

**Einfluß des Hepatitis-C-Virus Core-Proteins auf
Transkriptionselemente des Hepatitis-B-Virus –
Ein Modell zur viralen Koinfektion**

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

vorgelegt von Christian G. Schüttler
aus Karlsruhe/Baden

Gießen 2000

Meinem Vater
Gisbert H. Schüttler
gewidmet

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Institut für Medizinische Virologie

Leiter: Prof. Dr. phil. nat. Wolfram H. Gerlich

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. W. H. Gerlich

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 26.11.2001

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis-B-Virus	4
1.1.1.	Struktur und Genomorganisation	4
1.1.2.	Regulationselemente des HBV-Genoms	6
1.1.3.	Klinik der HBV-Infektion	11
1.2	Das Hepatitis-C-Virus	12
1.2.1.	Genomorganisation und virale Proteine	12
1.2.2.	Genotypen des HCV	15
1.2.3.	Struktur und Prozessierung des HCV-Core-Proteins	17
1.2.4.	Epidemiologie und klinischer Verlauf	21
1.3	HBV/HCV-Koinfektion	22
1.3.1.	Epidemiologie	22
1.3.2.	Serologische und klinische Effekte einer HBV/HCV-Koinfektion	23
1.3.3.	<i>In-vitro</i> -Effekte	24
1.4	Fragestellung der Arbeit	25
2	Materialien	26
2.1	Chemikalien	26
2.2	Puffer	27
2.3	Nährmedien	29
2.4	Oligonukleotide	31
2.4.1.	Diagnostische Primer	31
2.4.2.	Primer zur Klonierung	31
2.5	Längenstandards	32
2.5.1.	Protein-Standard	32
2.5.2.	DNA-Standard	32
2.6	Plasmide	33
2.6.1.	pcDNA3	33
2.6.2.	pLUCI3	33
2.6.3.	pTrec99A	34

2.6.4. HBV-Enhancer-Konstrukte.....	35
2.7 Bakterienstämme und Zelllinien.....	36
2.7.1. E. coli XL1-Blue	36
2.7.2. E. coli JM109	36
2.7.3. HepG2-Zellen.....	36
2.7.4. AML12-Zellen	36
2.8 Seren.....	36
2.9 Antikörper.....	37
2.10 Geräte	37
3 Methoden	38
3.1 DNA-Isolierung.....	38
3.1.1. Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab	38
3.1.2. Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab	38
3.1.3. DNA-Präzipitation	39
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	39
3.1.5. Elution aus Agarosegelen.....	40
3.2 RNA-Extraktion aus Serum (GTC-Methode)	40
3.3 Reverse Transkription	41
3.4 PCR	42
3.5 Klonierung.....	43
3.5.1. Isolierung und Verdau des Inserts.....	43
3.5.2. Dephosphorylierung und Ligation	43
3.5.3. Transformation kompetenter Bakterien	43
3.5.4. Klonselktion	44
3.6 DNA-Sequenzierung	44
3.7 Kultivierung von Hepatozytenlinien	45
3.8 Transfektion eukaryoter Zellen	45
3.8.1. Lipofektion mit Lipofectamine™	46
3.8.2. Lipofektion mit SuperFect™	46
3.9 Proteinextraktion aus Zellkulturen.....	47

3.9.1. Gefriermethode	47
3.9.2. Zell-Lyse mit Detergenzien	47
3.10 Proteinexpression und -extraktion aus <i>E. coli</i>	48
3.11 Antikörper.....	48
3.11.1. Immunglobulin-Fällung aus Serum	48
3.11.2. Absättigung polyvalenter Antikörper.....	49
3.12 Immunblot	49
3.12.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
3.12.2 Western-Blot	50
3.12.3 Protein-Nachweis	50
3.13 BCA-Assay.....	51
3.14 Luciferase-Assay	51
3.15 Sequenz-Vergleich	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Herstellung von Expressionsplasmiden für HCV-Core-Protein.....	53
4.2 Expression des HCV-Coreproteins <i>in vitro</i>	56
4.2.1. Protein-Expression im prokaryoten System.....	56
4.2.2. Protein-Expression von HCV-Core-Varianten in Leberzellen	57
4.2.3. Dimerisierung des Core-Proteins <i>in vitro</i>	59
4.3 Repression der HBV-Enhancer durch das HCV-Core-Protein	60
4.3.1. Enhancer I/ X-Promotor	60
4.3.2. Enhancer II/ Core-Promotor.....	64
4.3.3. Repressionsaktivität verschiedener HCV-Core-Genotypen.....	65
4.3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Enhancer-Repression	68
4.4 Repressionsaktivität bei HBV-Enhancer I-Deletionsmutanten.....	71
4.5 Repressionsaktivität bei HBV-Enhancer II-Deletionsmutanten.....	72
4.6 Variabilität der intrazellulären HCV-mRNA-Population.....	75
4.6.1. HCV-Core-Variabilität in chronisch infiziertem Lebergewebe.....	75
4.6.2. HCV-Core-Variabilität in HCV-assoziiertem Leberzellkarzinom	79
4.7 Konservierung der HCV-Core-Sequenz bei klinischer Übertragung.....	79

5	Diskussion	85
5.1	<i>trans</i> -Repression des HBV durch das HCV-Core Protein	85
5.2	Einfluß von Core-Variabilität und HCV-Genotypen	87
5.3	Responsible Elemente und Bedeutung von Enhancer-Mutationen	90
5.4	Strukturmotive des Core-Proteins und Repressionsmechanismen	93
5.5	Repressionsaktivität des HCV als viraler Pathogenitätsfaktor	100
5.6	Klassifikation viraler Koinfektionen	102
5.7	Ausblick	105
6	Literaturverzeichnis	106
7	Appendix	119
	Abkürzungsverzeichnis	120
	Zusammenfassung	123
	Lebenslauf	124
	Danksagung	125

1 Einleitung

„Wenn ein Mann unter Gelbfärbung der Augen leidet und seine Krankheit bis ins Innere des Auges dringt, so daß das Innere des Auges gelb wie Kupfer aussieht . . . , wenn sein Inneres Essen und Getränke ausspeit . . . , wenn sogar das Antlitz, der ganze Körper . . . gelb wird . . . , so trocknet die Krankheit den ganzen Leib des Kranken aus, so daß er stirbt.“ (übersetzt aus LABAT R, 1945)

Mit diesen Worten beschreibt ein akkadischer Keilschrift-Text um 2300 v. Chr. einige bis heute gültigen Kardinalsymptome einer akuten Hepatitis. Neben den Pocken und der Poliomyelitis, ist die Hepatitis epidemica eine jener Virusinfektionen, die schon in den frühen Hochkulturen aufgrund ihrer augenfälligen Symptomatik in den medizinischen Codices beschrieben wurden.

Unter den weltweit bedeutenden Infektionen nehmen auch heute jene Virushepatitiden eine herausragende Stellung ein, die durch eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) und Hepatitis-C-Virus (HCV) hervorgerufen werden. Ihre weltweite Verbreitung und ihre hohe Inzidenz haben diese Erreger nicht zuletzt der Tatsache zu verdanken, daß mit der Einführung von Blutprodukten, intravenösen Injektionen und anderen invasiven Verfahren in der Medizin wie auch durch die Ausbreitung des Konsums intravenös zu applizierender Drogen, sich neue Wege der parenteralen Übertragung eröffneten. Allein der Verbrauch von weltweit etwa 25 Milliarden Injektionsnadeln/Jahr, davon mindestens die Hälfte zu Injektionszwecken, belegt dies eindrucksvoll (KANE A et al., 1999).

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO sind weltweit ca. 350 Millionen Menschen chronisch HBV-, und ca. 170 Millionen chronisch HCV-infiziert (WHO 1999). Jährlich sterben etwa 1 Mio. Menschen allein an den Folgen einer HBV-Infektion.

Zwar konnte durch Screening-Testverfahren auf Infektionen mit HBV oder HCV mittels ELISA oder Nachweismethoden für virale Nukleinsäure das Risiko einer HCV oder HBV-Übertragung durch Blutprodukte vermindert werden, zumindest verbleibt jedoch auch bei empfindlichen Antigen- bzw. Antikörper-Testverfahren ein gewisses Übertragungsrisiko (GLÜCK D et al., 1999). Dies bedeutet auch eine epidemiologisch nicht genauer faßbare Quelle für resultierende Koinfektionen,

insbesondere bei polytransfunden Patienten oder Empfängern von multiplen Thrombozytenkonzentraten.

Klinisch bedeutsamer bleiben weiterhin die Übertragungswege durch mehrmaligen Kanülen- bzw. Spritzengebrauch bei i.v.-Drogenabusus (HBV, HCV), sexuelle Übertragungswege (HBV, HCV?) sowie Fälle ohne erkennbares Risiko oder anamnestisch eruierbaren Übertragungsmöglichkeiten, den sogenannten sporadischen Fällen (HCV).

Ein besonderes Phänomen bei Erregern mit gleichem Übertragungsweg ist die Möglichkeit der Simultaninfektion oder Superinfektion, hier mit HBV und HCV. Aufgrund der Eigenschaft beider Viren, chronische Infektionen hervorzurufen, ist die Möglichkeit einer tatsächlichen gleichzeitigen Präsenz beider Viren in einem gemeinsamen Replikationsort (Leberzelle) in besonderem Maße gegeben.

Aufgrund der Häufigkeit von HBV/HCV-koinfizierten Patienten wurde schon früh erkannt, daß eine solche Kombination nicht unabhängig voneinander klinisch verläuft. Dies ist auch zunächst nicht weiter erstaunlich, teilen sich doch beide Viren das gleiche Zielorgan. Der progressivere Verlauf bezüglich Zirrhoseentstehung und die signifikant höherer Wahrscheinlichkeit, bei einer Koinfektion an einem primären hepatozellulären Karzinom zu erkranken (DONATO F et al., 1998), ist möglicherweise durch eine erhöhte synergistische Entzündungsaktivität erklärbar.

Als signifikantes Phänomen zeigte sich jedoch in klinischen Studien, daß die Aktivität beider Viren bei einer Koinfektion nicht unabhängig voneinander verlief. Trotz der großen virologischen Unterschiede in der Genexpressions- und Replikationsstrategie ist das HCV offenbar in der Lage, die Replikation des HBV wirkungsvoll zu unterdrücken. Deutlich wurde dies vor allem im Verlauf der serologischen Parameter bei einer Superinfektion mit HCV bei chronisch HBV-infizierten Patienten: der übliche Marker einer chronischen HBV-Infektion, das HBs- (Hepatitis-B-surface)-Antigen, verschwand und freie HBV-Partikel im Blut konnten teilweise selbst mit empfindlichen Nachweismethoden für die virale DNA mittels PCR nicht mehr gefunden werden.

Bei etwa 10 % der Patienten fand sich eine entgegengesetzte Situation, die Suppression des HCV durch das Vorliegen einer HBV-Infektion oder eine gleichberechtigte Vermehrung beider Viren (KOIKE K et al., 1995).

Die bisherige Erklärung für dieses Phänomen war die Hypothese einer lokalen Interferonproduktion, die eher zu einer Unterdrückung des HBV als des HCV führen sollte, oder eine höhere Replikationsgeschwindigkeit des HCV gegenüber dem HBV bei einer limitierten infektiösen Zellmasse, deren Translationsapparat letztendlich von beiden Viren gemeinsam genutzt wird. Genauere Untersuchungen, um diese Hypothesen zu stützen wurden jedoch nicht publiziert, zumindest konnte jedoch gezeigt werden, daß die Virusproduktion beider Viren bei einer chronischen Infektion jeweils nicht in Größenordnungen voneinander abwich, wie auch beide Viren bezüglich der Abnahme der Viruslast gleichförmig auf eine Interferongabe reagieren (NOWAK MA et al., 1996; BERG T & HOPF U, 1997).

Die Vermutung, daß eine geringere Replikation des HBV bei Vorliegen einer Ko-Infektion durch das Vorhandensein von Stop-Mutationen im Bereich der prä-Core Region des HBV bedingt sein könnte, oder daß diese bei Anwesenheit von HCV gehäuft vorkämen, konnte nicht bestätigt werden (YEH CT et al., 1994).

In der Tat erscheint es nicht offensichtlich, eine direkte Interaktion beider Viren während ihrer intrazellulären Replikation anzunehmen. Gewisse experimentelle Daten *in vitro* konnten jedoch zeigen, daß für den Repressionseffekt die Strukturproteine des HCV, insbesondere das Core-Protein zumindest mitverantwortlich sind (SHIH CM et al. 1993).

Offen bleibt jedoch die Frage, ob es sich hierbei um einen unspezifischen Mechanismus handelt (s.o.) oder ob eine spezifische Wirkung von HCV-Proteinen auf die Regulationselemente des HBV vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit soll diese Hypothese, die spezifische Interaktion von viralen HCV-Proteinen auf den Replikationsmechanismus des HBV durch Untersuchungen in Zellkulturen geprüft werden. Sollte dies gezeigt werden können, so wäre es der erste beschriebene spezifische Interaktionsmechanismus dieser Art auf der Ebene der viralen Transkription zwischen einem RNA- und einem DNA-Virus.

1.1 Das Hepatitis-B-Virus

1.1.1. Struktur und Genomorganisation

Die ersten Hinweise auf den Erreger der Hepatitis B wurden im Blut eines australischen Ureinwohners gefunden, als BLUMBERG 1963 bei der Suche nach Serumprotein-Polymorphismen auf ein bis dahin unbekanntes Antigen stieß (Australia-Antigen). Später wurde dieses Antigen auch im Blut von Hepatitis-B-Patienten gefunden, wodurch der Zusammenhang mit dem Erreger dieser Infektion hergestellt war (BLUMBERG BS et al., 1967; PRINCE AM, 1968).

Hepatitis B Virus (HBV) –Partikel wurden dann erstmals 1970 im Elektronenmikroskop als 42 – 45 nm große Partikel mit diesem Australia-Antigen (später HBsAg genannt) auf ihrer Oberfläche beschrieben (DANE DS, 1970). Im Serum, also in hydratisierter Form haben die Partikel einen Durchmesser von 52 nm (CH. JURSCH, Doktorarbeit 2000).

Das HBV ist ein umhülltes Virus mit einer partiell doppelsträngigen, zirkulären DNA (ca. 3,2 kb) als Genom. Viren mit ähnlicher Struktur und Biologie wurden in verschiedenen Tierarten gefunden, worauf die Virusfamilie Hepadnaviridae definiert wurde. Das humanpathogene HBV infiziert wie das HCV nur Menschen und im Experiment Schimpansen. Eine Pathogenität anderer Hepadnaviren für den Menschen konnte nicht gezeigt werden.

Die viralen Proteine des HBV leiten sich aus vier überlappenden, durch abweichende Leseraster definierte Leserahmen im HBV-Genom ab (ORF, s. *Abb. 1*). Dadurch wird eine hohe Konzentration genetischer Information auf einem einzelnen DNA-Molekül erreicht.

Im Virion ist das zirkuläre Genom teilweise doppelsträngig, aber nicht kovalent geschlossen. Dies besteht aus einem vollständigen Strang mit negativer Polarität und einem unvollständigen mit positiver Polarität. Am 5'-Ende des negativen Stranges ist ein virales Protein kovalent gebunden (GERLICH WH & ROBINSON WS, 1980). Intrazellulär erfolgt eine Komplettierung des Genoms zu einer kovalent geschlossenen, zirkulären DNA (cccDNA), die dann der zellulären RNA-Polymerase II als Matrize zur Verfügung steht. Die Replikation des HBV läuft über ein prägenomisches Intermediat, das wiederum einer reversen Transkription unterliegt

(SUMMERS J & MASON WS, 1982). Aus diesem Grund wird das HBV auch der Gruppe der Pararetroviren zugeordnet, und damit seine Verwandtschaft zu den echten Retroviren betont.

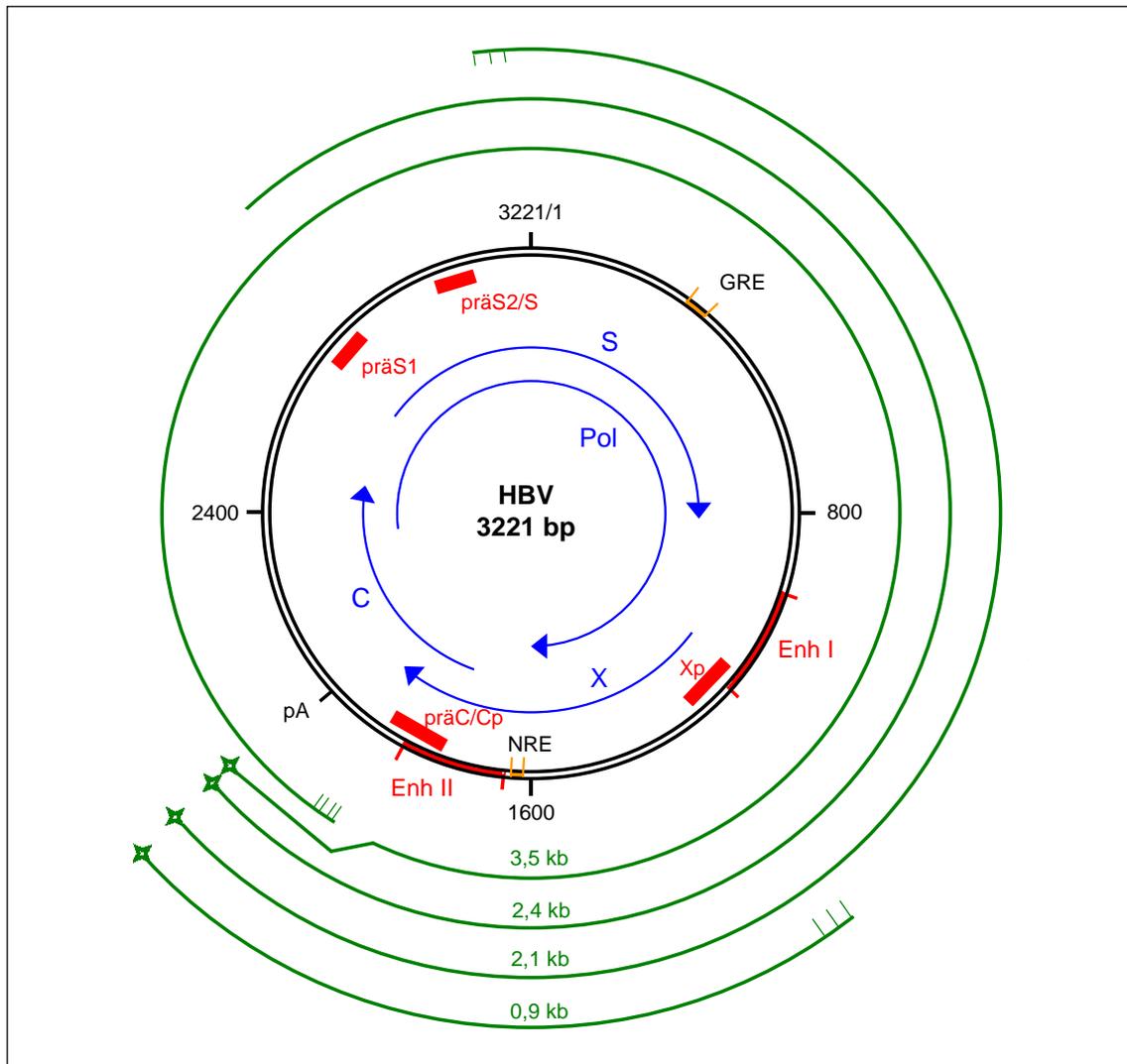


Abb. 1 Genomorganisation des HBV (adw2): blau: Leserahmen für Oberflächenproteine, Core, Polymerase und X-Protein. Grün: Transkriptionsprodukte mit alternativen Initiationsstellen (kleine Striche). Rot: Regulationselemente, Enh: Enhancer, präC/Cp: prä-Core/Corepromotor, Xp: X-Promotor. pA: Polyadenylierungsstelle, NRE: Negativ-regulatorisches Element, GRE: Glucocorticoid-responsibles Element. Weitere Abkürzungen im Text. EcoRI-Schnittstelle am Beginn des präS2-Gen = pos. 1

Die Leserahmen codieren für vier Transkriptionsprodukte von 3,5 / 2,4 / 2,1 und 0,7 kb Länge. Es existiert nur ein einzelnes Polyadenylierungs-Signal (pA), so daß alle HBV-RNA-Transkripte das gleiche 3'-Ende besitzen. Die Translationsprodukte sind jeweils für das präCore/Core-Gen das Core-Protein bzw. das HBeAg,

für die S-Region die drei Oberflächenproteine S, präS1 und präS2, für das Pol-Gen die virale Polymerase mit Funktionen einer Reversen Transkriptase, RNase H, DNA-Polymerase und schließlich das X-Gen, das für das X-Protein mit unbekannter Funktion codiert.

Ein aus dem 5'-Bereich des präC/Core-Gens abgeleitetes Protein, das HBeAg, ist bei allen Hepadnaviren zu finden. Es ist für den Lebenszyklus des HBV nicht notwendig, findet sich jedoch in unterschiedlicher Länge in fast allen Zellkompartimenten (BRUB V & GERLICH WH, 1988) und wird sezerniert. Seine Funktion wird im Zusammenhang mit der Viruspersistenz und der Immunantwort gesehen: hohe HBeAg-Titer werden bei hoch-virämischen Patienten mit geringer Symptomatik gefunden (CARMAN WF et al., 1989).

