r	Raumtemperatur
Ge	Genome (DNA)	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Geq	Genomäquivalente (RNA)	U	Umdrehungen
gp	Glykoprotein	VLP	virus like particle
h	Stunde	V_0	Ausschlußvolumen
HBc	Hepatitis-B-Core-Protein	V_e	Elutionsvolumen
HBs	Hepatitis-B-Oberflächenprotein	V_t	Totalvolumen
HBV	Hepatitis-B-Virus	v/v	Volumenverhältnis
HCV	Hepatitis-C-Virus	WV	Weibullverteilung
HIV	Humanes Immundefizienz Virus	w/w	Gewichtsverhältnis
HybProbe	Hybridisierungssonde	x_0	Äquivalent der WV für K_{av}
IFN	Interferon		

6.2. Zusammenfassung

Trotz erheblicher Anstrengung ist die Morphologie des Hepatitis-C-Virus (HCV), insbesondere seine tatsächliche Partikelgröße, unklar. Bisherige Studien mittels Elektronenmikroskopie führten zu keinen klaren Aussagen, auch bei vielen anderen Viren bietet diese Methodik kein genaues Ergebnis für die tatsächliche Größe hydrierter, nativer Viruspartikel.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Größe von HCV in nativem Zustand wie auch seine Populationsverteilung in humanem Serum zu ermitteln. Hierzu wurde eine Gel-Ausschlusschromatographie (GEC) etabliert, zu deren Auswertung ein hier dargelegtes mathematisches Verteilungsmodell mittels Weibull-Analyse erstmalig eingesetzt und validiert wurde. Zur Eichung wurden mehrere Viren mit bekannter cryoelektronenmikroskopischer Größe verwendet und zu ihrem Nachweis quantitative real-time Methoden etabliert.

Bei der Untersuchung von HCV konnten im Serum Antikörper-gebundene von freien Viruspopulationen getrennt werden; freie Viren fanden sich vorwiegend bei Immunsupprimierten und in der frühen Infektionsphase. Die Größe des freien HCV wurde zu 37 ± 2 nm bestimmt, was etwa 20% unter dem Wert anderer Mitglieder der Flaviviridae und dem für HCV bisher vermuteten Wert liegt. Neben diesen Partikeln fanden sich kleinere, RNA-freie Core-Ag-haltige Partikel, womit erstmalig der Nachweis subviraler HCV-Partikel gelang. Diese Partikel könnten eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese und Diagnostik der Hepatitis C einnehmen. Nach chromatographischer Reinigung von humanem Serum gelang eine elektronenmikroskopische Darstellung von Partikeln mit möglicher viraler Oberflächenmorphologie.

Weitergehend wurde die Größe von freiem Hepatitis-B-Virus (50,2 nm) und dem Bovinen Virus-Diarrhoe-Virus BVDV (48,6 nm) mittels GEC bestimmt. Die hier nachgewiesene deutliche Differenz zwischen BVDV und HCV stellt die bisherige Verwendung von BVDV als Modellvirus bei der Ultrafiltration in Frage.

Das Fehlen von nachweisbarer RNA oder Kapsiden nach Detergenzbehandlung von HCV führt zu einer Neubewertung der HCV-Morphologie und zu der Hypothese, daß das HCV-Core-Protein eher ein Matrixprotein als ein klassisches Kapsidprotein ist.

6.3. Summary

Although great efforts were made in the past, the morphology of the Hepatitis-C-Virus (HCV) –especially its size- is not evaluated very well. In many cases the electron-microscopy was used to answer this question, but the results differ. Furthermore, the method is not always useful to determine the size of native, hydrated virus particles.

Aim of this work was the determination of the size of the native HCV and its sub-populations in human sera. Therefore the gel exclusion chromatography (GEC) was used. To evaluate the results, the use of Weibull's distribution was established first time for the use in GEC. Calibration points were different viruses with known diameter, measured by cryo-electron microscopy. For the detection of these viruses, quantitative real-time PCR-methods for viral nucleic acids were developed.

When examining HCV in human sera, we were able to separate antibody-linked viruses from free virus populations; free virus particles were mostly found in the early phase and in immune-suppressed patients. The size of free HCV virions were determined to $37 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, which is about 20% less than the expected size of HCV and of other members of the flaviviridae. Additional smaller, RNA-free particles containing HCV-core antigen were detected, showing first time the existence of subviral HCV-particles. These particles could be very important for further works on the pathogenicity and diagnosis of HCV.

Furthermore the size of free Hepatitis B virus (50.2 nm) and bovine viral diarrhoea-virus BVDV (48.6 nm) was determined by GEC. The size difference between HCV and BVDV shows that BVDV is not suitable as a model virus for the ultrafiltration of HCV.