1.1.2. Regulationselemente des HBV-Genoms

Insgesamt sind vier Promotoren innerhalb des HBV-Genoms charakterisiert:

Der präCore/Core-Promotor (Cp), präS1-Promotor (P_{preS1}), S-Promotor ($P_{\text{preS2/S}}$, auch präS2-Promotor genannt) und der X-Promotor (Xp).

Neben den Promotoren finden sich weitere regulative Elemente wie die beiden Enhancer. Überlappend zum X-Promoter liegt der Bereich des Enhancers I (nt 970-1240, SHAUL Y et al., 1985; GUO WT et al., 1991), entsprechend der Enhancer II (nt 1636-1741) (YUH CH et al., 1990) im Bereich des Core-Promotors (nt 1591-1850, LOPEZ-CABRERA M et al., 1990). Stromaufwärts vom Enhancer I befindet sich zusätzlich ein Bereich, an den ein intrazellulärer Glucocorticoid/Rezeptor-Komplex bindet (GRE, glucocorticoid responsive element), und dadurch die Aktivität des Enh I 2–5fach erhöht werden kann (KOSOVSKY MJ et al., 1998).

Die Enhancer wirken *per definitionem* orientierungs- und positionsunabhängig auf die Promotoren. Beide Enhancer sind in der Lage, alle vier Promotoren zu regulieren. Dies ist vor allem durch die räumliche Nähe der Regulationselemente zueinander auf der zirkulären DNA verständlich (SU H et al., 1992).

Zelluläre Transkriptionsfaktoren (TF) wirken in sehr komplexer Form auf die Aktivität der hepadnaviralen Enhancer bzw. der Promotoren (Abb. 2 und 3). Zu ihnen gehören leberspezifische TF, die für die Gewebsspezifität des HBV mitverantwort-

lich sind und eine Replikation in nicht-permissiven Zellen verhindern, sowie ubiquitär vorhandene TF.

Zu den ersteren zählt der Transkriptionsfaktor HNF4 (Hepatocyte nuclear factor) (GUO W et al., 1993), HNF1 (CHANG HK et al., 1989) und das C/EBP α (CCAAT-Enhancer binding protein) (LOPEZ-CABRERA M et al., 1990); typische ubiquitäre Faktoren sind das Sp1 (SV40 promoter protein 1), der COUP-TF1 (Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor), NF-1 (nuclear factor 1) und das AP-1 (activator protein 1). Transkriptionsfaktoren, die der Familie der Kernrezeptoren angehören, können aktivierende wie auch reprimierende Aktivitäten entfalten (RANEY AK et al., 1997).

Die Bindungstellen für die Transkriptionsfaktoren auf dem HBV-Genom überlappen sich teilweise; ein Zusammenwirken aller Faktoren ist u.a. für die differenziert abgestimmte Expression beim zeitlichen Ablauf der Infektion verantwortlich (SU H & YEE JK, 1992). Die Regulation des Enhancer II erklärt vorwiegend die strikte leberspezifische Transkription (YEE JK et al., 1989).

Der präS1-Promotor besitzt ein klassisches TATA-Box Motiv mit einer Bindungsstelle für das TATA-Box bindende Protein (TBP). Der Core-Promotor besitzt neben einer TBP-Bindungsstelle ein YY1 (Yin und Yang 1)-Initiationsmotiv, daß nur bei Integration des HBV in das zelluläre Genom eine regulatorische Funktion besitzt (NAKANISHI-MATSUI M et al., 2000).

Im Bereich des Core-Promotors/Enh II fanden sich verschiedene Varianten, die Einfluß auf die HBV-Replikation und differentielle Expression viraler Proteine haben (GÜNTHER S et al., 1996). So wurde eine Mutante mit einer 8bp-Deletion der nt 1763-1770 im Bereich des sogenannten „basic core promoter“ (B3, *Abb. 2*) beschrieben, die im Zusammenhang mit einer erhöhten Replikationsrate des HBV bei chronischen Infektionen und einer Abnahme der präC-mRNA und dem HBeAg führt (SCAGLIONI PP et al., 1997) steht. Sie tritt vor allem gehäuft bei immunsupprimierten Patienten auf, und wurde in Gießen bei Kindern entdeckt, die unter einer cytostatischen Chemotherapie mit HBV infiziert worden waren (REPP R et al., 1993).

Eine andere häufige Mutation im Bereich des B3 des Core-Promotors/Enhancer II ist der kombinierte Basenaustausch nt 1762 A/T, 1764 G/A. Sie tritt gehäuft bei anti-HBe-positiven Patienten auf und bewirkt eine Reduktion des HBeAg; dies steht offenbar in Zusammenhang mit einer schnell replizierenden Virusvariante (BUCKWOLD VE et al., 1997).

Die Darstellung der Enhancer-Bereiche (*Abb. 2 und 3*) zeigt die Bindungstellen für ubiquitäre und leberspezifische Transkriptionsfaktoren (TF). Bezüglich des Enhancers II ist zu erkennen, daß die beschriebenen Mutationen im Bereich der Bindungsstelle für COUP-TF1 und 2 zu finden sind, der bezüglich seiner reprimierenden Wirkung auf die zelluläre mRNA-Expression häufig untersucht wurde (TSAI SY & TSAI MJ, 1997). Insbesondere ist seine Silencer-Funktion im Zusammenhang mit Ko-Repressoren beschrieben (SHIBATA H et al., 1997).

Ergänzend ist stromaufwärts von EnhII ein Negativ-regulatorisches Element (NRE) des prägenomischen Promotors im Bereich nt 1613-1636 (Kernelement nt 1616 – 1621) beschrieben worden (LO WY & TING LP, 1994), das in der Lage ist, in Gegenwart des Enhancers II diesen zu reprimieren, für sich alleine jedoch kaum inhibitorische Wirkung besitzt.

Abb.2

Sequenz der Enhancer II / Core-Promotor-Region des HBV (Genotyp A)

und ihrer Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren (Die Einteilung des Enh II in die Abschnitte A bis B3 ist angezeigt)

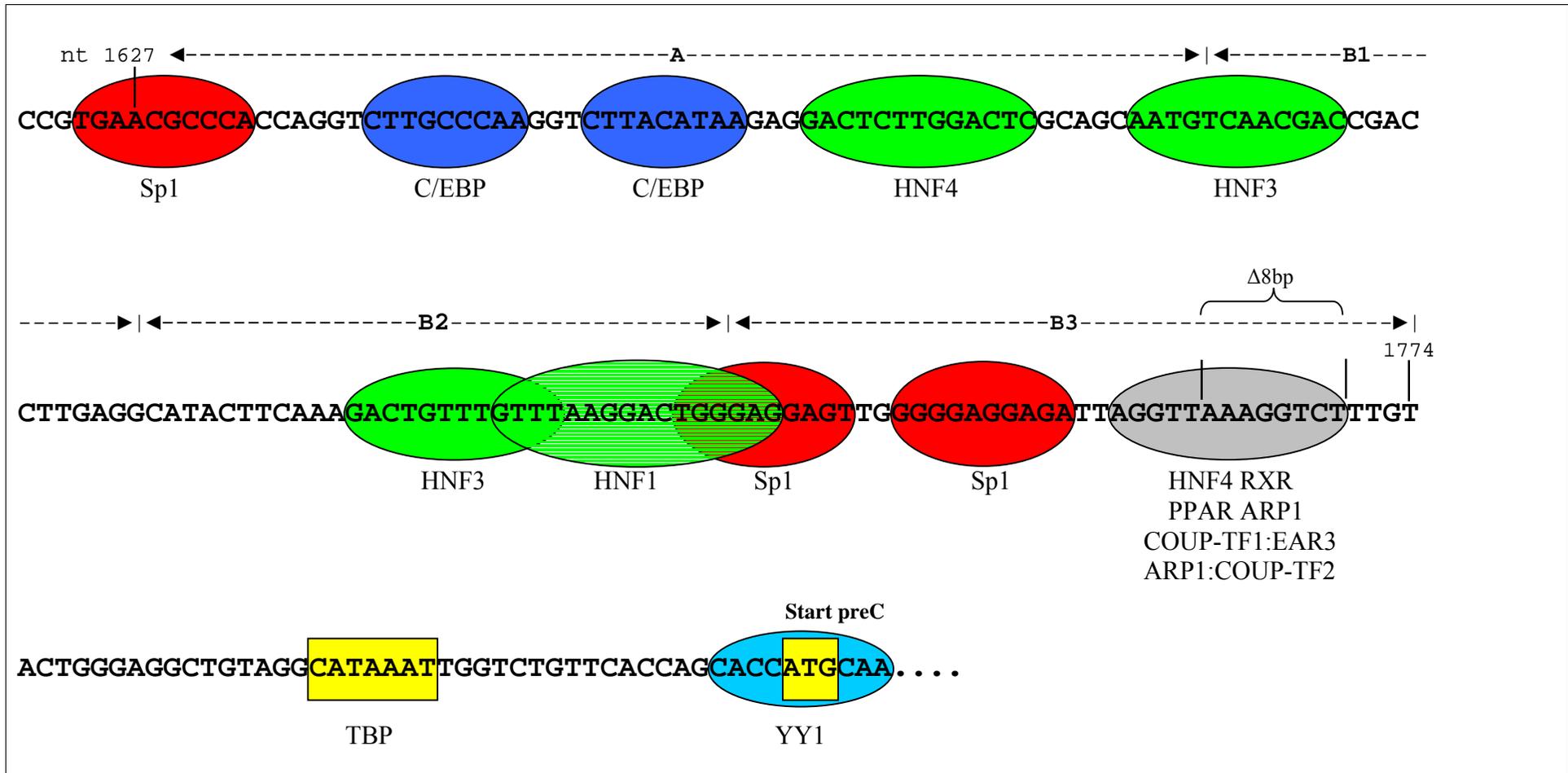
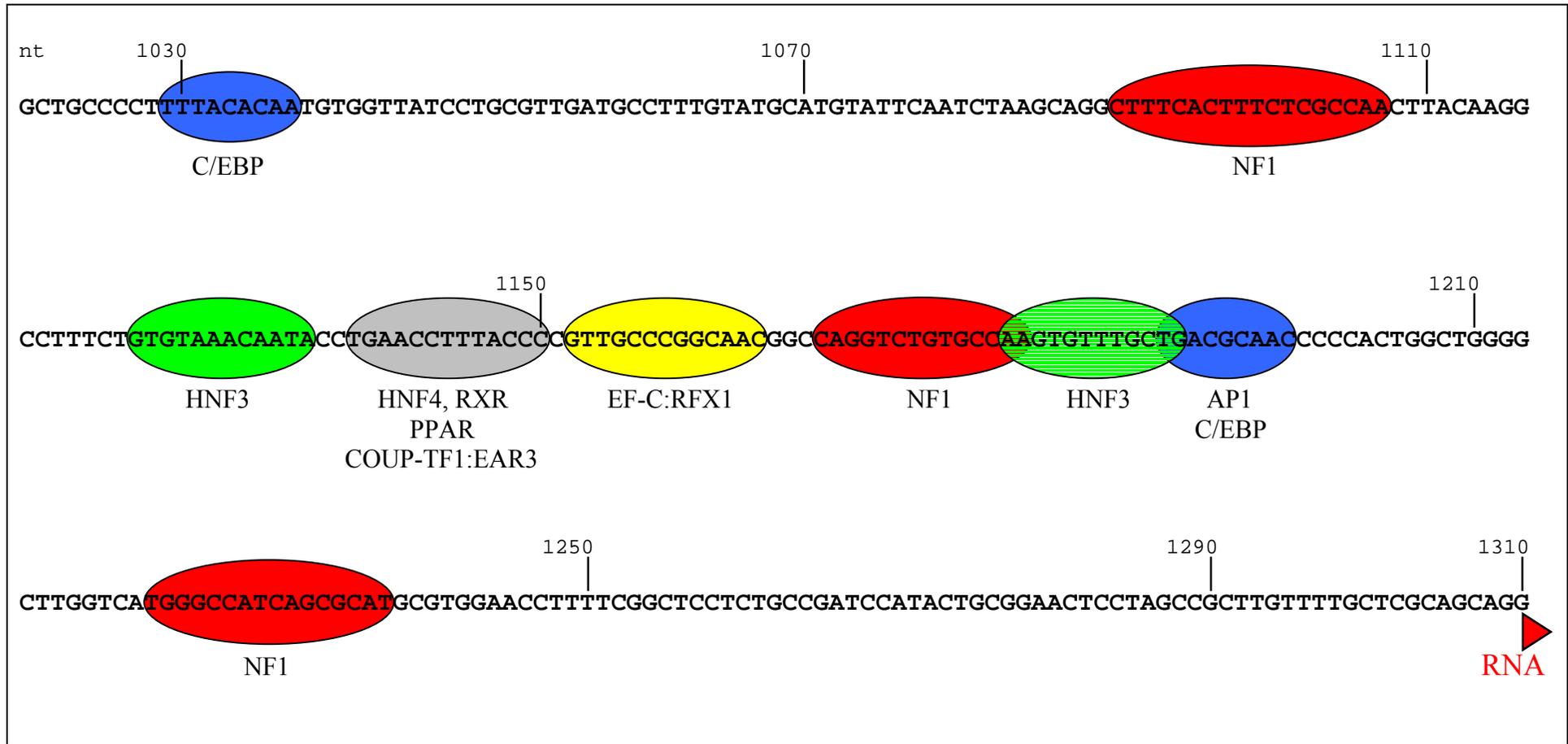


Abb. 3: Sequenz der Enhancer 1 / X-Promotor-Region des HBV (Genotyp D)



1.1.3. Klinik der HBV-Infektion

Das HBV wird i.d.R. durch virushaltiges Blut und Blutprodukte übertragen, ebenfalls virushaltig sind Sperma, Speichel, Urin, Vaginalsekret und Tränenflüssigkeit. Eine Übertragung erfolgt zumeist parenteral/sexuell. Nach einer Inkubationszeit von 2-6 Monaten entwickelt sich bei 10-20 % der Infizierten eine akute Hepatitis mit Ikterus, Transaminasenerhöhung, Fieber, Myalgien u.a; weniger als 0,1 % entwickeln einen fulminanten Verlauf mit meist tödlichem Ausgang.

Die Rekonvaleszenz nimmt je nach Konstitution mehrere Wochen in Anspruch. Der überwiegende Teil der Infektionen verläuft jedoch inapparent. Bei etwa 10 % der Patienten mit akuter Hepatitis B persistiert das HBsAg im Serum mehr als 6 Monate, es entsteht eine chronische Verlaufsform (die Chronifizierungsraten liegen bei Kleinkindern und Neugeborenen zwischen 50 und 90 %).

Die chronische Verlaufsform kann ausschließlich persistierend oder auch chronisch-aktiv sein, je nachdem wie stark die virusinduzierte, inflammatorische Aktivität ist. Die chronisch-aktive B-Hepatitis führt nach Jahren zu einem zirrhotischen Umbau der Leber und in ca. 0,5 % der Fälle zur Entwicklung eines primären hepatozellulären Karzinoms (BUENDIA MA et al., 1998).

Die klassischen serologischen Parameter für eine chronisch-aktive Hepatitis B sind neben der Persistenz des HBsAg erhöhte Serum-Transaminasen, zumindest intermittierend der Nachweis von HBV-DNA im Serum als Zeichen der fortlaufenden Virusreplikation, sowie das Fehlen von anti-HBs-Antikörpern.

Unter den persistierenden Formen ist die Möglichkeit asymptomatischer Träger (mit HBsAg im Serum) von besonderer Bedeutung, da diese oft unerkannte Quellen für HBV-Infektionen darstellen.

1.2 Das Hepatitis-C-Virus

Seit erstmals über ein infektiöses Agens als Erreger der Non-A-Non-B-Hepatitis berichtet wurde (PRINCE AM et al., 1974), das seit der genomischen Charakterisierung als Hepatitis C Virus bezeichnet wird, beruhte die Erforschung dieses Virus hauptsächlich auf Experimenten an Schimpansen. Bis heute ist eine Anzucht des Virus in Zellkulturen nicht zweifelsfrei gelungen. Auch die erstmalige Klonierung und Charakterisierung eines HCV-Genomfragmentes (5-1-1) gelang 1989 aus dem Serum eines NANB-Hepatitis infizierten Schimpansen (CHOO QL et al., 1989). Ausgehend von diesem Klon konnten die ersten serologischen Testverfahren mit Hilfe des C100-Antigens entwickelt werden, so daß die eigentliche Erforschung des HCV nun erst beginnen konnte. Diese ist jedoch, gerade bei Untersuchungen der Virusreplikation und der zellulären Effekte von HCV-Proteinen, weiterhin auf indirekte molekularbiologische Methoden angewiesen.

1.2.1. Genomorganisation und virale Proteine

Schon 1985 wurde postuliert, daß das HCV ein umhülltes, einsträngiges RNA-Virus mit positiver Polarität ist (BRADLEY DW, 1985); dies wurde durch die Klonierung und Sequenzierung des gesamten Genoms bestätigt (KATO N et al., 1990). Die HCV-RNA enthält ca. 9,6 kb und codiert einen einzigen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF), dessen Translationsprodukt ein Polyprotein von 3011 bis 3033 Aminosäuren darstellt. Am 5'-Ende der linearen RNA sind die Gene für die Strukturproteine (Core, Envelope) lokalisiert, ihnen folgen die Abschnitte für die Nicht-Strukturproteine, also den viralen Funktionsproteinen wie Proteasen und virale RNA-Polymerase (*Abb. 4*).

Flankiert wird dieser ORF von endständigen, nicht-kodierenden Regionen (NCR, non-coding regions), im 5'-Bereich von einer hochkonservierten 341 Nukleotide umfassenden Region, und am 3'-Ende einer Sequenz von variabler Länge (27-66 Nukleotide), an die sich ein Poly-Uracil-Trakt von 20-90 Nukleotiden anschließt. Dieser Poly-U-Trakt kann von mehreren Cytidinresten unterbrochen sein (TANAKA T et al., 1996); ihm folgt ein hochkonservierter Bereich von 98 Nukleotiden Länge (KOLYKHALOV AA et al., 1996).

Die 5'-NCR bildet durch komplementäre Basenpaarung mehrere stabile Sekundärstrukturen aus, darunter die RNA-Schleife III (nt 125-323), die das Startkodon

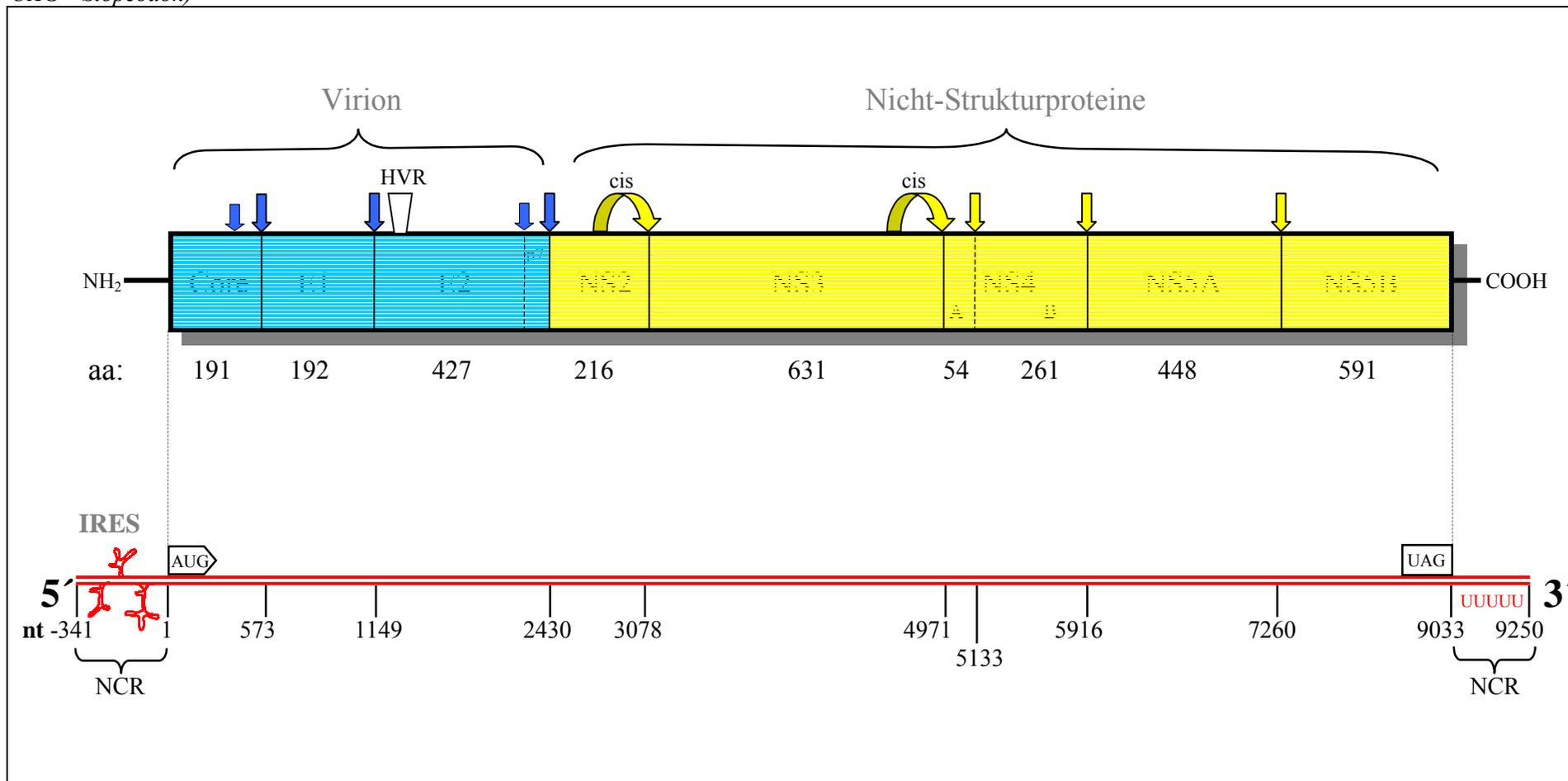
AUG umfassende RNA-Schleife IV (nt 331-354) sowie eine RNA-Suprastruktur, auch Pseudoknoten genannt (nt 305-311 und 325-331), die sich in unmittelbarer Nähe des Startkodons befindet (BROWN RA et al., 1992). Diese Formationen, insbesondere die RNA-Schleife IV und der Pseudoknoten haben offenbar eine bedeutende Funktion für die virale Replikation: die RNA-Schleife IV besitzt Eigenschaften einer „Internen ribosomalen Eintrittsstelle“ (IRES), wie sie bei Picornaviren zur 5'-Cap-unabhängigen Translation führt (TSUKIYAMA KK et al., 1992). Der Pseudoknoten kommt in dieser Form analog auch bei Pestiviren vor, und ist hier essentiell für den internen Translationsstart (WANG C et al., 1995).

Aufgrund dieser Charakterisierung wurde das HCV als drittes Genus Hepacivirus in die Familie der Flaviviridae gruppiert (FRANCKI RIB et al., 1991; HEINZ FX et al., 1999). Zu den anderen beiden Genera dieser Familie, den Flaviviren und den Pestiviren, besteht vor allem Ähnlichkeit in Bezug auf die Genomorganisation und das Hydrophobizitätsprofil des Polyproteins, weniger aufgrund von Sequenzhomologien. Ein Korrelat zu dem mutmaßlich an der Replikation von Flaviviren beteiligten, membranassoziierten NS1-Protein, findet sich beim HCV jedoch nicht. Zu den Flaviviren zählt man unter anderem das Gelbfiebertvirus (YFV), die Dengue-Viren, das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME oder TBE, Tick-borne Encephalitis Virus) und das Japanische Enzephalitis Virus; zu den Pestiviren gehören bislang ausschließlich tierpathogene Vertreter, darunter das Bovine Virus-Diarrhöe Virus (BVDV) und das Virus der klassischen Schweinepest (Classical Swine Fever Virus, CSF).

Das Polyprotein des HCV wird durch zelluläre und virale Proteasen in wahrscheinlich zehn einzelne virale Proteine aufgespalten (s. *Tab.1*). Dabei finden sich die möglichen und zum Teil experimentell bestätigten Schnittstellen der, sich im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindlichen, zellulären Signalpeptidase (Signalase) ausschließlich im Bereich der Strukturproteine. Diese werden also im Verlauf der Translation wohl als erste kotranslational freigesetzt. Die weitere Spaltung und Freisetzung der Nicht-Strukturproteine (NS2 bis NS5B) erfolgt durch die Aktivität der viralen Serin-Protease NS3-4A und durch die Autoprotease NS2-3 (vgl. *Abb.4*).

Abb. 4 Genomstruktur und Polyprotein des Hepatitis C Virus

(Die Positionen der Nukleotide beziehen sich auf das erste Codon des HCV-ORF, die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) ist schematisch wiedergegeben, ebenso die 3'-Nichtkodierende Region (NCR). Signalase-Schnittstellen sind mit großen blauen Pfeilen markiert, kleine blaue Pfeile geben mögliche Signalase-Schnittstellen an. Gelbe Pfeile zeigen Schnittstellen der NS3-4a-Protease (bzw. NS2-Autoprotease). HVR= Hypervariable Region des E2, AUG= Startcodon, UAG= Stopcodon)



Tab.1 Produkte der Polyproteinspaltung des HCV

<i>HCV-Protein</i>	<i>MW (kd)</i>	<i>Spaltung (C-terminal)</i>	<i>Funktion</i>
C (Core)	p21, (p19) p16, p14 ?	Signalase	Nukleokapsid Phosphoprotein
E1 (Envelope)	gp35	Signalase	Hüllprotein 1 N-Glykosylierung
E2 (Envelope)	gp70	Signalase	Hüllprotein 2 N-Glykosylierung
p7	p7	Signalase und ?	ER-Ankersequenz ?
NS2	p23	Autoprotease	Autoprotease NS2-NS3 Zn ²⁺ -Metalloprotease
NS3	p70	Ser-Protease (Autoprotease)	Serinprotease RNA-Helikase NTPase
NS4A	p4-10	Ser-Protease	Kofaktor für ER- Assoziation der NS3- Protease
NS4B	p27	Ser-Protease	Transmembranprotein
NS5A	p56	Ser-Protease	? Phosphoprotein Interferonresistenz ?
NS5B	p68	Ser-Protease	RNA-abhängige RNA- Polymerase

1.2.2. Genotypen des HCV

Die genetische Diversität des HCV führte zur Unterscheidung von bislang 6 Genotypen (bezeichnet mit den Ziffern 1 - 6); die Genotypen ihrerseits können in mindestens 30 weitere Subtypen (a, b, c usw.) unterschieden werden (SIMMONDS P et al., 1994). Auf Genomebene unterscheiden sich bereits HCV-Subtypen nicht unwesentlich voneinander: isolierte NS5-Sequenzen verschiedener Genotypen differieren um 28 – 44 %, verschiedener Subtypen um 12 – 22 % (SIMMONDS P et al., 1993).

Die Genotypen und Subtypen zeigen eine unterschiedliche geographische und epidemiologische Verteilung; so findet man in Nordamerika und Mitteleuropa vorwiegend die Genotypen 1, 2 und 3, in Afrika den Genotyp 4. Der in Deutschland überwiegende Subtyp 1b (44%) und bei jüngeren Patienten zunehmende Subtyp 1a (36 %), machen die Mehrzahl der Fälle aus (ROSS RS et al. 2000). Der Subtyp 3a (13 %) zeigt eine gewisse Häufung bei HCV-Infektionen durch intravenösen Drogengebrauch.

Unterschiede in der Virulenz verschiedener Genotypen ließen sich bislang nicht eindeutig darstellen, da häufig Kofaktoren in den Patientenkohorten die Aussagen relativieren. Gesichert gilt jedoch, daß die Subtypen 2a/c häufiger (50% im Vergleich zu 18%) bei Patienten mit HCV-assoziiierter Kryoglobulinämie oder lymphoproliferativen Erkrankungen gefunden werden (ANDREONE P et al. 1998). Auffällig ist auch die Erhöhung des Erkrankungsrisikos für ein primär hepatozelluläres Karzinom bei Subtyp 1b. Die mögliche erhöhte biologische Aktivität des Subtyps 1b zeigt sich in mehreren Studien auch bezüglich eines geringeren Ansprechens auf eine Interferontherapie (MONDELLI MU & SILINI E, 1999). Der Genotyp 1 gilt daher generell als unabhängiges Kriterium für eine schlechtere Therapieprognose, was auch an der unzureichenden Differenzierung des Subtyps 1a von 1b in routinemäßig angewandten Testverfahren liegen dürfte.

Da Studien aus Europa und Japan widersprüchliche Aussagen über die Interferon-Resistenz und den klinischen Schweregrad der chronischen Hepatitis C bei Genotyp 1b lieferten, ist die These über eine Untergliederung des Genotyps 1b in die Subpopulationen J (japan), NJ (non-japan) und W (worldwide) womöglich hilfreich, da sie bei Anwendung auf die Patientenkollektive zu klareren Aussagen führen (NAKANO I et al., 1999). So gibt es Hinweise, daß die 1b-Subpopulation J eher mit Interferon-Resistenz assoziiert werden kann als die Subpopulation W (NAKANO I et al., 2000, eingereicht).

1.2.3. Struktur und Prozessierung des HCV-Core-Proteins

Bereits bei der ersten Publikation einer HCV-Sequenz vermutete man in Analogie zu den Flavi- und Pestiviren im N-Terminus des möglichen Polyproteins das Nukleokapsid des Virus. Insbesondere die Arginin-reichen Abschnitte legten eine RNA-bindende Domäne nahe. Verglichen mit den Core-Proteinen anderer Flaviviren ist das HCV-Core-Protein um ca. 70 Aminosäuren größer.

Bei der Gattung Flavivirus erfolgt normalerweise eine Reifung des Core-Proteins durch Abspaltung einer kurzen C-terminalen Ankersequenz, des M- (Membran) bzw. des präM-Proteins durch die virale NS3-Protease (LOBIGS M, 1993). Dieser Reifungsschritt ist beim HCV nicht nachgewiesen, obwohl er bei Flaviviren für die Verankerung des Polyproteins in der ER-Membran von großer Bedeutung ist (WENGLER G et al., 1985).

Beim Vergleich mit anderen Flaviviridae finden sich in der Sequenz des HCV-Polyproteins mögliche analoge Schnittstellen für die kotranslationale Abspaltung des Core-Proteins vom E1-Protein, wie auch für die mögliche weitere Prozessierung. (s Abb. 6)

Bei der Betrachtung des Hydrophobizitätsprofils (Abb. 5) des HCV-Core-Proteins ist eine Aufteilung in zwei unterschiedliche Hauptdomänen auffällig: Ein relativ hydrophiler, basischer N-Terminus bis etwa zur aa120, sowie ein überwiegend hydrophober C-Terminus, der durch zwei mögliche α -helikale Abschnitte charakterisiert ist.

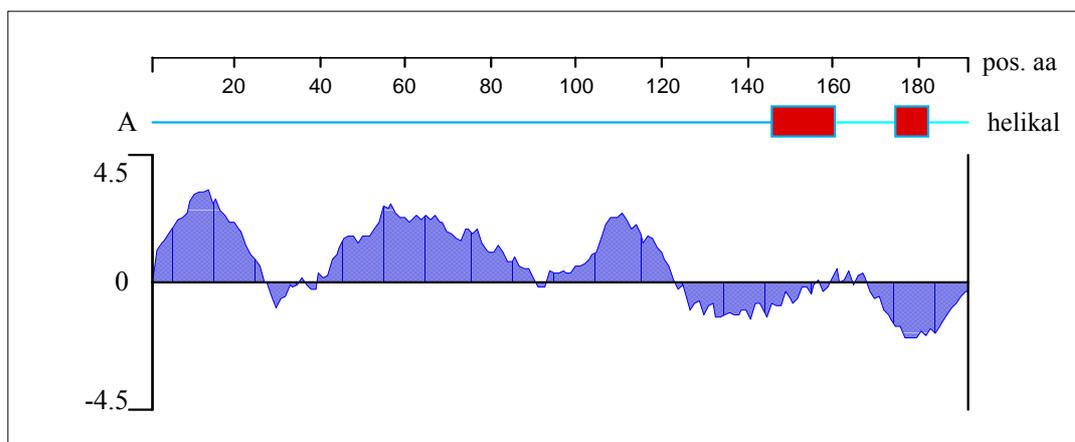


Abb.5 Hydrophobizitätsprofil des HCV-Core Proteins [M58335]

Berechnung der relativen Hydrophobizität mit der Methode nach KYTE und DOOLITTLE (1982), mögliche helikale Abschnitte (rot) wurden nach der Methode von CHOU-FASMAN (CHOU PY, 1990) bestimmt. Programm Protean, DNASTAR Inc., Madison, USA.

Dieser C-Terminus wurde anfänglich von manchen Autoren mit dem M-Protein der Flaviviridae in Verbindung gebracht, obwohl ein entsprechender Funktionsnachweis dieser Domäne experimentell nicht erbracht wurde. Einen Überblick über die funktionell relevanten Sequenz-Motive des Core-Proteins gibt *Abb. 6*:



Abb.6: Sequenz des HCV-Core-Proteins (Genotyp 1b, [M58335])

Geladene Aminosäuren sind durch +/- gekennzeichnet. Eingerahmt: basische Abschnitte, grün: mögliche helikale Domänen (berechnet nach der Methode von Chou & Fasman 1990), blau: DNA-Bindemotiv, unterstrichen: mögliche nukleäre Lokalisationssignale, gelb: mögliche Phosphorylierungsstellen der Proteinkinasen A bzw. C, ▼ : mögliche Schnittstellen. (s. Text)

Betrachtet man die möglichen Schnittstellen innerhalb der ersten 200 aa des HCV-Polyproteins, so ergeben sich beim direkten Vergleich mit typischen Sequenzen von Flaviviren Hinweise auf eine Prozessierung des HCV-Polyproteins (s. *Abb. 7*).

Die dritte Schnittstelle C/prämM der Flaviviren ist in dieser Form bei HCV aus Sequenzhomologien nicht abzuleiten. Es ist aber zu diskutieren, ob eine weitere mögliche Schnittstelle des HCV-Core-Proteins vorhanden ist, da bei *in vitro* Expressionsmodellen das Core-Protein in drei verschiedenen Molekulargewichten, 14, 16 und 21 kD, nachgewiesen wurde (in manchen Publikationen auch 19 kD). Eine hypothetische Schnittstelle ergäbe sich bei Betrachtung der Verteilung der helika-

len Domänen; so nehmen wir an, daß sich direkt nach der ersten möglichen hydrophoben Helix bei Position 148 eine weitere Schnittstelle befinden könnte, die einem Produkt mit ca. 16 kD entsprechen würde.

Die Abspaltung des N-terminalen Methionins erfolgt bei HCV wohl ebenfalls analog den Flaviviren und anderer zellulärer Proteine durch die zelluläre, cytosolische Methionin-Aminopeptidase; für diese Vermutung spricht auch das Serin an Position 2 des HCV-Core-Proteins.

Abb. 7: Vergleich bekannter Schnittstellen der Core- und präM/M Proteine von Flaviviren mit Sequenzabschnitten des HCV-Core-Proteins

(blau: Signalase-Erkennungsstelle, rot: basische Erkennungsstellen, unterstrichen: Leucinreiche Abschnitte, TBE = Tick-borne Enzephalitis Virus [Q01299], JEV = Japanisches Enzephalitis Virus [P32886], DE3 = Dengue Virus Typ 3 [P27915], YFV = Gelbfieber-Virus [P29165], HCV [M58335]; am Ende sind jeweils die Schnittpositionen angegeben)

a) Schnittstelle M/E bzw. C/E1 (Signalase):

HCV	CSFSIFLLALLALLSCLTTP ASA ↓ YEVHNV (↓aa191)
TBE	TLESV <u>V</u> TRVAVLVVLLCLAPV YA ↓ SRCTHL (↓aa280)
JEV	LGSNNGQRV <u>V</u> FTILLLLLVAP AYS ↓ FNCLGM (↓aa294)
DE3	IGTSLTQKV <u>V</u> IFILLMLVTP SMT ↓ MRCVGV (↓aa280)
YFV	VGSNMTQRV <u>V</u> IALLVLAVGP AYS ↓ AHCIGI (↓aa285)

b) Schnittstelle „präM/M“ (bei Flaviviren durch Golgi-Protease):

HCV	RPTDRRR ↓ SRNL (aa115)
TBE	QEGS RRR ↓ SVLI (aa205)
JEV	RHSKRRR ↓ SVSV (aa219)
DE3	GEH RDKR ↓ SVAL (aa205)
YFV	GRSRRRR ↓ AIDL (aa210)

c) Schnittstelle C/präM (bei Flaviviren durch virale NS3-Protease):

TBE	QKRGKRRSATDWMSWLLVITLLG ↓ MTLAAT (aa112)
JEV	RGGNEGSIMWLASLAVVIAY AGA ↓ MKLSNF (aa127)
DE3	LSIINKRKKTS <u>SLCLMMML</u> PAT LA ↓ FHLTSR (aa114)
YFV	KRRSYEVLTVQFL <u>ILGMLL</u> MTGG ↓ VTLVRK (aa121)

Die drei *in vitro* gefundenen Core-Proteine zeigen ein unterschiedliches zelluläres Verteilungsmuster. So ist das 21 kD-Protein ausschließlich im Cytoplasma zu finden, vorwiegend am ER und an hydrophobe subzelluläre Strukturen assoziiert, z.B. dem Apolipoprotein A II in intrazellulären Fettvakuolen (BARBA G et al., 1997). Eine Bindung des Core-Proteins an die C-terminalen 98 Aminosäuren der intrazellulären Domäne des Lymphotoxin- β Rezeptors (CHEN CM et al. 1997) und den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (ZHU N et al., 1998) konnte gezeigt werden. Das C-terminal trunkeerte 16 kD-Core-Protein ist überwiegend im Nukleus lokalisiert (RAVAGGI A et al., 1994); das nukleäre Lokalisationssignal PRRGPR (pos. 38-43) scheint für diesen Transport in den Kern verantwortlich zu sein (SUZUKI R et al., 1995) ebenso das gleichzeitige Vorhandensein des 21 kD-Proteins (LIU Q et al., 1997). Die nukleäre Lokalisation dieser HCV-Core-Fragmente ist unerwartet, da der Lebenszyklus des Virus sich ausschließlich im Cytoplasma abspielt. Das Core-Protein wird nicht im Nukleus sondern am ER zur Bildung der Viruskapside benötigt. Möglicherweise ist mit diesem Phänomen ein viraler Pathogenitätsfaktor verbunden; denkbar wäre der Zusammenhang mit der Fähigkeit des HCV zur Chronifizierung.

Interessant war die Entdeckung, daß die Aminosäure an Position 9 einen entscheidenden Einfluß auf die Prozessierung des Core-Proteins zu haben scheint. Befindet sich hier ein Lysin, so findet eine Reifung zu p16 (bzw. p19) statt. Ist diese durch ein Arginin ausgetauscht, so findet sich nur das p21 (LO SY et al., 1994). Eine genaue Schnittstelle für eine Reifung zu p19 konnte nicht bestimmt werden. Diese könnte aber bei Leucin-179 oder Leucin-182 vermutet werden.

Neben den originären Aufgaben eines Core-Proteins, also der Bindung an virale Nukleinsäure und ihre Verpackung im Virion, scheint das HCV-Core-Protein also noch weitere Effekte in eukaryoten Zellen zu verursachen, die möglicherweise die Virusreplikation unterstützen, zur Transformation der Zelle führen oder die Immunevasion mit ermöglichen. Eine Verminderung der T-Zell-Antwort mit geringerer Produktion von γ -Interferon und Interleukin-2 durch das Core-Protein (LARGE MK et al., 1999) legt einen immundepressiven Effekt nahe. Die Bezeichnung „multifunktionales Protein“ für das HCV-Core wurde in diesem Zusammenhang häufig genannt.

1.2.4. Epidemiologie und klinischer Verlauf

Das HCV wird parenteral durch Blut und Blutprodukte übertragen, eine sexuelle Übertragung ist im Vergleich zur HBV-Infektion wohl ein eher seltenes Ereignis. Auffällig ist der mit bis zu 40% große Anteil an Infizierten, bei denen kein dem Patienten bekanntes anamnestisches Risiko einer parenteralen Übertragung erfragt werden kann; diese Fälle werden als „community acquired“ bezeichnet. In den USA konnte eine Prävalenz der antiHCV-Ak von 1,8 % festgestellt werden (ALTER MJ et al., 1999), in Deutschland 0,63 % (PALITZSCH KD et al., 1999).

Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 26 Wochen, welche von Prodromalzeichen ähnlich eines grippalen Infektes mit eventl. gastrointestinalen Symptomen begleitet sein kann. Das akute Bild einer Hepatitis C findet sich nur in 5-10 % der Fälle, diese verläuft in Bezug auf Ikterus und Transaminasenanstieg jedoch milder als eine akute HBV-Hepatitis. Fulminante Infektionsverläufe sind die große Ausnahme.