Based on the fact, that it was not able to detect viral RNA or capsids after treatment of the virus with detergents, the morphology of HCV has to be reconsidered; HCV core protein may be more a viral matrix protein than a classical capsid protein.

6.4. Erklärung gemäß §11 (6) der Promotionsordnung des FB Medizin der JLU Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.

Tilo Jonas

6.5. Lebenslauf

- 1971 geboren in Lich als erstes von drei Kindern der Zahntechnikerin Gisela Jonas, geb. Schreck und des Physikers Helmut Jonas.
- 1978 Einschulung in die Grundschule Großen Linden
- 1982 Wechsel zur Weidigschule Butzbach
- 1991 Abitur
- 1991-1992 Zivildienst als Rettungshelfer beim DRK Butzbach
- 1992 Beginn des Studiums der Rechtswissenschaften an der JLU Gießen
- 1993 Prüfung zum Rettungssanitäter
- 1994 Wechsel zum Studium der Humanmedizin an der JLU Gießen
- 1996 Physikum
- 1997-2002 Tätigkeit im Studentischen Labordienst der Blutbank Gießen
- 1998 1. Staatsexamen
- 2000 2. Staatsexamen
- 2000-2001 MPJ: Chirurgie: Prof. Knäbler, Brobmann / KH Wetzlar; Innere: Prof. Heinrich / KH Wetzlar; HNO: Frau Prof. Glanz / JLU Gießen
- 2001 3. Staatsexamen
Beginn der Forschungstätigkeit am Institut für Medizinische Virologie der JLU Gießen / Prof. Gerlich
- 2002-2003 AiP auf der Infektionsstation/ Prof. Lohmeyer und am Institut für Medizinische Virologie / Prof. Gerlich der JLU
- 2003 Technische Leitung der Arbeitstagung von DVV und GfV
Assistenzarzt in der Infektiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik II der JLU / Prof. Lohmeyer

Danksagung

Traditionellerweise geht der erste Dank an den Leiter des Institutes, Herrn Prof. Dr. W. H. Gerlich. Diesem aber nun alleine mit der üblichen Floskel für die Bereitstellung des Themas zu danken, würde ihm nicht gerecht werden. Seine Unterstützung meiner virologischen und klinischen Ausbildung, sein Interesse am Fortgang der Arbeiten und seine spontane Bereitschaft, durch seine immense Erfahrung neue Wege aufzuzeigen, gehen weit über das hinaus, was ein medizinischer Doktorand in der Regel erfahren darf.

Ein ebenso großer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Dr. Christian Schüttler. Die etwas schrullige Kombination (Ich weiß, daß er diesen Ausdruck mag) aus umfassendem Wissen, zielgerichtetem Arbeiten, enthusiastischer Begeisterung an auch unerwarteten Ergebnissen und spontanen Änderungen schufen ein Arbeitsklima, in dem es Spaß gemacht hat, sich immer neuen Herausforderungen zu stellen. Auch lernte ich durch ihn Aspekte der Geisteswissenschaften kennen, die normalerweise nicht in einem virologischen Labor vermittelt werden.

Dank geht auch an meine Mitdoktoranden – insbesondere Christine Thomas- und die übrigen Mitarbeiter des Institutes, die mir bei großen und kleinen Problemen zur Seite standen. Besonders erwähnenswert ist Dr. B. Boschek, der die elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt hat.

Mein eigentliches „Standbein“ ist in der klinischen Medizin. Diese durfte ich in den besonderen Facetten der Infektiologie auf der Infektionsstation der JLU von Herrn Prof. Lohmeyer und Herrn Dr. Friese, aber besonders von Herrn Dr. Thomas Discher erlernen.

Herrn Prof. Dr. Th. Bartsch vom Mathematischen Institut habe ich für die ausführliche mathematische Nachhilfe bei der Anwendung der Weibull-Funktion zu danken.

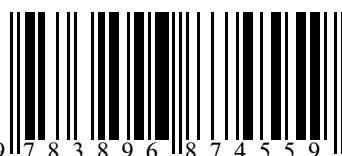
Der letzte, aber besonders große Dank gilt meinen Eltern, welche meine diversen Berufswünsche von Baggerfahrer (ganz klein), über Müllmann, Erfinder, Informatiker, Jurist, Feuerwehrmann (schon sehr viel größer) und letztendlich Arzt ertragen mußten. Ohne ihre Unterstützung hätte ich den vorliegenden Schlusstrich unter meine akademische Ausbildung nicht ziehen können.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-455-1



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 5 5 9