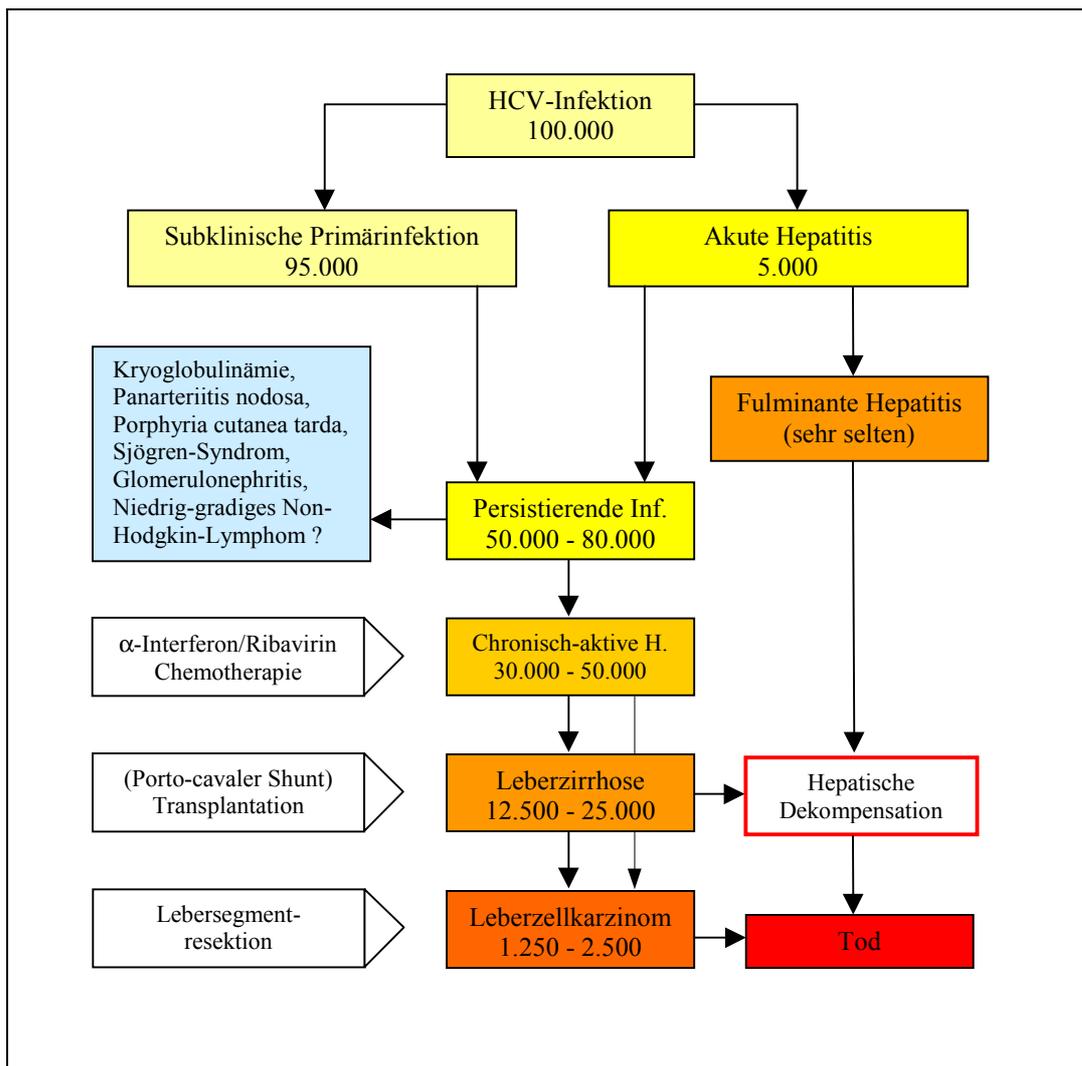


Abb. 8 *Klinische Manifestationen und Therapieoptionen einer HCV-Infektion*

Eine Persistenz des HCV findet bei mindestens 50, eher 80% der Infektionen statt, die auf dem Boden einer chronisch-aktiven Hepatitis zur Leberzirrhose und zum Leberzellkarzinom führen kann; dieser Prozess nimmt in der Regel 20-30 Jahre bis zum Vollbild der Leberzirrhose in Anspruch; dies kann beim Vorliegen zusätzlicher hepatotoxischer Faktoren (Alkohol, Aflatoxine, Medikamente) deutlich verkürzt sein.

Auffällig ist eine Assoziation der HCV-Infektion mit vaskulitischer Purpura, gemischter Kryoglobulinämie, membranoproliferativer Glomerulonephritis, Sjögren-(Sicca-)Syndrom, Panarteriitis nodosa oder Porphyria cutanea tarda (MANNING MP und RAMBUSCH EG, 1997). Dies könnte im Zusammenhang mit einer extrahepatischen Replikation des HCV in lymphatischen Zellen (ZIGNEGO AL et al., 1995) oder einer Bildung von Immunkomplexen zu sehen sein.

1.3 HBV/HCV-Koinfektion

1.3.1. Epidemiologie

Die hohe Prävalenz von HBV/HCV-Koinfektionen erklärt sich nicht nur in einem gemeinsamen Übertragungsweg, hier vor allem Blutprodukte und i.v.-Drogenabusus, sondern auch durch einen Effekt, den man „epidemiologisches Pooling“ nennen könnte. Er resultiert durch die Akkumulierung von chronifizierenden Infektionen innerhalb eines Individuums, die dann durch einen gemeinsamen Übertragungsweg und in einem gemeinsamen Übertragungsakt als Simultaninfektion weitergegeben werden können, bzw. bei differierenden Infektionsdosen oder bei einem für einen Erreger ungünstigen Übertragungsweg, zu einer selektiven Übertragung führen. Hierbei ist beim Beispiel des HBV/HCV-Poolings in der Praxis die erweiterte Koinfektion mit HIV ebenfalls von großer Bedeutung.

Aufgrund der mangelhaften Meldepflicht werden Fälle von Koinfektionen in Deutschland nicht getrennt registriert. In begrenzten Studien wurde gezeigt, daß etwa 10 % der chronischen HBV-Patienten auch HCV-positiv sind (FONG TL et al., 1991). Bei einer Untersuchung der Prävalenz bei inhaftierten i.v.-Drogenabhängigen fand sich eine HBV/HCV-Koinfektion bei 42,5 %, eine HIV/HBV/HCV-Tripelinfektion bei 37,3 % der Insassen (PALLAS JR et al., 1999).

1.3.2. Serologische und klinische Effekte einer HBV/HCV-Koinfektion

Schon vor der eigentlichen Identifizierung des HCV wurden an Schimpansen Untersuchungen zum Verlauf einer HBV/NANB-Koinfektion durchgeführt (BROTMAN B. et al., 1983 und DIENES HP et al., 1981). Hierbei zeigte sich bei einer Simultaninfektion mit beiden Viren eine Verzögerung oder Abkürzung der HBV-Infektion, zum Teil mit vollständiger Suppression der HBV-Replikation. Eine NANB-Superinfektion von chronisch HBV-infizierten Schimpansen führte ebenfalls zur Suppression der HBV-Replikation mit zeitweiligem Verschwinden von HBsAg, HBV-DNA-Polymerase und Dane-Partikeln im Serum. Als möglichen Mechanismus vermutete man damals eine stimulierte lokale Produktion von α -Interferon während einer NANB-Infektion, die zu einer Unterdrückung der HBV-Replikation führen sollte (SHIMIZU YK et al., 1989). Man rechnete diesen Effekt also der klassischen viralen Interferenz zu, wie sie auch bei der Hemmung von Poliovirus-Impfstämmen bei gleichzeitig sich im Darm vermehrenden ECHO-Viren, oder der Verhinderung einer Superinfektion *in vitro* mit ECHO-Virus 11 bei vorher mit Rubella-Viren infizierten Affennierenzellen bekannt ist.

Dieser HBV-Suppressionseffekt, bedingt durch ein noch nicht näher charakterisiertes NANB-Agens, war im Tiermodell so eindeutig, daß man zum Nachweis dieses unbekanntes Virus *in vitro* sogar die Ausnutzung eines solchen Effektes vorschlug (BRADLEY DW et al., 1983).

Nachdem eine genauere serologische Bestimmung von HBV/HCV-Koinfektionen möglich war, konnten auch entsprechende Phänomene einer Suppression des HBV bei koinfizierten Patienten nachgewiesen werden.

So ist die HBsAg-Clearance, also die jährliche Rate einer spontanen Konversion zu HBsAg-Negativität, bei zusätzlichem Nachweis von HCV erhöht (SHEEN IS et al., 1994), HBV bei vorliegender Koinfektion serologisch fast gänzlich verschwunden (LIAW YF et al., 1994) oder bislang als „stumm“ klassifizierte HBV-positive Fälle konnten als Koinfektionen erkannt werden (LEE DS et al., 1997).

Bei der Untersuchung der intrahepatischen Expression von HBV-Antigenen bei Koinfizierten war bemerkenswert, daß die relative Menge an HBsAg unberührt, jene des HBcAg jedoch signifikant reduziert ist (GUIDO M et al., 1999), was auf einen differentiellen Effekt der Suppression schließen läßt.

Das Vorhandensein einer 8bp-Deletion an Position 1640-1647 des HBV konnte bei einer Studie in HBV/HCV-koinfizierten Patienten nachgewiesen werden, worauf man auf einen replikationsfördernden Effekt zugunsten des HCV schloß (FUKUDA R et al., 1999); fraglich bleibt jedoch, ob dies eine durch Selektionsdruck entstandene Folge der HCV-Infektion darstellt oder tatsächlich die Ursache für das Überwiegen der HCV-Replikation darstellt. Die beschriebene Deletionsvariante konnte bislang noch nicht von anderen Autoren bestätigt werden.

Ein erhöhter inhibitorischer Effekt des HCV-Genotyp 1 im Vergleich zum Genotyp 2 bei einer Koinfektion konnte, ähnlich der erhöhten Resistenz gegenüber Interferon, ebenfalls gezeigt werden (PONTISSO P et al., 1998).

1.3.3. *In-vitro*-Effekte

Die Suppression der HBV-Replikation durch Strukturproteine des HCV konnte in HuH-7 Zellen erstmals nachgewiesen werden (SHIH CM et al. 1993). Hierbei wurden die mit dem HBV-Gesamtgenom stabil transfizierten Zellen mit einem HCV-Core/Envelope-Konstrukt bzw. einem GST (Glutathion-S-Transferase)-Core-Fusionsprotein transfiziert.

Die Expression der HBV-Antigene (HBe, HBs, HBc) zeigte sich zwei- bis vierfach reduziert, die Sekretion von HBV-Virionen war bis zu 20fach vermindert.; die Kinetik der Suppression verlief parallel zum Auftauchen von HCV-Core im Nukleus. Diese Effekte zeigten sich noch bei Transfektion mit einem Fusionsprotein, das die ersten 122 Aminosäuren des HCV umfaßte.

Der Einfluß der Phosphorylierung des Core-Proteins in Insektenzellen auf diese *in-vitro*-Effekte konnte gezeigt werden (SHIH CM et al., 1995). Eine Phosphorylierung der Positionen Ser-99 und Ser-116 durch die Proteinkinasen A und C schien hierbei essentiell zu sein.

Diese beiden einzigen Arbeiten, die sich mit dem Phänomen der HBV-Suppression durch HCV *in vitro* beschäftigten, basieren jedoch stets auf der Untersuchung der Suppression des gesamtgenomisch integrierten HBV. Eine Differenzierung einzelner regulatorischer Elemente des HBV ist bislang nicht untersucht, ebenfalls nicht der Einfluß der *in vivo* stattfindenden möglichen Prozessierung des HCV oder seiner genotypischen Varianten.

1.4 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Repression der HBV-Replikation durch das HCV auf eine Suppression einzelner HBV-Enhancer/Promotoren durch das HCV-Core-Protein zurückzuführen ist und ob eine solche mögliche Wirkung mit einer HCV-Core-Protein-Prozessierung in Zusammenhang steht. Ebenso soll in einem zu etablierenden Koinfektionsmodell der Frage nach der Bedeutung häufig beschriebener HBV-Enhancer-Mutationen in diesem Zusammenhang nachgegangen werden.

Der in klinischen Studien gezeigte Einfluß der HCV-Genotypen soll *in vitro* überprüft werden. Eine Variabilität des HCV-Core, die Einfluß auf die Koinfektion haben könnte soll untersucht werden.

Eine Einordnung des abgeleiteten intervirealen Suppressions-Mechanismus zu anderen beschriebenen viralen Koinfektionsphänomenen soll erfolgen und eine Systematisierung versucht werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat	Sigma Chemie, Deisenhofen
Agarose-SEAKEM 1:1	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat p.A.	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Ampicillin (Binotal [®])	Grünenthal, Aachen
Aprotinin	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim
Benzon Nuklease	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim
Co-Enzym A	Sigma Chemie, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma Chemie, Deisenhofen
ECL-Detection-Reagents	Fa. Amersham Kat. Nr. RPN 2109
Hefeextrakt	Difco, Detroit, Michigan, USA
Hexanucleotid-Mix	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim
Insulin	Sigma Chemie, Deisenhofen
IPTG	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Leupeptin	Boehringer-Mannheim
Luciferase	Promega (über Serva Feinbiochemika, Heidelberg)
Luciferin	Molecular Probes, Berlin
Nukleotide	Pharmacia Biotech, USA
TEMED	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Tricin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Trypsin, Stammlösung	Life Technologies, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit, Michigan, USA

Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs, Schwalbach, die Enzyme und Puffer zur PCR von Fa. Perkin Elmer Cetus, Norwalk USA bezogen. Sämtliche anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die minimale Qualitätsstufe war jeweils pro Analyse.

Das Wasser entstammt der Reinstwasseranlage (Fa. Millipore, Eschborn) des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen.

2.2 Puffer

6x Agarosegel- Probenpuffer	60 ml 0,1 g ad 100 ml	Glycerin Bromphenolblau TE-Puffer pH 8,0
--------------------------------	-----------------------------	--

Luziferin- Reaktions-Mix	470 µM 270 µM 530 µM 33,3 mM 0,1 mM 20 mM 1,07 mM 2,67 mM ad 100 ml Eingestellt auf pH 7,8	Luziferin Coenzym A Adenosintriphosphat DTT EDTA Tricin (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x5H ₂ O MgSO ₄ x7H ₂ O Aqua bidest.
-----------------------------	---	--

Aliquotiert und unter Lichtschutz bei -70°C gelagert.

TAE-Puffer	40 mM 1 mM	Tris-Acetat EDTA pH 8,0
------------	---------------	----------------------------

TBE-Puffer	89 mM 2 mM	Tris-Borat EDTA pH 8,0
------------	---------------	---------------------------

TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl pH 8,0 EDTA, pH 8,0
-----------	---------------	---------------------------------

PBS (pH 7,4)	137 mM 2,7 mM 8,1 mM 1,8 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
--------------	--------------------------------------	--

PAGE-Monomer- Stammlösung	30 % (300,0 g) 0,8 % (8,0 g) ad 1000,0 ml	Acrylamid Bis-Acrylamid Aqua bidest.
------------------------------	---	--

Lagerung unter Lichtschutz bei 4° C

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.
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (0,1 g) 10 % (50,0 ml) 50 % (250,0 ml) ad 500,0 ml	Coomassie-Blau R250 Essigsäure, konz. Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	50 % (500,0 ml) 10 % (100,0 ml) Ad 1000,0 ml	Methanol Essigsäure, konz. 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.
GTC-Puffer	4,2 M (50,0 g) 0,1 M (3,0 g) 0,5 % (w/v) (0,5 g) ad 100,0 ml 0,14 M (1%)	Guanidiniumthiocyanat Tris pH 7,5 N-Lauroylsarcosinat Aqua bidest. (DEPC-behandelt) Mercaptoethanol (kurz vor Gebrauch)
Plasmaextraktions-Puffer (10x)	1 M (12,11 g) 100 mM (3,72 g) 10 % (10,0 g) ad 100,0 ml	Tris pH 8,0 EDTA pH 8,0 SDS Aqua bidest. (DEPC-behandelt)

aliquotieren und bei -20°C lagern.

Hepes-Puffer (10x)	10 mM (0,24 g) 200 mM (7,4 g) ad 100,0 ml	Hepes pH 6,9 EDTA pH 8,0 Aqua bidest. (DEPC-behandelt)
-----------------------	---	--

aliquotieren und bei -20°C lagern.

DEPC-Wasser : Zu 100 ml Aqua bidest., werden 1% (100 μl) DEPC (Pyro-kohlensäurediäthylester 97%, Fa. Aldrich, Nr. 15,922-0/25) hinzugefügt, ü.N. bei 37°C inkubiert und zweimalig autoklaviert. Das fertige RNase-freie Wasser wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Minipräp- Resuspensions- puffer P1	100 $\mu\text{g/ml}$ 50 mM 10 mM	RNase A Tris-HCl EDTA pH 8,0
--	--	------------------------------------

Minipräp- Lysispuffer P2	200 mM 1%	NaOH SDS
-----------------------------	--------------	-------------

Minipräp- Neutralisations- puffer P3	2,55 M (98,15 g) ad 500 ml	Kaliumacetat Aqua bidest.
--	-------------------------------	------------------------------

mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen

RIPA-Puffer (Zellyse)	0,01 M (10ml) 0,15 M (8,77 g) 1,0 % w/v (10,0 g) 0,1 % w/v (5 ml) 1 % (10 ml) ad 1000,0 ml	Tris-HCl pH 7,4 (1 M Stammlösung) NaCl Natriumdesoxycholat SDS (20 % Stammlösung) Triton X-100 Aqua bidest.
--------------------------	---	--

Jeweils frisch werden pro ml hinzugesetzt:

0,2 μl	Leupeptin (10 mg/ml)
0,2 μl	Aprotinin (10 mg/ml)
0,2 μl	Benzon-Nuklease (250 U/ μl)

2.3 Nährmedien

LB-Medium	10,0 g 5,0 g 10,0 g ad 1000,0 ml	Trypton Hefeextrakt NaCl Aqua bidest., autoklavieren
-----------	---	---

LBamp-Medium Frische Zugabe von
1 µg/ml Ampicillin-Natriumsalz
zu LB-Medium

LBamp-Platten	10,0 g	Trypton
	5,0 g	Hefeextrakt
	10,0 g	NaCl
	20,0 g	Bakterienagar
	ad 1000,0 ml	Aqua bidest.

Autoklavieren und auf 55°C abkühlen lassen. Dann Zusatz von 200 µg/ml Ampicillin-Natriumsalz und auf Platten ausgießen. Lagerung bei 4°C.

TB-Medium	12,0 g	Bacto-Trypton
	24,0 g	Hefeextrakt
	4,0 ml	Glycerin
	2,31 g	KH ₂ PO ₄
	12,54 g	K ₂ HPO ₄
	ad 1000,0 ml	Aqua bidest., autoklavieren

D-MEM (Ausgangsmischungen Fa. Bio Whittaker, Verviers, Belgien)
19,72 g Instamed Medium 199 Eagle
83,2 g Instamed RMPI 1640
20,0 g NaHCO₃
100 ml l-Glutamin Stammlösung
100 ml Non Essential Amino Acids
100 ml Antibiotic/Antimycotic Solutions
100 ml Natriumpyruvat (100 mM)
Mit Aq. bidest. auf 9 l auffüllen und sterilfiltrieren und mit CO₂ auf pH 7,0 einstellen.

Ham's F12 (= D-MEM F12) Fa. Gibco BRL, Eggenstein, Kat. Nr. 32500

ITS-Mix
1000x Na-Selenit (5 µg/l)
1000x Transferrin (100 mg/20 ml)
1000x Insulin (100 mg/20 ml)

Das Fötale Kälberserum (FKS) zur Verwendung in Zellkulturen wurde von Fa. Sigma Chemie, Deisenhofen bezogen und auf eine Kontamination durch BVDV hin überprüft.

2.4 Oligonukleotide

Alle eigens entworfenen Oligonukleotide für die PCR wurden von Fa. MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert, HPLC-gereinigt und lyophilisiert angeliefert. Sie werden mit DEPC-gereinigtem Wasser auf eine Konzentration von 100 pM eingestellt und in einer Gebrauchskonzentration von 10 pM aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C .

2.4.1. Diagnostische Primer

(Die Positionsangaben beziehen sich auf das erste Codon des HCV-ORF, die Schmelztemperatur T_m [$^{\circ}\text{C}$] wurde vom Hersteller angegeben)

Primer	Sequenz	T_m	Pos.
NCR-sA	GAGGAACTACTGTCTTCACGC	68,1	-293/-273
NCR-asB	ACGGTCTACGAGACCTCCCG	67,7	-6 / -25
NCR-sC	GCGTCTAGCCATGGCGTTAG	66,1	-267/ -248
NCR-asD	GGCACTCGCAAGCACCTAT	66,0	-27/ -47
HVR-sA	CACTGGGGAGTCCTGGCGGGC	69,6	655 / 675
HVR-asB	TCCCACCACCACGGGGC	62,4	1136/ 1152
HVR-sC	ATGGTGGGGAAGTGGGCGAAG	65,8	691 / 712
HVR-asD	GGGGCTGGGAGTGAAGCA	60,5	1123/ 1140
Core-1s	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG	68,2	-24/3
Core-1as	GAG(AC)GG(GT)AT(AG)TACCCCATGAG(AG)TCGGC	>75	417/391
Core-2s	AGACCGTGCACCATGAGCAC	67,2	-12/8
Core-2as	TACGCCGGGGTCA(TG)T(GA)GGGCCCA	>75	343/319

2.4.2. Primer zur Klonierung

Primer	Sequenz (5'-3')	T_m	Pos.
HC1	GACGACCGGGTCCTTTCTTG	62,8	-161/-141
HC2-EcoRI	CGGAATTCATGAGCACGAATCCTAAACC	65,1	1-20
HC2-HindIII	CCCAAGCTTATGAGCACGAATCCTAAACCT	66,8	1-21
HC2(9R/K)-HindIII	CCCAAGCTTATGAGCACGAATCCTAAACCT- CAAAAAAAAAACCAAACGT	72,0	1-39
HC3-1a-XbaI	GCTCTAGACTACCTACGCCGGGGTCTGTGG	74,8	345-325
HC3-1b-XbaI	GCTCTAGACTACCTACGCCGGGGTCCGTGG	>75	345-326
HC4-1b-XbaI	GCTCTAGACTAGGCAGCGCCCCCAGGGG	>75	444-427
HC4-1a-XbaI	GCTCTAGACTAGGCAGCGCCTCCAAGAGGGG	74,8	444-424
HC5-1a-XbaI	GCTCTAGACTAGGCCGAAGCGGGCACAGTCA	73,5	576-555
HC5-1b-XbaI	GCTCTAGACTAAGCGGAAGCTGGGGTGGTCAG	73,3	576-556
HC5-3a-XbaI	GCTCTAGACTAACTAGCTGCTGGATGAATTA	65,5	576-556

2.5 Längenstandards

2.5.1. Protein-Standard

Rainbow-Marker low

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

2.5.2. DNA-Standard

1kB DNA Leiter:

(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 Marker 8:

(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.

2.6 Plasmide

2.6.1. pcDNA3

Bezogen von Fa. Invitrogen (Kat. Nr. V790-20). Ein zur transienten Expression in eukaryotischen Zellen geeigneter Vektor mit dem immediate-early-CMV-Promotor, sowie einem Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen. Der Vektor wurde zur Einklonierung von HCV-Core-Konstrukten verwendet. (Abb. 9)

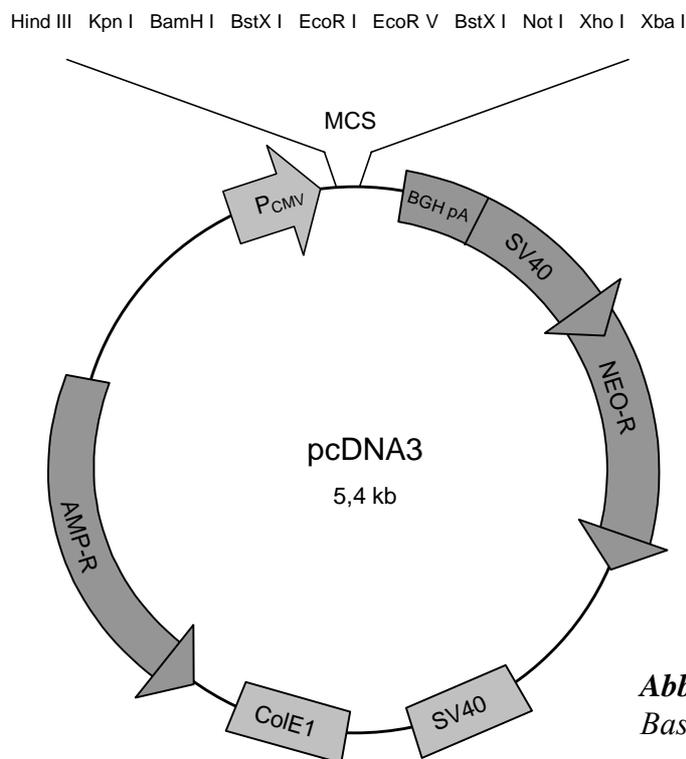


Abb. 9: Karte des Basisplasmids pcDNA3

2.6.2. pLUCI3

Basis-Expressionsplasmid (5,04 kb) für die Luciferase von *Photinus pyralis*. Gewonnen durch Entfernung des CAT-Leserahmens (nt 309-1971) aus dem Basisvektor pCAT-3Basic (Fa. Promega) und Einfügen des entsprechenden Luciferasegens aus pGL2-Basic (Fa. Promega) über Nco I und Xba I (N. FIEDLER, Diplomarbeit 19). Dieses Reporterplasmid enthält außer der SV40-Polyadenylierungsstelle keine regulatorischen Sequenzen für die eukaryonte Expression.

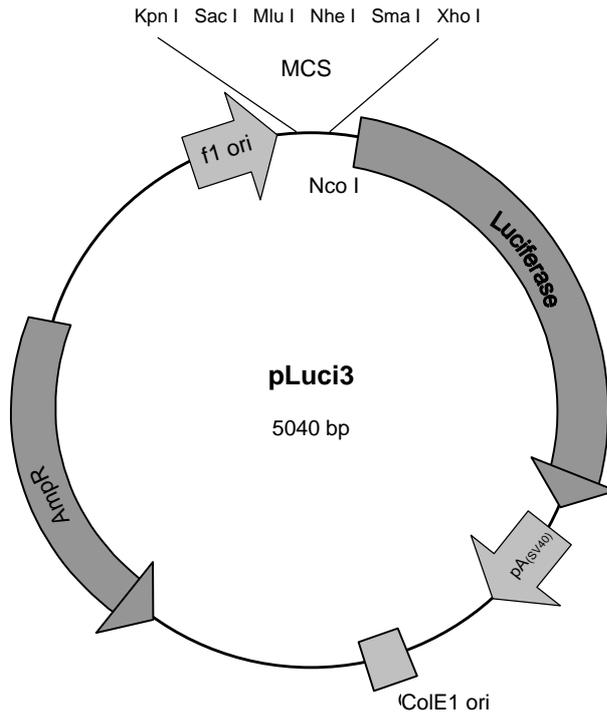


Abb. 10: Karte des Reporter-Plasmids *pLuci3* zur Expression von Luciferase

2.6.3. pTrc99A

Prokaryotischer Expressionsvektor (Fa. Pharmacia, Kat-Nr. 27-5007) abgeleitet von pKK233-2 (AMANN E et al. 1988). Er enthält den P_{trc} -Promoter, der durch IPTG induzierbar ist, sowie den $lacI^q$ -Repressor und ein Ampicillin-Resistenzgen.

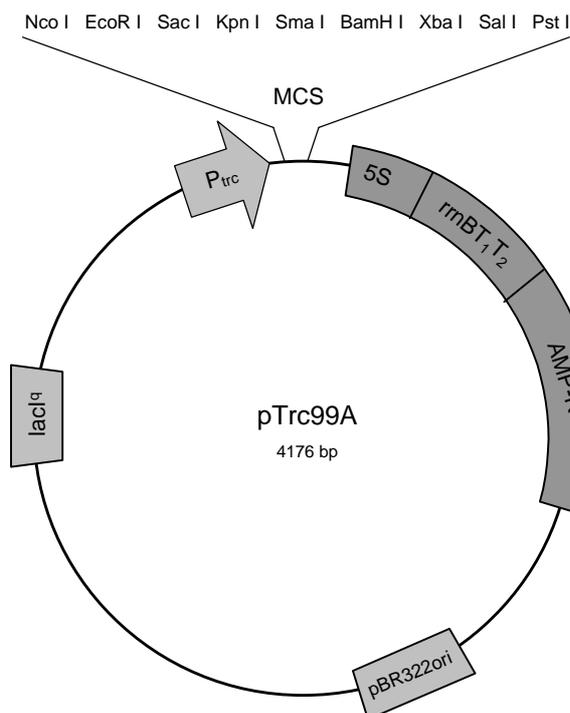


Abb. 11: Karte des prokaryotischen Expressionsplasmids *pTrc99A*

2.6.4. HBV-Enhancer-Konstrukte

pLuci-EII (4,76 kb)

Enthält die Gesamt-EnhancerII/Core-Promoter-Sequenz des HBV (nt 1381-1903) aus pUC991, Genotyp A (Serotyp adw2, [X51970]), die vor den Luciferase-Leserahmen von pLuci3 über Bgl II und Nco I inkloniert wurde (kloniert von N. FIEDLER).

pLuci-EII-Deletionsmutanten

Abgeleitet von der Sequenz des HBV-Genotyps D liegen Gesamt-Enhancer (1400-1902) und trunkierte EII-Konstrukte vor (K. SCHMIDT, Diplomarbeit 1998), sowie entsprechende Genotyp-D-Konstrukte, die eine 8bp-Deletion im Bereich nt 1763-1770 enthalten und ursprünglich einem pädiatrischen Patientenkollektiv entstammen (REPP R et al., 1993) (graphische Darstellung s. Abschnitt 4.4.).

pLuciEII(1730-1822)A/T

Subkloniert in pLuci3 aus der HBV-Genotyp-D-Sequenz des HBx-ORF (REPP R et al., 1991) von nt 1730-1822, wobei die kombinierte Mutation 1762 (A/T); 1764 (G/T) vorliegt (S. FISCHER, Doktorarbeit 2000, K. SCHMIDT, Diplomarbeit 1998)

pLuci-EI

Enthält die Enhancer I/Xp-Sequenz des HBV-Genotyps A [X51970] von nt. 1040-1372 inkloniert vor dem Luciferase-ORF in pLuci3 (N. FIEDLER).

pLuci-EI-Deletionsmutanten

Subkloniert aus pLuci-EI mit trunkierten Enhancer-I/Xp-Bereichen von jeweils nt 1114-1372 und nt 1236-1372. (N. FIEDLER)

2.7 Bakterienstämme und Zelllinien

2.7.1. E. coli XL1-Blue

Epicurian Coli[®] XL1-Blue MRF' (Fa. Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacI}^qZ \Delta M15 \text{ TN10, (tet}^r)]$

2.7.2. E. coli JM109

Epicurian Coli[®] JM109 (Fa Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: $e14-(McrA-) \text{ recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17}(r_K^- m_K^+) \text{ supE44 relA1 } \Delta(\text{lac-proAB}) [F' \text{ traD36 proAB lacI}^qZ \Delta M15]$

2.7.3. HepG2-Zellen

Humane Hepatomzellen mit epithelialer, hochdifferenzierter Morphologie, abgeleitet von einem 15jährigen kaukasischen Patienten (ADEN DP et al. 1979). Bezogen über die American Type Culture Collection, Rockville Maryland, USA, Kat.-Nr. ATCC HB-8065.

2.7.4. AML12-Zellen

Es handelt sich um eine hochdifferenzierte, immortalisierte murine Hepatozytenlinie (WU JC et al., 1994), freundlicherweise von N. Fausto, Seattle, USA zur Verfügung gestellt. AML12-Zellen wurden aus Mäusen etabliert, die transgen für TGF α (Transforming Growth Factor α) waren.

2.8 Seren

Alle Seren und Blutplasmen wurden aliquotiert bei -20°C gelagert. Die Aliquots werden jeweils nur einmalig für die jeweilige Anwendung aufgetaut. Falls nicht anders vermerkt, stammen die Seren aus der Serumsammlung des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen. Alle Seren wurden mit den üblichen diagnostischen Screening-Verfahren auf das Vorhandensein von HCV, HBV und HIV getestet.

2.9 Antikörper

- Monoklonaler IgG2a-Antikörper gegen Hepatitis-C Virus Core-Protein (aa 1-120) Fa. Biotrend, Köln, Kat.Nr. 4940-8738. Eingestellt auf 0,4 mg/ml in 2xPBS pH 7,4/ Glycerin 1 : 1.
- Monoklonales aHCV-Core IgG1, (aa 110-190) Klon c7-50, Fa. Dianova-Immunotech, Hamburg, Kat. Nr. MA1-080
- anti Maus IgG (gegen Fab'-Fragment) aus Schaf, Peroxidase-konjugiert, Fa. Dianova-Immunotech, Kat. Nr. 515-035-072.
- anti-Human IgG (gegen Fab'-Fragment) aus Kaninchen, Peroxidase-konjugiert, Fa. Dianova-Immunotech, Kat. Nr. 309-035-006

2.10 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Werkstatt des Institutes
Blot-Kammer	Stratagene, Heidelberg
Gelkamera CS1, Thermodrucker, Monitor	Cybertech, Berlin
Laminar-Flow-Arbeitsbank Lamin Air HB 2448	Heraeus, Osterode/Harz
Luminometer Lumat LB9501	Berthold, Hamburg
Photometer für Mikrotiterplatten LP400	Pasteur, Diagnostics
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
Zellkultur-Brutschrank Steri-Cult 200	Labotect, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 1512	Heraus, Osterode/Harz
Zentrifuge Centrikon H-40 1B	Kontron, Zürich CH
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg

Das Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde von der Fa. Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien (über Becton Dickinson, Heidelberg) bezogen.

3 Methoden

3.1 DNA-Isolierung

3.1.1. Plasmid-Isolierung im analytischen Maßstab

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten und geklonten Bakterienstämmen, diente eine alkalische Lyse und selektive Denaturierung chromosomaler DNA mit anschließender Fällung der Plasmid-DNA in 2-Propanol (BIRNBOIM und DOLY 1979) in modifizierter Form. Die Reinheit der DNA genügte, um zur Klonselktion Restriktionsverdau durchzuführen.

Die gewünschten Bakterienklone wurden in 2 ml LBamp-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert; hiervon wurden 1 ml Bakteriensuspension in einer Tischzentrifuge für 3 Min. bei 10.000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Bakterien-Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Dieses wird vorsichtig mit 300 µl Lysispuffer P2 versetzt und 5 Min. bei Rt inkubiert. Der Ansatz wird mit dem Neutralisationspuffer P3 zur SDS-Fällung versetzt und sofort für 15 Min. bei 13.000 U/Min. zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein frisches Eppendorf-Cup überführt und durch Zugabe von 600 µl 2-Propanol und Inkubation für 5 Min. bei Rt die Plasmid-DNA gefällt. Diese wird 20 Min. bei 4°C und 13.000 U/Min. pelletiert, die gefällte DNA schließlich mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Plasmid wird in 20 µl TE-Puffer aufgenommen; zur Beurteilung im Agarose-Gel nach einem Restriktionsverdau genügen hiervon i.d.R. 5 µl.

3.1.2. Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA sowie zur Herstellung von hochreiner DNA für Transfektionsexperimente, wurden die Aufreinigungsprodukte der Fa. Qiagen GmbH, Hilden verwendet.

Das Prinzip beruht auf der selektiven Affinität von DNA/RNA zu Diethylaminoethanol-Austauscherharzen, abhängig von pH-Wert und Ionenkonzentration. Die Aufschlußmethoden entsprechen jener wie bei der Mini-Präparation.

Zur normalen Plasmidaufbereitung wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Kat.Nr. 12163) nach den Anwendungsvorschriften des Herstellers verwendet. Bei der Iso-

lierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA kam das EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (Kat.Nr. 12362) nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz.

Es wurden jeweils 100 ml der bakteriellen Über-Nacht-Kulturen in LBamp-Medium zur Aufreinigung eingesetzt; Reinheit und Konzentration der DNA wurden im Dual-Photometer bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Präparate zusätzlich in einem Agarose-Gel einer Konzentrationsbestimmung unterzogen.

3.1.3. DNA-Präzipitation

Zur Fällung von DNA, z.B. aus PCR-Ansätzen, wurde die Acetat-Ethanol-Methode angewand. Hierbei werden 500 µl der DNA-haltigen Lösung mit 50 µl 3M NaCH₃COO und dem doppelten Volumen (1100 µl) eiskaltem absolutem Ethanol versetzt und gut gemischt. Bei -20°C erfolgt eine Fällung für 1 h, schließlich wird die DNA bei 12000 g, 4°C für 30 Min. pelletiert, das Pellet erneut mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und im Exsikkator getrocknet.

3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten und ihre Größenbestimmung erfolgte mit der üblichen Methoden der Agarose-Gel-Elektrophorese (VENDRELY R et al. 1968). Bei dieser nativen Form der Elektrophorese liegen die Phosphatgruppen der DNA als vollständig dissoziierte Polyanionen vor, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit weitgehend nur von Molekulargewicht und DNA-Konformation (linear, nicked-circular, superhelical) abhängig ist.

Die Agarose wurde in gewünschter Konzentration (0,8 – 2 %, w/v) in 1 x TAE-Puffer eingewogen und in einem Mikrowellengerät bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht; Verdampfungsverluste wurden mit ddH₂O ausgeglichen. Die für den jeweiligen Gelschlitten benötigte Menge wurde entnommen, auf ca. 60-70°C abgekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml aq.) pro 100 ml Agaroselösung versetzt.

Der mit einem Teflonkamm zur Taschenbildung versehene Gelschlitten wurde bis zu einer maximalen Schichthöhe von 0,5 cm mit Agarose begossen und auf Rt abgekühlt. Die mit 1/6 Volumen 6 x Ladepuffer versetzten Proben sowie der DNA-Längenstandard wurden in die Taschen eingefüllt und bei 90 – 110 V mit 1 x TAE

als Laufpuffer aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit ließ sich am mitgeführten Bromphenolblau des Ladepuffers abschätzen, das Fragmenten von etwa 300 bp entspricht.

Zum Nachweis der DNA wurde das Gel auf einem UV-Illuminator bei 302 nm betrachtet. Das zwischen die Basen der DNA interkalierte Ethidiumbromid gibt aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften sichtbares Licht zwischen 500 und 590 nm ab, das mithilfe einer digitalen Gelkamera und einem angeschlossenen Thermodrucker dokumentiert werden konnte.

3.1.5. Elution aus Agarosegelen

Um einheitliche DNA-Fragmente zur Klonierung zu erhalten, wurden die gewünschten Stücke unter UV-Licht bei 366 nm (geringere Frequenz als zur Dokumentation) aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

Es erfolgte dann eine oxidative Spaltung der Agarose in Gegenwart von Natriumjodid und schließlich eine Reinigung durch das Prinzip der selektiven Affinität von DNA zu Glasmilch bzw. Silicamatrix in Gegenwart chaotroper Salze.

Hierzu wurde das System NUCLEOTRAP™ der Fa. Machery-Nagel Kat.-Nr. 740584 nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2 RNA-Extraktion aus Serum (GTC-Methode)

Zur Extraktion von HCV-RNA aus Serum wurde die Guanidiniumthiocyanat-Methode nach Chirgwin (CHIRGWIN et al. 1979) in modifizierter Form verwendet (CH. JURSCH, Diplomarbeit 1992).

Hierzu werden 100 µl Serum mit 50 µl Plasmaextraktionspuffer und 400 µl Guanidiniumthiocyanat-Puffer, dem zuvor frisch 1% β-Mercaptoethanol und 5 µg Carrier-RNA beigelegt wurden, versetzt. Der Ansatz wird 20 s mit Hilfe des Vortex-Gerätes gemischt und für 5 Min. bei 65°C inkubiert. Dann werden 500 µl Phenol-gesättigtes Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 beigegeben, gemischt und weitere 25 Min. bei 65°C inkubiert. Die Inkubation wird 2-3mal durch Vortexen unterbrochen. Zur Phasentrennung wird der Ansatz 3 Min. bei 13.000 U/Min. (Rt) in einer Tisch-zentrifuge zentrifugiert; die obere wässrige Phase wird unter Vermeidung einer Verschmutzung durch die Interphase abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Cup überführt und erneut einer Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol un-

terzogen. Danach wird noch einmal mit reinem Chloroform extrahiert; die schließlich verbleibende wässrige Phase wird mit 20 µg Glycogen versetzt und zur Fällung das 2,5-fache Volumen absoluten Ethanol (4°C) zugefügt.

Die Fällung erfolgt für 1 h bei -70°C; schließlich wird der gesamte Ansatz für 30 Min. bei 13.000 U/Min. (4°C) zentrifugiert und das überstehende Ethanol dekantiert. Das RNA-Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (15 Min., 13.000 U/Min.) und im Exsikkator getrocknet. Die gereinigte RNA kann in 10 µl HEPES-Puffer aufgenommen werden. Folgt eine Reverse Transkription, so wird die RNA in 7 µl DEPC-H₂O, 2 µl 10x Hexanukleotid-Mix und 1 µl 10x HEPES-Puffer aufgenommen.

3.3 Reverse Transkription

Um die virale RNA nach der erfolgten Serum-Extraktion in DNA umzuschreiben, erfolgt eine Reverse Transkription (RT). Hierzu wird das, in dem Hexanukleotid-Mix gelöste, Pellet mit Mineralöl überschichtet und die RNA 2 Min. bei 94°C denaturiert, zur Primeranlagerung 2 Min. bei 56°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wird durch das Öl 10 µl RT-Mix hinzugefügt der sich wie folgt zusammensetzt:

- 4 µl 5x RT-Puffer (Fa. Gibco)
- 2 µl 0,1 M DTT
- 2 µl dNTP-Stammlösung (10 µM)
- 1 µl RNase-Inhibitor aus Placenta (RNAguard, Fa. Pharmacia Nr. 27-0815-01)
- 1 µl M-MLV H-Reverse Transcriptase (Superscript Nr. 8053, Fa. Gibco)

Die Reverse Transkription wird schließlich für 90 Min. bei 42°C durchgeführt, gefolgt von einer Inaktivierungsphase von 15 Min. bei 95°C. Für die nachfolgende PCR werden von diesen 20 µl RT-Ansatz i.d.R. 5 µl eingesetzt.

3.4 PCR

Zur Amplifikation aus Serum nach erfolgter RT oder zur Subklonierung von HCV-Genomabschnitten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion angewandt. Zur Testung von Seren wurde hierbei die einfache Taq-Polymerase mit mitgeliefertem Puffersystem (Fa. Perkin-Elmer, Mannheim) verwendet, bei Klonierung und zur späteren Analyse von Basensequenzen die Pfu-Polymerase (Fa. Stratagene, Leimen), die eine höhere Lesegenauigkeit besitzt. Ein PCR-Ansatz setzte sich i.d.R. wie folgt zusammen:

- 5 µl 10x Taq-Puffer
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 1 µl Sense-Primer (10 µM)
- 1 µl Antisense-Primer (10 µM)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 IU)
- 5 µl Template (entspr. 100-200 ng DNA)
- 36,5 µl DEPC-Wasser (ad 50 µl)

Die PCR wurde im Hybaid-Thermocycler (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die gängigen PCR-Bedingungen für die Isolierung von Inserts waren:

- 1. 95°C, 2 Min.
- 2.1. 95°C, 1Min. } 25 Zyklen
- 2.2. 56°C, 1Min. }
- 2.3. 72°C, 1 Min. }
- 3. 72°C, 3 Min.

Bei jeder PCR wird eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Prä- und post-PCR sind räumlich getrennt, die Herstellung der PCR-Ansätze geschieht in Template-freien Räumen unter strenger Beachtung von Kontaminationsfreiheit. Die spezifischen PCR-Bedingungen, z.B. bei nested-PCR, und Verwendung der Primer wird bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

3.5 Klonierung

3.5.1. Isolierung und Verdau des Inserts

Mittels PCR wurde der zu klonierende Genomabschnitt aus Serum bzw. Ausgangsplasmiden amplifiziert. Hierbei wurden Primer verwendet, denen die benötigte Schnittstelle für ein Restriktionsenzym angefügt war. Zur Erhöhung der späteren Verdaueffizienz wurde dieser Schnittstelle noch ein Spacer (meist zwei Pyrimidinbasen) angehängt. Dem antisense-Primer wurde ein Stopcodon hinzugefügt.

Die so durch PCR amplifizierte DNA wurde mittels Acetat-Ethanol-Fällung präzipitiert und einem Restriktionsverdau mit den vorgesehenen Enzymen unterzogen. Das so mit klonierbaren Enden versehene Insert wird in einem Agarosegel aufgetrennt und eluiert, um die Restriktionsfragmente zu entfernen.

3.5.2. Dephosphorylierung und Ligation

Zur Linearisierung des Vektors wurde dieser mit den gewünschten Restriktionsenzymen verdaut und unmittelbar danach ohne weiteren Pufferwechsel durch Zugabe von 10 U Alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) pro 10 µg DNA für 30 Min. bei 37°C dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu erschweren. Zur Abtrennung der Fragmente wurde der gesamte Ansatz im Agarosegel aufgetrennt und der Vektor eluiert.

Vor der Ligation werden die Konzentrationen von Insert und Vektor in einem Agarosegel abgeschätzt. Zum Ligationsansatz (Endvolumen 20 µl) wird der Vektor (ca. 100 ng) mit einem molaren Überschuß des Inserts im Verhältnis 1:4 gemischt, 2 µl 10x Ligationspuffer (0,66 M Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M MgCl₂; 0,15 M DTT; 10 mM Spermidin; 10 mM ATP) zugegeben und mit 10 IU T4-DNA-Ligase (Fa. NEB, Schwalbach) ligiert. Die Inkubationszeit beträgt 30 Min. bei Rt oder ü.N. bei 4°C.

3.5.3. Transformation kompetenter Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme wurden in kompetentem Zustand vom Institut für Med. Virologie zur Verfügung gestellt (Rubidiumchlorid-Methode nach HANAHAN D 1983). Zur Kontrolle der Transformationseffizienz, wurde regelmäßig eine untransformierte Bakteriensuspension und ein definiertes Kontrollplasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen, mitgeführt.

Zur Transformation werden die bei -70°C gelagerten Bakteriensuspensionen 30 Min. auf Eis vorsichtig aufgetaut. Zu 100 μl Bakteriensuspension werden i.d.R. 10 μl Ligationsansatz (oder eine gewünschte verdünnte DNA-Präparation) gegeben und zur DNA-Adhäsion 1 h auf Eis inkubiert. Danach wird die Probe im Wasserbad bei genau 42°C für 90 s einem Temperaturschock unterzogen. Es folgt eine erneute Abkühlung für 5 Min. auf Eis. Der transformierten Bakteriensuspension wird nun das 2,5fache Volumen TB-Medium beigelegt und unter leichtem Mischen bei 37°C für 1 h bebrütet. Die inkubierte Suspension wird zu 50 und 200 μl -Portionen dicht auf LBamp-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

3.5.4. Klonselktion

Von den über Nacht inkubierten LBamp-Platten mit den transformierten Bakterien werden einzelne Bakterien-Kolonien in 2 ml LBamp-Medium angeimpft und wiederum ü.N. unter Schütteln (120/Min.) bei 37°C inkubiert. Aus dieser Bakteriensuspension werden 1 ml zur analytischen Plasmid-Präparation (s. Abschnitt 4.1.1.) entnommen. Die isolierte Plasmid-DNA (Endvolumen 20 μl) wird in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Die Kontroll-Schnittstellen entsprechen i.d.R. den Einklonierungsstellen des Inserts und in einem zweiten Kontrollverdau ausgewählten Schnittstellen innerhalb des Ausgangsplasmids und des Inserts.

Positive Klone werden in 100 ml-Kulturen vermehrt, das Plasmid in präparativem Maßstab extrahiert (s. 4.1.2.) und das einklonierte Insert sequenziert, um Mutationen oder Leserasterverschiebungen zu erkennen.

Von identifizierten Klonen werden haltbare Glycerinkulturen hergestellt. Dazu werden 2 ml LBamp-Bakteriensuspension mit 2 ml autoklaviertem Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der neu konstruierten Plasmide wurde anfänglich mit der Dye-Terminator-Methode selbst durchgeführt. Aus Kostengründen erfolgte die weitere Sequenzierung, auch der PCR-Produkte, kommerziell durch die Fa. MWG Biotech, Ebersberg. Angeliefert wurden Sequenzen und Rohdaten jeweils in beiden Leserichtungen, die Konsensussequenz wurde mit den Programmen SeqMan und Edit-Seq (DNAStar Inc., Madison USA) selbst erstellt.

3.7 Kultivierung von Hepatozytenlinien

Alle Zellen wurden zur Vermehrung und zur Durchführung der Experimente bei 37°C im mit 5,9 %-CO₂-begasteten Brutschrank gehalten. Humane HepG2-Zellen wurden in D-MEM/10% FKS propagiert und mindestens zweimal wöchentlich 1:10 passagiert. Murine AML12-Zellen wurden in Ham's Medium/10% FKS gezogen, dem ITS (Insulin, Transferrin, Selenit)-Mix und Dexamethason (2000x Stamm-lösung: 8mg/ml Ethanol) zugefügt wurde; alle zwei Tage erfolgte eine 1:15 – 1:20 Passagierung.

Für die Passage wurden die konfluent gewachsenen Zellen zweimal mit 37°C-PBS gewaschen und schließlich mit 1xTrypsin/EDTA (Fa. Sigma) im Brutschrank inkubiert, bis sich im Zellkultur-Mikroskop eine leichte Ablösung der Zellen zeigte. Die Zellen wurden durch Abspülen mittels einer Pipette mit FKS-haltigem Medium suspendiert, gezählt und erneut ausgesät.

Zur Lagerung wurden subkonfluente, vitale Zellkulturen in D-MEM, dem 40% FKS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) beigefügt war, bei –170°C in flüssigem Stickstoff nach erfolgter Vorkühlung langsam eingefroren.

3.8 Transfektion eukaryoter Zellen

Zur transienten Transfektion der adhärennten Zellkulturen wurden zwei Systeme angewandt, die beide auf dem Prinzip der Lipofektion beruhen. Hierbei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäure an Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellmembran endozytotisch zu passieren. Optimale Voraussetzung für beide Lipofektionsverfahren war eine Endotoxin-freie Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den transformierten E. coli-Stämmen sowie subkonfluente, vitale Zellkulturen zum Zeitpunkt der Transfektion.

Die zu transformierenden Zellen werden am Tag zuvor in definierter Menge in eine gewünschte Loch-Platte (48- /24- oder 6-Loch-Platte) ausgesät und über Nacht bebrütet.

3.8.1. Lipofektion mit Lipofectamine™

Zur Transfektion von 10^6 ausgesäten Zellen in einer 6-Loch-Platte (Napf-Durchmesser 35 mm) werden DNA und Lipofectamine (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) in 200 μ l serumfreiem Medium gemischt. Zu 2 μ g DNA werden im Verhältnis 20 μ l Lipofectamine gegeben und 15 Min. bei Rt inkubiert. Das Inkubat wird mit 800 μ l serumfreiem Medium verdünnt und auf den zuvor mit serumfreiem Medium zweimal gewaschenen Zellrasen gegeben. Die Transfektion findet für 4 h im Brutschrank statt. Schließlich wurde das Transfektionsgemisch entfernt und die Zellen in Medium mit 10% FKS weiterbebrütet. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h die Ernte der Zellen.

3.8.2. Lipofektion mit SuperFect™

Durch diese Methode konnte eine erhöhte Transfektionseffizienz erreicht werden, da SuperFect (Fa. Qiagen, Hilden) neben der Komplexbildung mit DNA und der Einschleusung in die Zelle durch die Bindung an negative Rezeptorenkomplexe auch in der Lage ist, pH-abhängige lysosomale Nukleasen zu inhibieren. Bei empfindlichen Zellen kann die Transfektion auch in Gegenwart von 5% FKS durchgeführt werden, um die Toxizität zu vermindern.

Zur Transfektion wurde die gewünschte Plasmid-DNA in 100 μ l serumfreiem Medium aufgenommen und mit 5 μ g SuperFect/ μ g DNA für 15 Min. bei Rt komplexiert. Schließlich wird dem Ansatz 600 μ l Medium mit 10% FKS zugegeben. Die zu transfizierenden Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Nach 2,5 h Inkubation im Zell-Brutschrank wird die Lösung entfernt, einmal mit Medium gewaschen und die Zellen zur weiteren Inkubation mit der normalen Mediummenge von ca. 5 ml überschichtet. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 h die Ernte der Zellen.

3.9 Proteinextraktion aus Zellkulturen

3.9.1. Gefriermethode

Eine besonders einfache Methode zur Proteinextraktion aus Zellkulturen ist das wiederholte Gefrieren und Auftauen der Zellsuspension, wobei die zellulären Strukturen mechanisch durch entstehende Eiskristalle aufgeschlossen werden. Diese Methode wurde insbesondere zur Proteinextraktion vor einem Western-Blot eingesetzt.

Hierzu wurden die ausplattierten Zellkulturen (6-Loch-Platten) zweimal mit PBS (4°C) gewaschen, mit 1 ml PBS überschichtet und auf Eis vorsichtig mit einem Gummischaber vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde für 1 Min. bei 10 000g (4°C) zentrifugiert und das Pellet in einem Eppendorf-Cup mit 150 µl 0,25 M Tris-HCl pH 7,8 resuspendiert. Soll eine Proteindetektion im Western-Blot erfolgen, so werden zur Resuspension 200 µl Ripa-Puffer verwendet, dem wie oben beschrieben frisch Proteinase-Inhibitoren zugesetzt wurden. Die Proben wurden jeweils dreimal für je 3 Min. in flüssigem Stickstoff gefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Die Pelletierung der Zelltrümmer erfolgte bei 13.000 U/Min. für 10 Min., das überstehende Zellysate kann dekantiert und in weitere Versuche eingesetzt werden. Eine Lagerung dieser Lysate kann bei -70°C erfolgen.

3.9.2. Zell-Lyse mit Detergenzien

Zur schonenden Lyse der Zellkulturen vor dem Einsatz in den Luciferase-Assay, wurde auf das spezielle Lyse-System der Fa. Boehringer-Mannheim (Nr. 1 897 675) zurückgegriffen. Der Vorteil liegt in der schnelleren Aufarbeitung größerer Probenmengen und der nicht vorhandenen Beeinträchtigung der cytoplasmatischen Enzymaktivität, insb. der exprimierten Luciferase.

Die Zellkulturen werden wie bei der Gefriermethode 2mal mit PBS (4°C) gewaschen und dann (bei 6-Loch-Platten) mit 500 µl 1x „Reporter-Gen-Assay Lyse-Puffer“ (Fa. Boehringer-Mannheim) überschichtet. Nach einer Inkubation von 15 Min. bei Rt unter leichtem Schütteln, werden die Zelltrümmer 3 Min. bei 13.000 U/Min. (4°C) abgetrennt, und das Lysat direkt in den BCA-Assay eingesetzt. Die Lysate können bei -70°C gelagert werden.

3.10 Proteinexpression und -extraktion aus E. coli

Der Bakterienstamm E. coli JM109 wurde mit dem gewünschten prokaryontischen Expressionsplasmid bzw. einem Kontrollvektor transformiert. Die Klone wurden in einer Vorkultur in 2 ml LBamp-Medium über Nacht inkubiert und in 50 ml LBamp/5% Glucose überimpft. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die optische Dicht der Bakteriensuspension bei 560 nm (OD_{560}) gemessen und so lange inkubiert, bis diese einen Wert von 0,4 überschritt. Dann wurde durch Zugabe von 100 μ l 1 M IPTG (Endkonzentration 2 mM) die Expression induziert und weitere 2 h inkubiert.

Die Suspension konnte nun bei 4500 U/Min., 10°C für 15 Min. zentrifugiert werden und in 1 ml Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris x HCl pH 8,0) aufgenommen werden. Die Bakterien wurden im Ultraschall-Homogenisator lysiert und zum Scheren der DNA mehrmals durch eine dünne Injektionskanüle gezogen. Das Abtrennen der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 U/Min. für 5 Min.. Das Pellet wurde in 50 μ l 1 x Laemmli-Puffer/ 5% β -Mercaptoethanol aufgenommen; der Überstand mit der gleichen Menge 2 x Laemmli-Puffer/10% β -Mercaptoethanol versetzt und beide für 5 Min. bei 95°C inkubiert. 50 μ l des Überstandes wurden in den Immunblot eingesetzt.

3.11 Antikörper

3.11.1. Immunglobulin-Fällung aus Serum

Zur Anreicherung von Immunglobulinen aus polyvalentem Patientenserum wurde eine Fällung mit Natriumsulfat durchgeführt.

Hierzu werden 100 μ l Serum mit 100 μ l 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 gemischt, mit 200 μ l 34% Natriumsulfat-Lösung (w/w) in Na-Phosphatpuffer versetzt und 5 Min. bei Rt inkubiert. Der Ansatz wird in einer Tischzentrifuge bei 13.000 U/Min. pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 μ l Na-Phosphatpuffer aufgenommen; dieses wird wiederum mit 200 μ l Natriumsulfatlösung gefällt. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Am Ende wird das Pellet in 100 μ l PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.11.2. Absättigung polyvalenter Antikörper

Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen von polyvalenten Antikörpern aus Patientenserum an Proteine aus der exprimierenden Zelle im Western-Blot, wurde die Absättigung der gefällten Antikörper mit sog. Acetonpulver angewendet.

Zur Herstellung von Zell-Acetonpulver werden die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen mithilfe eines Gummischabers vom Boden der Kulturschale abgelöst und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellen werden pelletiert und zweimalig in 500 µl Aceton (-20°C) entfettet. Das entstehende Pellet wird auf Filterpapier ausgebreitet und getrocknet, schließlich zerrieben und bei -20°C gelagert.

Zur Absättigung wird in die gewünschte Ak-Lösung (z.B. gefälltes polyvalentes IgG aus Patientenserum) 0,1% des Acetonpulvers gegeben, gevortext und für 1 h bei Rt oder bei 4°C ü.N. inkubiert. Nach Abtrennung der Pulverreste durch Zentrifugation kann die abgesättigte Ak-Lösung in den Immunblot eingesetzt werden.

3.12 Immunblot

Die Originalvorschrift für eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Lämmli (LÄMMLI UK, 1970) wurde in ihrer Anpassung auf virologische Besonderheiten mit nachfolgendem Immunblot nach Heermann (HEERMANN K.-H. et al., 1988) verwendet.

3.12.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für ein 12% Polyacrylamidgel wurden 28 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung, 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 Polymerisation werden 70 µl 10% Ammoniumpersulfat zugesetzt.

Die Proben werden, falls nicht anders angegeben, in 1x Laemmli-Puffer/5% β -Mercaptoethanol 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.

3.12.2 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 Filterpapier aufgeschichtet. Der Transfer erfolgt in einer Blot-Kammer in Transfer-Puffer bei 35 mA/20 V ü.N. Nach dem Transfer wird die Membran mit Rotiblock© (Fa. Roth, Karlsruhe) für 30 Min. geblockt. Es erfolgt dann die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Konzentrationen sind jeweils angegeben) für 1 h bei Rt in TBS/0,1% bovines Serumalbumin; die Membran wird hierzu in Polyethylen-Folie einschweißt und auf einen Rüttler gelegt. Die Membran wird danach zweimal kurz mit TBS abgespült und dreimal für 10 Min. in TBS gewaschen. Es erfolgt die Inkubation des zweiten, Peroxidase-markierten Antikörpers in der oben beschriebenen Weise, schließlich ein erneutes dreimaliges Waschen der Membran.

Durch die Behandlung mit Rotiblock kann nach erfolgter Detektion nochmalig eine Inkubation der gleichen Membran mit anderen Ak erfolgen, nachdem durch Inkubation mit Mercaptoethanol-haltiger Detergenlösung (nach Angaben des Herstellers) alle Ak-Bindungen gelöst wurden.

Die Membran kann auch (im Gegensatz zum Blocken mit Magermilchpulver) nach dem spezifischen Antigennachweis mit Coomassie-Blue gefärbt werden, um die Sauberkeit des Transfers und der Elektrophorese zu überprüfen.

3.12.3 Protein-Nachweis

Zum Nachweis der Peroxidase-markierten Ak wird die ECL (Enhanced chemiluminescence)-Methode angewand. Hierzu wird die Membran in der eingeschweiß-

ten Folie für 1 Min. in der Dunkelkammer mit dem ECL-Detection Reagens (Fa. Amersham, Kat. Nr. 2106) inkubiert, die Lösung entfernt und die eingeschweißte Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm, Fa. Amersham, Kat. Nr. RPN 2103) gelegt. In der Regel genügt eine Exposition für 20 s bis 3 Min..

3.13 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge eines Lysates oder einer Lösung wurde der BCA-Assay (Fa. Pierce, Kat.-Nr. 23225ZZ) verwendet. Er beruht auf dem photometrischen Nachweis von Cu^+ mittels Komplexbildung mit Bicinchoninsäure (BCA), nachdem in alkalischer Lösung durch eine klassische Biuret-Reaktion Cu^{2+} -Ionen quantitativ durch Komplexbildung mit Proteinen reduziert wurden (SMITH PK et al. 1985).

Der Nachweis des BCA-Komplexes mittels Extinktion bei 570 nm ist bei diesem Test in einem Referenzbereich entsprechend 0,5 bis 20 μg Protein linear.

Alle Proben sowie der mitgeführte Albuminstandard (2 mg/ml BSA) werden im Doppelansatz gemessen. Bei normalen Zellysaten (Gefriermethode oder Lyse mit Detergenzien) genügen 5 μl Probe. Diese werden in eine Mikrotiterplatte gegeben und jeweils mit ddH₂O auf 10 μl aufgefüllt. Danach werden 200 μl Arbeitslösung, bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 50:1, zu den Proben gegeben und unter Abdeckung der Platte mit einer Folie, 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Messung bei 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im Mikrotiterplatten-Photometer. Aus den Standardwerten wird eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet. Die Probenkonzentrationen ergibt sich aus dem Mittelwert der Doppelansätze und dem festgelegten Umrechnungsfaktor.

3.14 Luciferase-Assay

Zur Quantifizierung der eukaryontischen Genexpression wurde die Expression der Luciferase aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) als Reportergen verwendet. Gegenüber den klassischen Reportergenen β -Galactosidase oder Chloramphenicol-Acetyltransferase ist eine einfache und präzise Bestimmung durch Chemolumineszenz in einem Luminometer möglich (BRASIER AR et al., 1989).

Die exprimierte Luciferase besitzt ohne weitere posttranslationale Prozessierung die Eigenschaft, in Gegenwart von Mg^{2+} und unter Verbrauch von ATP Luciferin über ein Luciferyl-CoA-Intermediat zu oxidieren. Bei dieser quantitativen Umsetzung werden Photonen emittiert, die mit einer Photozelle gemessen werden können.

Um Unterschiede in der Zelldichte, der Transfektions- und Lysiseffizienz zu minimieren wird der Ansatz vor der Luciferase-Messung mit dem BCA-Assay standardisiert, so daß immer gleiche Mengen an Gesamtprotein (i.d.R. 15 μ g) als interner Standard dienen. Um die Messungen zu eichen, wurde in Vorversuchen ein Luciferase-Standard mitgeführt, der eine Linearität der Luciferase in einem Bereich von 1 – 500 pg nachwies. Höhere Konzentrationen konnten durch Einsatz geringerer Gesamtproteinmengen gemessen werden, um nicht den Meßbereich des Luminometers zu überschreiten.

Die Lysate wurden mit 250 mM Tris HCl pH 7,8 auf ein Volumen von 50 μ l eingestellt und nach automatischer Zugabe von 80 μ l Luciferin-Reaktionsmix für 10 s die Lichtemission gemessen. In Abschnitt 4.2.1. wird exemplarisch die Auswertung der erhobenen Rohdaten aus dem Luciferase-Assay beschrieben.

3.15 Sequenz-Vergleich

Die Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen MegAlign und EditSeq (DNASStar Inc., Madison USA) durchgeführt. Die Analyse von Proteinsequenzen erfolgte mit dem Unterprogramm Protean; die Analyseparameter und Methoden werden jeweils angegeben.

Zum Abgleich der Sequenzen mit bereits publizierten Daten diente die Datenbank und das Alignment-System des National Center for Biotechnology Information, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Sequenzen werden mit dem international gültigen Zugriffscode für genetische Datenbanken bezeichnet (accession number), der stets in eckigen Klammern wiedergegeben wird.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von Expressionsplasmiden für HCV-Core-Protein

Zur Untersuchung der HBV-Enhancer-Aktivität wurde ein Reporter-gen-Assay etabliert, wobei verschiedene Enhancer-Konstrukte (s. Abschnitt 2.6.4.) als Reporter-gen den Leserahmen für die Leuchtkäfer-Luciferase enthielten, vor den die regulatorischen Bereiche des HBV kloniert waren. Die Menge der exprimierten Luciferase ist damit ein direktes Maß für die Aktivität der regulatorischen Elemente.

Führt man nun eine Kotransfektion von geeigneten Zellkulturen mit diesen Enhancer-Plasmiden und einem zweiten Expressionplasmid für HCV-Core-Protein durch, so ergibt sich ein Koinfektions-Modell *in vitro* für die Untersuchung der durch das Core induzierten Veränderung der Enhancer-Aktivität.

Als geeignete Zellen für diese Untersuchungen wurden zwei Hepatozyten-Linien gewählt, da diese der natürlichen Situation am ehesten entsprechen: menschliche Hepatomzellen (HepG2) und murine immortalisierte Hepatozyten (AML12).

Die Expressionsplasmide für HCV-Core-Protein wurden für verschiedene Genotypen in den Basisvektor pcDNA3 kloniert: dem Genotyp 1b, der bei klinischen Untersuchungen im Vergleich zu anderen Genotypen eine erhöhte biologische Aktivität besitzt (s. Abschnitt 1.2.2.), dem Genotyp 1b eng verwandten Genotyp 1a, sowie dem im Vergleich zu anderen häufig vorkommenden Genotypen in seiner Sequenz am weitesten von 1b abweichende Genotyp 3a.

Von den Genotypen 1a und 1b wurden drei verschiedene, an den hypothetischen Schnittstellen (s. Abschnitt 1.2.3.) C-terminal trunkeerte HCV-Core Konstrukte zur Protein-Expression aus dem Vollängenkonstrukt (aa 1-191: HC2-5) subkloniert: ein der möglichen Schnittstelle des Core-Proteins an Position aa148 entsprechendes Konstrukt (aa 1-148: HC2-4) sowie eine Trunkierung an der möglichen Signalase-Schnittstelle aa115 (aa 1-115: HC2-3) (s. Abb. 12).

Die Amplifikation des durch PCR aus Serum bzw. zur Subklonierung aus Plasmid gewonnenen Inserts, die Einklonierung und Klonselktion, wurde wie in Abschnitt 3.5. beschrieben durchgeführt. Aus dem Vollängenkonstrukt des Genotyps 1b (pHC2-5/1b) wurde durch Site-Directed Mutagenese mit den Primern HC2-9(R/K)-

HindIII und HC5-1b-XbaI ein weiteres Plasmid über HindIII und XbaI in pcDNA3 subkloniert, bei der an aa-Position 9 ein bei Referenzsequenz M58335 vorhandenes Arginin gegen Lysin ausgetauscht wurde (pHC2-5/1bmut).

Zur anfänglichen Expression von HCV-Core-Protein in *E. coli*, wurde das Vollängen-Insert HC2-5/1a in den prokaryotischen Basisvektor pTrc99a inkloniert.

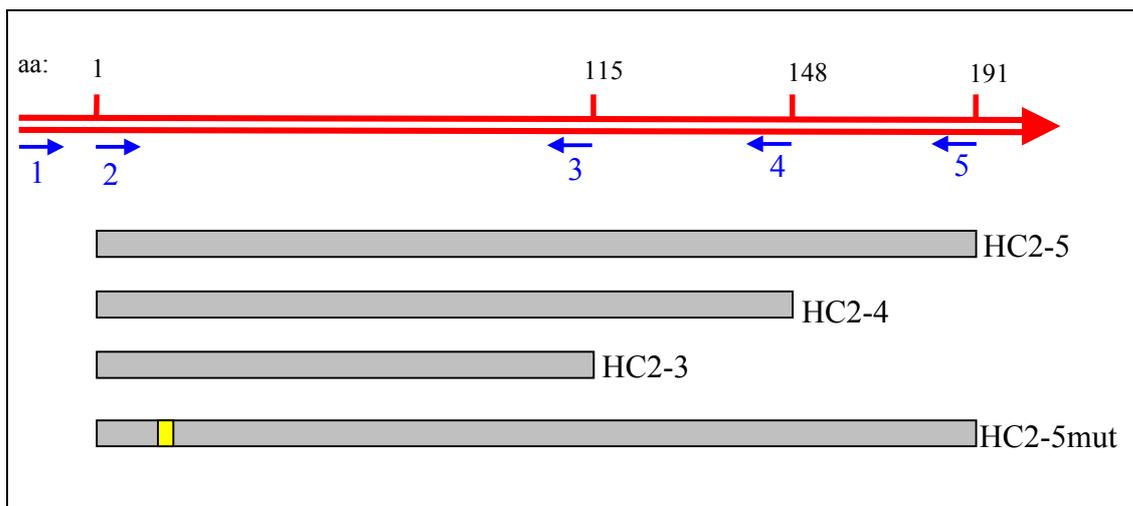


Abb.12: Übersicht über die konstruierten, co-aminoterminalen HCV-Core Inserts. Die zur Klonierung verwendeten Primerpositionen sind durch blaue Pfeile wiedergegeben.

Die hergestellten HCV-Core-Expressionsplasmide sind im einzelnen:

pTrc99a/HC2-5:

Isoliert per semi-nested-PCR mit den Primern HC1, HC5 und HC2, HC5 aus einem HCV-positiven Blutspenderplasma (Genotyp 1a) aus der Plasmasammlung der Abt. Med. Mikrobiologie der Universität Göttingen. Einkloniert über EcoRI und SalI in pTrc99a.

pHC2-5/1a, pHC2-4/1a, pHC2-3/1a:

Subkloniert aus dem prokaryotischen Vektor pTrc99a/HC2-5. Insert gewonnen mit den Primern HC2-EcoRI und HC3/4/5-1a-XbaI, über EcoRI und XbaI in pcDNA3 inkloniert.

pHC2-5/1b, pHC2-4/1b, pHC2-3/1b:

Subkloniert aus einem Referenzplasmid für die Sequenz M58335 (Gesamtgenom freundlicherweise von Dr. S.-E. Behrens, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin Gießen, zur Verfügung gestellt). Insert mit den Primern HC2-HindIII und HC3/4/5-1b-XbaI gewonnen und über HindIII und XbaI in pcDNA3 kloniert.

pHC2-5/3a:

Isoliert aus dem Serum eines Patienten mit chronischer HCV-Infektion (Genotyp 3a), Serumsammlung Gießen. Amplifikation des Inserts mit den Primern HC2-HindIII und HC5-3a-XbaI und Klonierung in pcDNA3 über HindIII und XbaI.

Die klonierten Expressionsplasmide wurden zur Überprüfung des korrekten Leserasters und dem Vorhandensein möglicher Mutationen sequenziert. Der Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz ist in Abb. 13 dargestellt. Hierbei ist die Sequenz des Genotyps 1b mit der Referenzsequenz [M58335] identisch. Die Sequenzen der 1a- und 3a-Konstrukte sind typisch für den jeweiligen Genotyp.

1b	MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRAPR
1bmut	-----K-----
1a	-----T-----
3a	-----T-----
1b	KTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRTWAQPGYPWPLYGNEGLGWAGWLLSPR
1bmut	-----
1a	-----C-----
3a	-----S--S-----C-----
1b	GSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAARALAH
1bmut	-----
1a	---N-----
3a	-----N-----A-----V--V-----
1b	GVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTTPASA
1bmut	-----
1a	-----V-----
3a	---A---I--F-----F---IH--AS

Abb. 13: Vergleich der Protein-Sequenz der isolierten und klonierten HCV-Core-Klone. Zur Sequenz HC-1b identische Aminosäuren sind durch Striche wiedergegeben. Die Positionen der Verkürzungen sind blau markiert.

4.2 Expression des HCV-Coreproteins *in vitro*

4.2.1. Protein-Expression im prokaryoten System

Zur Expression des aus Patientenserum gewonnenen und in pTrc99A einklonierten HCV-Core-Proteins wurden mehrere Vorversuche zur Optimierung unternommen, da zum einen der Aufschluß der Core-exprimierenden Bakterien wie auch das Auftreten einer massiven Degradation des Core-Proteins problematisch waren. Durch das in Abschnitt 3.10. dargelegte Verfahren konnte schließlich das rekombinante Core-Protein im Western-Blot nachgewiesen werden.

Der Bakterienstamm *E. coli* JM109 wurde mit dem Plasmid pTrc99A/HC2-5 bzw dem Leervektor pTrc99A transformiert. Die das Plasmid enthaltenden Klone wurden selektiert und in Vorkulturen inkubiert. Nach erfolgter Induktion mit IPTG in 50 ml LBamp/5 % Glucose erfolgte die Proteinextraktion und der Proteinnachweis mittels Immunblot.

Als erster Antikörper wurde ein monoklonaler anti-HCV-Core-IgG-Ak (Fa. Biotrend, aa 1-120) 1:1000 verwendet; der Nachweis erfolgte über einen Peroxidase-markierten anti-Maus-IgG-Ak aus Schafserum 1:2000 und der ECL-Methode.

Es konnte ein rekombinantes HCV-Core nachgewiesen werden, das etwa 20 kD entsprach (s. Abb. 14), darüber hinaus erkannte der Ak auch bakterielle Degradationsprodukte des Core-Proteins. Das Protein fand sich überwiegend in der löslichen Zellfraktion.

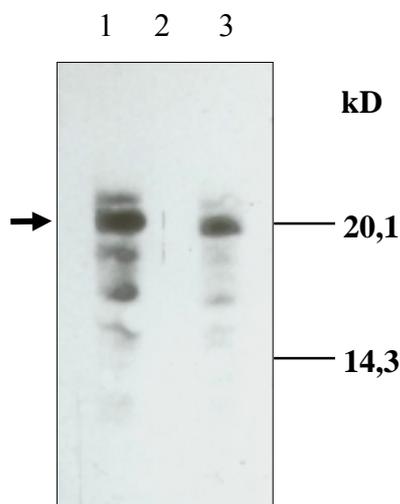


Abb.14: Immunblot des rekombinanten HCV-Core-Proteins aus *E.coli* JM109 transformiert mit pTrc99a/HC2-5. Monoklonale anti-HCV-Core-IgG-Ak als 1. Antikörper (Core aa. 1-120)

- 1 : transformierte *E. coli*/ lösliche Fraktion
- 2.: Kontrolle *E. coli*/ lösliche Fraktion
- 3.: transformierte *E. coli*/ unlösliche Fraktion

4.2.2. Protein-Expression von HCV-Core-Varianten in Leberzellen

Zum Nachweis des rekombinanten HCV-Core-Proteins im eukaryoten System wurden AML12-Zellen nach der Lipofectamin-Methode mit den Core-Konstrukten bzw. dem Leervektor als Negativkontrolle transfiziert und nach 24 h in RIPA-Puffer mithilfe der Gefriermethode geerntet.

Das Lysat wurde mit gleicher Menge 2 x Laemmli-Puffer/2% DTT vermischt und 5 Min. bei 95° C inkubiert. Nach dem erneuten Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden von der löslichen Fraktion jeweils 100 µl in einem 12% PAGE-Gel aufgetrennt. Es folgte ein Immunblot; die Absättigung der Membran erfolgte mit Roti-Block (Fa. Roth, Karlsruhe), was nach erfolgter Detektion durch den monoklonalen aHCV-Core-Ak (Fa. Dianova, Core aa 110 – 190) 1:2000 ein erneutes Detektieren der gleichen Membran ermöglicht. Für diesen zweiten Nachweis wurde gefälltes IgG 1:200 aus antiHCV-positivem Patientenserum verwendet, das mit Acetonpulver abgesättigt wurde. Als zweiter Ak wurde beim ersten Nachweis antiMaus-IgG aus Schaf- bzw. bei gefälltem Serum antiHuman-IgG aus Kaninchenserum jeweils 1:2000 eingesetzt. Es folgte dann die Detektion mittels ECL-Methode.

Bei den mit den Vollängen-Konstrukten transfizierten Zellen war ein Expressionsprodukt von etwa 20 kD zu erkennen (s. *Abb 15 A/B*). Auffällig ist die etwas höher laufende Bande der Core-Mutante des Plasmids pHC2-5/1b-mut besonders im Vergleich zur Bande des Proteins aus pHC2-5/3a (*Abb. 15 A*, Spur 6 im Vergleich zu Spur 4), da die Core-Mutante wie zu erwarten nicht weiter zu einem p19 prozessiert wird.

Eines der verkürzten Produkte (pHC2-4/1a) war bei einer Größe von etwa 17 kD noch schwach zu erkennen (*Abb. 15 A*, Pfeil), wohingegen das Produkt des Plasmids pHC2-4/1b (Spur 3) nicht nachzuweisen war.

Der verwendete monoklonale Antikörper scheint eine höhere Affinität zum Genotyp 1a zu besitzen, da das exprimierte Core-Protein aa1-191/Genotyp 1a (Spur 5) im Verhältnis zu den Vollängenkonstrukten der anderen Genotypen stärker hervortritt und sich dies auch im noch schwachen Nachweis des verkürzten Core-Proteins aa1-148/Genotyp 1a (Spur 2) zeigt. Da der verwendete monoklonale Ak mit einem Peptid für das HCV-Core-Protein aa 110 – 190 hergestellt wurde, ist nur ein sehr

schwacher Nachweis der verkürzten Konstrukte zu erwarten. Durch die Verwendung der hoch empfindlichen ECL-Methode wird eine minimal vorhandene Differenz darüberhinaus noch überhört. Hieraus resultieren wohl die unterschiedlichen Intensitäten der Banden.

Es wurde aber gezeigt, daß die klonierten Core-Konstrukte in der Lage waren, HCV-Core in den verwendeten Zelllinien zu exprimieren.

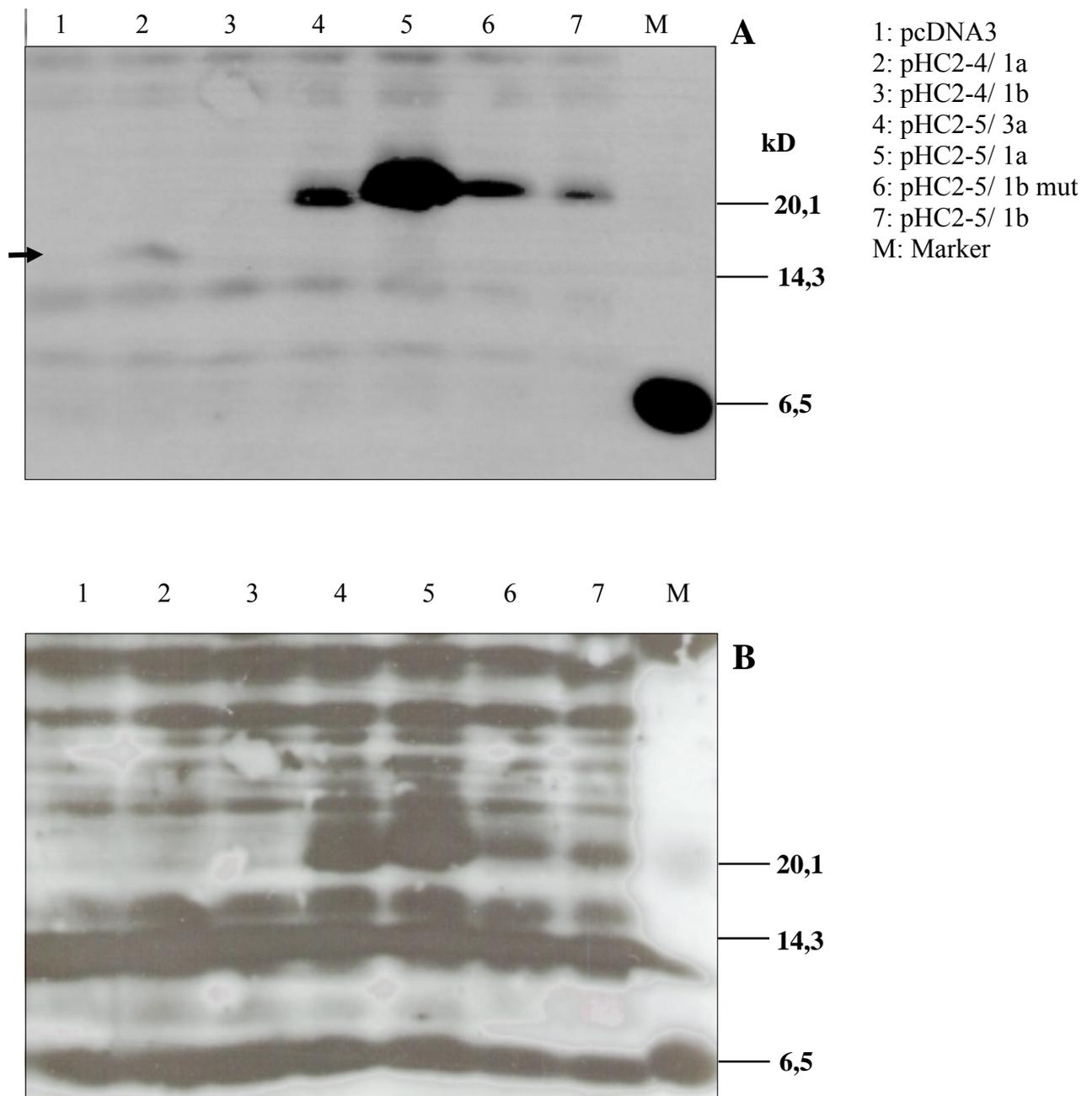


Abb.15 A/B: Western-blot von AML12-Zellen transfiziert mit HCV-Core-Konstrukten, gleicher Lauf mit verschiedenen Ak detektiert. (A): 1. Antikörper monoklonales IgG gegen HCV-Core aa 110-190 (Fa. Dianova); (B): Inkubation mit aus HCV-positivem Patientenserum gefälltem polyvalentem IgG.

4.2.3. Dimerisierung des Core-Proteins *in vitro*

Zur Überprüfung der Antikörper und des eingesetzten Patientenserums auf ihre Sensitivität im Westernblot, wurde uns ein aus *E. coli* gereinigtes rekombinantes Core-Protein des Subtyps 1b überlassen (Prof. Dr. R. Bartenschlager, Mainz).

Nach erfolgter Verdünnung der Proben in 1 x Laemmlipuffer/ 5% β -Mercaptoethanol, Auftrennung in einem 12% PAGE-Gel und nachfolgendem Western-blot mit gefälltem und abgesättigten IgG 1:200 aus HCV-positivem Patientenserum als ersten Ak, und anti-humanIgG aus Kaninchen 1:2000 als zweiten Ak, konnte die Sensitivität der verwendeten Methode bei längerer Exposition des Films (3 Min.) auf etwa 10 pg Core-Protein geschätzt werden.

Auffällig war hierbei die Bildung von HCV-Core-Homodimeren bei den Proben höherer Konzentration, die bei einer Höhe entsprechend etwa 38 kD erkennbar sind (Abb. 16) Die Dimerisierung trat trotz der Behandlung mit β -Mercaptoethanol und der Gegenwart von 0,1 bzw 1% SDS im Gel und dem Laufpuffer auf. Eine solche Dimerisierung und nachfolgend eine Multimerisierung des HCV-Core-Proteins ist bei Expression in Insektenzellen bislang nur nach Behandlung mit dem Vernetzer Glutaraldehyd beschrieben worden (SEITZ H. 1998). Die Dimerisierung ist hierbei im Bereich des Aminoterminus vermutet worden, was allein schon mit den vorhandenen hydrophoben Wechselwirkungen erklärbar scheint.

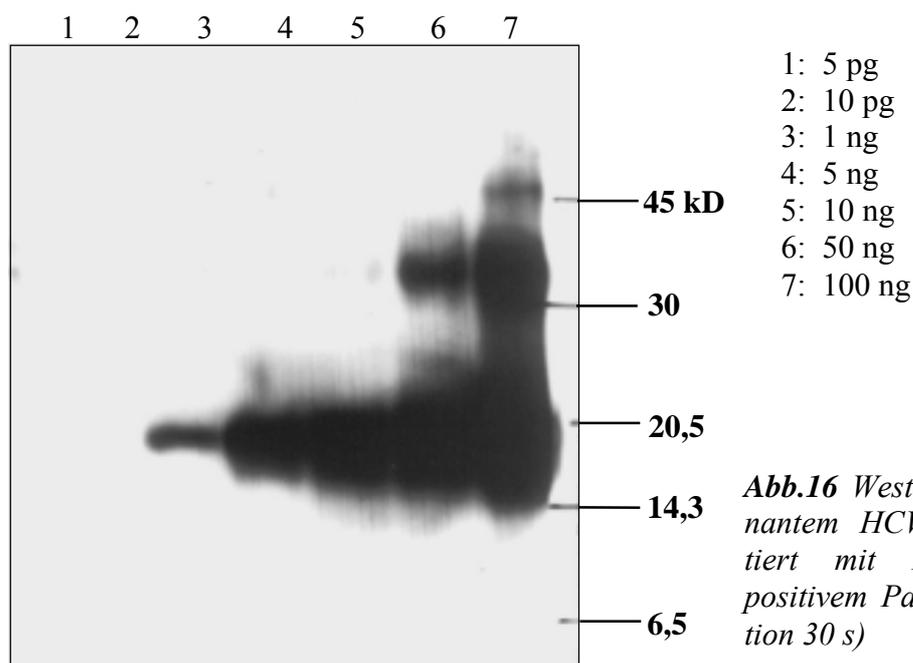


Abb.16 Western-blot von rekombinantem HCV-Core-Protein detektiert mit IgG aus antiHCV-positivem Patientenserum (Exposition 30 s)

4.3 Repression der HBV-Enhancer durch das HCV-Core-Protein

Um den Einfluß des HCV-Core-Proteins und seiner C-terminalen Verkürzungen auf den Wildtyp der HBV-Enhancer zu überprüfen, wurden die entsprechenden Plasmide in zwei verschiedene Zelllinien kotransfiziert. Hierbei ist die Expression der Luciferase als Reporter gen ein direktes Maß für die Aktivität der HBV-Enhancer. Diese kann im oben beschriebenen Luciferase-Assay gemessen werden. Die Transfektionen erfolgen stets im Dreifachansatz, werden im BCA-Assay nach ihrem Gesamtproteingehalt standardisiert und im Luminometer gemessen. Die Luciferase-Expression wird jeweils auf die Expression des mit dem Leervektor kotransfizierten Luciferase-Plasmids bezogen (Basisaktivität als 1 definiert).

4.3.1. Enhancer I/ X-Promotor

Als Reporter gen wurde zunächst das Plasmid pLuci-EI zur Kotransfektion mit den Plasmiden pHC2-5/1b, pHC2-4/1b und pHC2-3/1b eingesetzt. Das Experiment wurde jeweils in HepG2- und in AML12-Zellen durchgeführt.

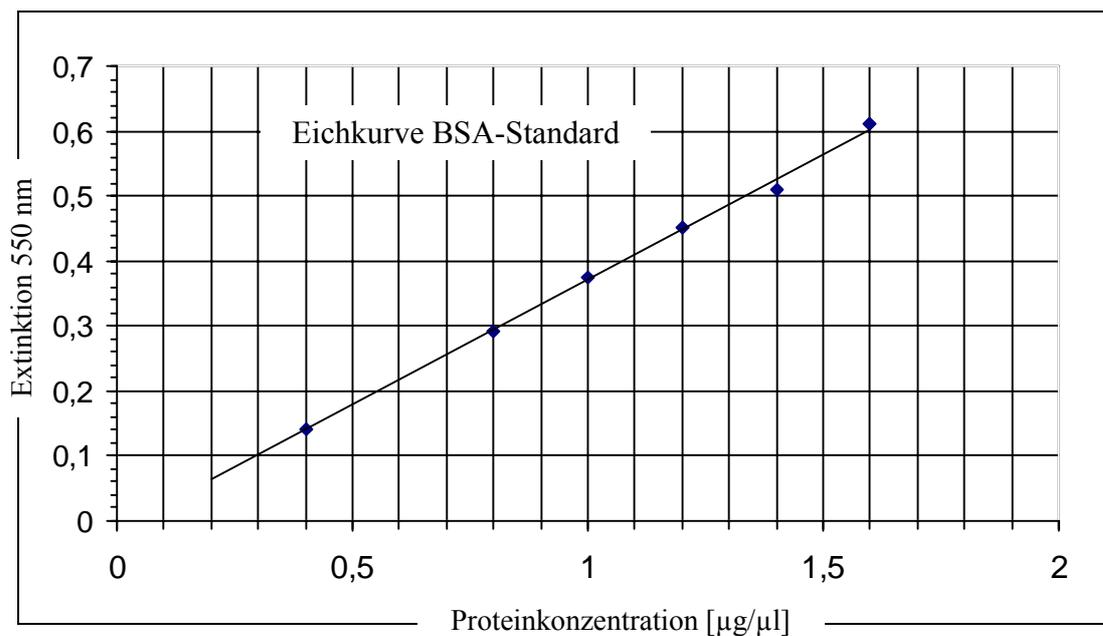
Zur Verdeutlichung der Ergebniserrechnung seien hier exemplarisch die Rohdaten und ihre Aufbereitung anhand dieser Transfektion in AML12-Zellen gezeigt. (Die Tabellen 2 und 3 sowie die Abbildungen 17 und 18a beziehen sich auf das gleiche Experiment).

Es wurden jeweils 1×10^6 AML12-Zellen in 6-Loch-Platten (Durchmesser 35 mm) am Vortag ausplattiert. Die Transfektion erfolgte im Dreifachansatz, wobei pro Napf 3 µg des jeweiligen HCV-Core-Plasmides und 1,5 µg Reporterplasmid eingesetzt wurden. Die Transfektion erfolgte nach der Lipofektamin-Methode durch Zugabe von 20 µl Lipofektamin pro Napf; diese wurde in einem Maxiansatz mit serumfreiem Medium vorverdünnt, um Pipettierfehler zu minimieren. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch das Lyseverfahren mithilfe von Detergenzien geerntet.

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Lysate, wurde mit je 10 µl ein BCA-Assay durchgeführt; als Standard diente Bovines Serumalbumin (BSA 0,2 µg/µl). Aus den doppelt gemessenen Lysaten wurde der Mittelwert berechnet und anhand einer Eichkurve der Proteingehalt der Lysate. Aus diesem konnte die notwendige Menge an Lysat berechnet werden, die bei Verdünnung mit 250 mM Tris-HCl pH 7,8 auf ein Endvolumen von 50 µl einen standardisierten Gesamtprotein-Einsatz von 15 µg ergab.

Tab. 2 /Abb. 17: BCA-Assay, Rohdaten und BSA-Standard zur Transfektion von HBV-EI und HCV-Core in AML12 (s. Text)

Ansatz Nr.	Plasmid	Ext. 1 550 nm	Ext. 2 550 nm	MW (Ext.)	Protein [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl Puffer	μl Lysat
1	pHC2-5/1b	0,129	0,122	0,126	0,665	27,4	22,6
2		0,114	0,120	0,117	0,620	25,8	24,2
3		0,123	0,124	0,124	0,655	27,1	22,9
4	pHC2-4/1b	0,123	0,130	0,127	0,671	27,6	22,4
5		0,133	0,142	0,138	0,729	29,4	20,6
6		0,138	0,143	0,141	0,745	29,9	20,1
7	pHC2-3/1b	0,134	0,144	0,139	0,737	29,6	20,4
8		0,135	0,151	0,143	0,758	30,2	19,8
9		0,139	0,132	0,136	0,718	29,1	20,9
10	pcDNA3	0,131	0,136	0,134	0,708	28,8	21,2
11		0,154	0,161	0,158	0,835	32,0	18,0
12		0,158	0,173	0,166	0,877	32,9	17,1



Die so standardisierten Lysate konnten nun im Luminometer gemessen werden, wobei automatisch 80 μ l Luciferin-Mix zugegeben wurden und eine Messung der Lichtemission für 10 s erfolgte. Die Angabe der Rohdaten erfolgte hier in RLU (relative light units). Aus den erhobenen Daten für die Dreifachansätze konnte nun der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet werden. Die Luciferaseaktivität des Enhancer-Konstruktes bei Kotransfektion mit dem Leervektor (pcDNA3) wurde als Basisaktivität 1 definiert und die Aktivitäten der übrigen Ansätze hierzu in Bezug gesetzt (s. *Tab. 3* und *Abb. 18a*).

Tab.3: Datenerhebung (s. Text) bei Transfektion von pL-EI mit verkürzten HCV-Core-Konstrukten des Genotyps 1b (MW: Mittelwert, σ : Standardabweichung/MW)

Ansatz Nr.	Plasmid	abs. Luciferase-Aktivität [rlu]	MW	σ	Relative Luciferaseaktivität
1	pHC2-5/1b	47993	107255	0,44	0,09
2		109302			
3		164471			
4	pHC2-4/1b	378975	376738	0,05	0,32
5		398645			
6		352594			
7	pHC2-3/1b	423052	381289	0,12	0,33
8		314445			
9		406371			
10	pcDNA3	1301157	1168866	0,08	1
11		1069064			
12		1136378			

Das Transfektions-Experiment in HepG2-Zellen mit diesen Konstrukten wurde in gleicher Weise durchgeführt (s. *Abb 18b*). Im Vergleich zeigt die Suppression durch die Core-Konstrukte in HepG2-Zellen eine geringere Aktivität gegenüber den Experimenten in AML12-Zellen. Liegt die maximale Suppression bei dem Vollängen-Wildtyp-Core pHC2-5/1b in murinen Hepatozyten bei etwa 10fach, so ist diese in den humanen HepG2-Zellen etwa 6fach. Insgesamt zeigen die trun-kierten Core-Proteine eine signifikante Suppressionsaktivität zwischen 2 – 3fach, diese liegt aber stets unter jener des Vollängenkonstrukts.

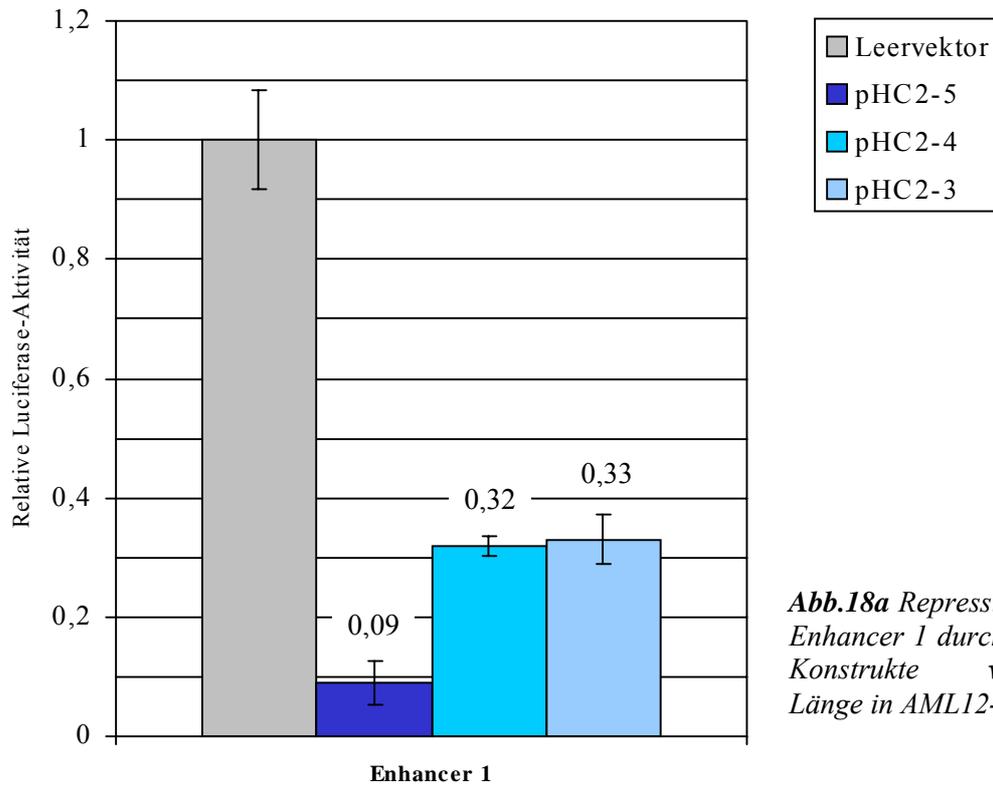


Abb.18a Repression des HBV-Enhancer 1 durch HCV-Core-Konstrukte verschiedener Länge in AML12-Zellen

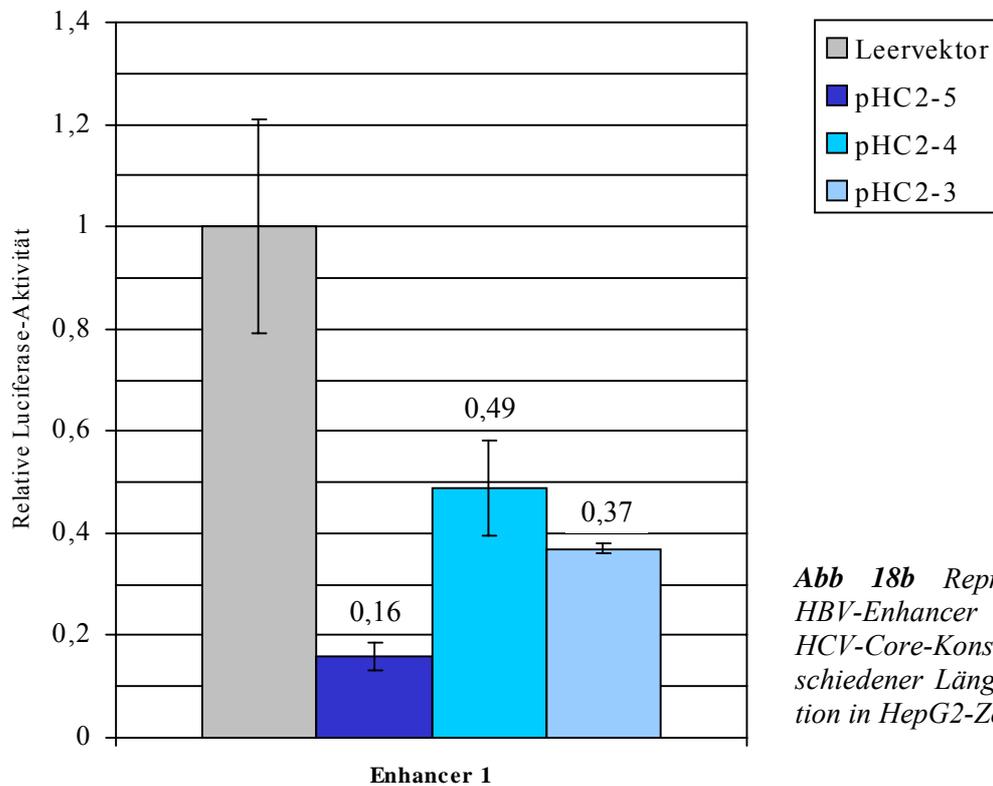


Abb 18b Repression des HBV-Enhancer 1 durch HCV-Core-Konstrukte verschiedener Länge. Transfektion in HepG2-Zellen

4.3.2. Enhancer II/ Core-Promotor

Im direkten Vergleich beider Enhancer-Konstrukte, pLuciEI und pLuciEII bezüglich ihrer absoluten Basisaktivität bei den vorliegenden experimentellen Bedingungen, zeigte sich in Vorversuchen, daß die Basisaktivität des EnhII um den Faktor 10 – 15 niedriger war als bei dem EnhI. Dies konnte durch eine Steigerung der eingesetzten DNA nicht wesentlich verändert werden und ist bei der Bewertung der Transfektionsexperimente zu beachten.

In gleicher Weise, wie bei der Untersuchung der Aktivität des HBV-Enhancer I-Konstruktes bei Kotransfektion mit trunkierten HCV-Core-Plasmiden, wurden die Experimente mit dem Enhancer II (pLuci-EII) durchgeführt.

Es zeigte sich, daß die Suppression des EnhII durch pHC2-5/1b in einem signifikanten Bereich von etwa 3 – 4 liegt; die Aktivität der verkürzten Konstrukte ist jedoch, besonders bei Transfektion in HepG2-Zellen, nicht signifikant und eher uneinheitlich (*Abb. 19a und b*). Einen vorliegenden eindeutigen Suppressions- bzw. Transaktivierungseffekt würde man bei diesem Assay erst bei einer Aktivität $<0,5$ bzw. >2 annehmen dürfen.

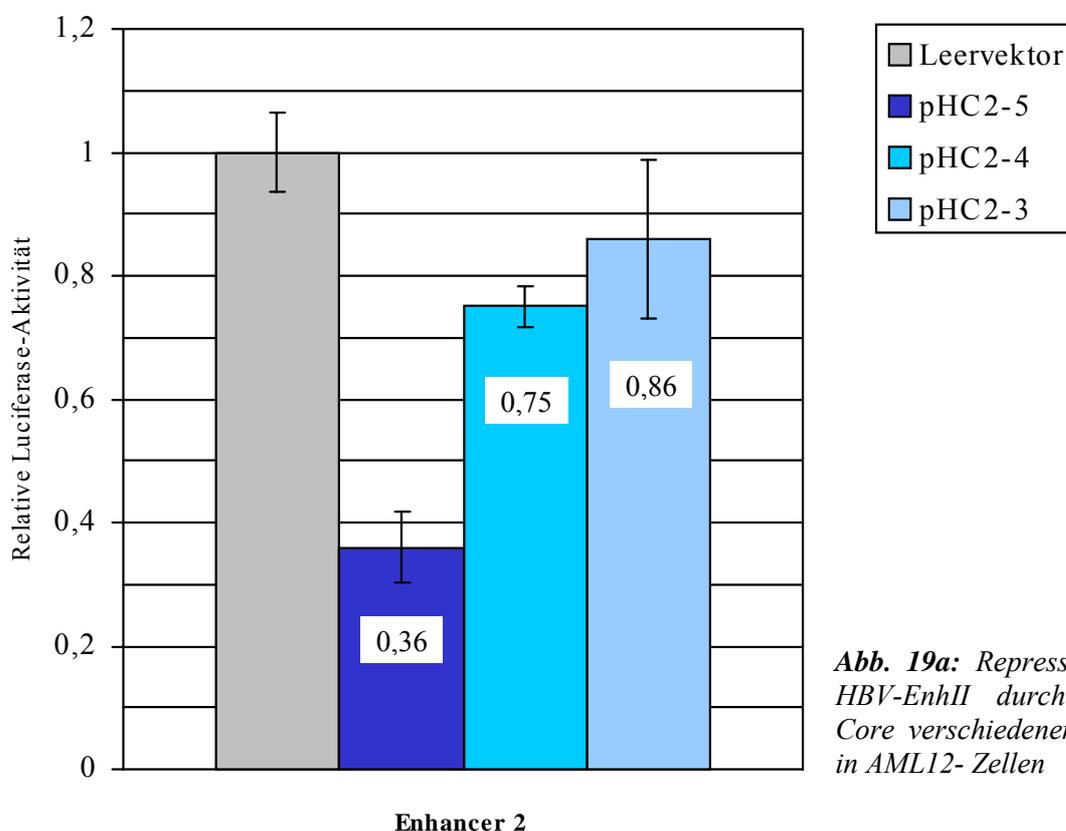


Abb. 19a: Repression des HBV-EnhII durch HCV-Core verschiedener Länge in AML12- Zellen

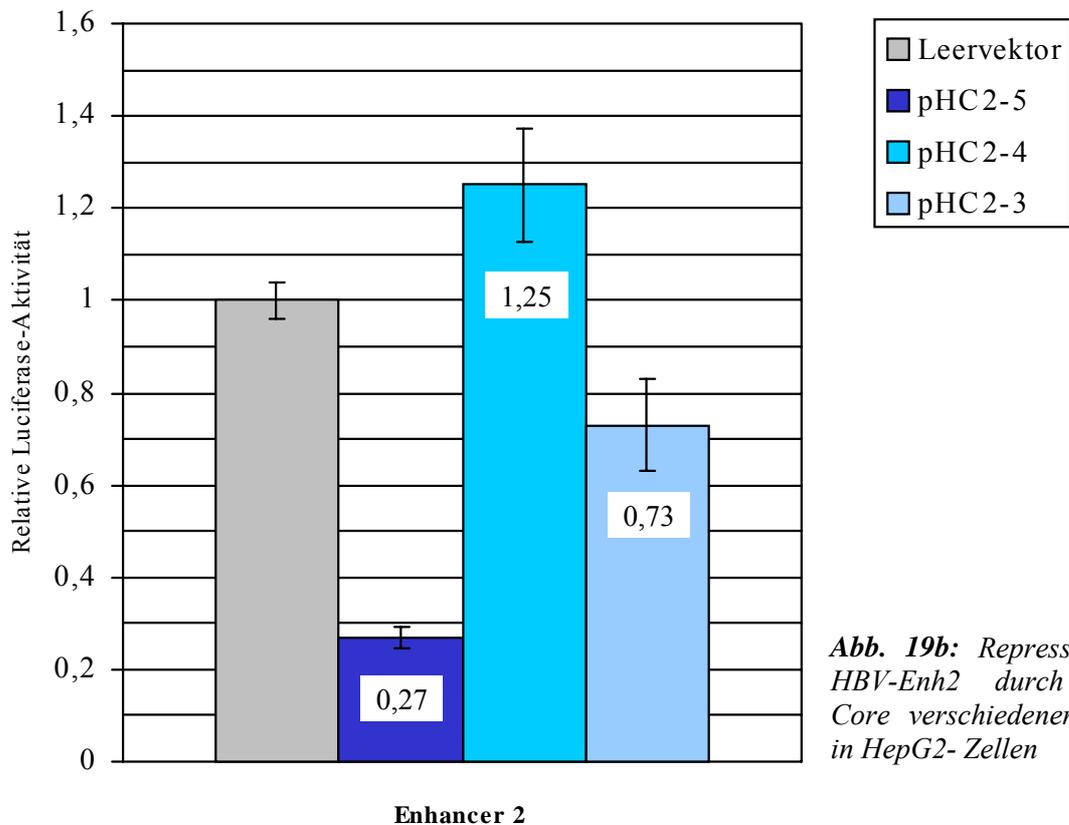


Abb. 19b: Repression des HBV-Enh2 durch HCV-Core verschiedener Länge in HepG2-Zellen

4.3.3. Repressionsaktivität verschiedener HCV-Core-Genotypen

Im klinischen Verlauf einer chronischen Hepatitis C wurde eine erhöhte biologische Aktivität des Genotyps 1b vermutet (s.o.). Zur Beurteilung, ob das Core-Protein des Genotyp 1b ebenfalls eine höhere Repressionsaktivität im Vergleich zu anderen Genotypen zeigt, wurden die entsprechenden Core-Konstrukte mit dem Reporterplasmid pLuci-EI in AML12-Zellen in einem Dreifachansatz kotransfiziert.

Es zeigte sich beim Wildtypkonstrukt des Genotyps 1b (pHC2-5/1b) eine Repression des EnhI um den Faktor 10 (s. Abb. 20) wie bei den obigen Experimenten ebenfalls, während die Konstrukte der Genotypen 1a und 3a nur etwa um den Faktor 5 reprimierten, und damit nur die Hälfte der Aktivität des Genotyps 1b aufwiesen.

Auffallend zeigte sich die nicht-prozessierte Core-Mutante pHC2-5/1bmut, die eine Suppressions-Aktivität von nur ca. 2,5 erreichte.

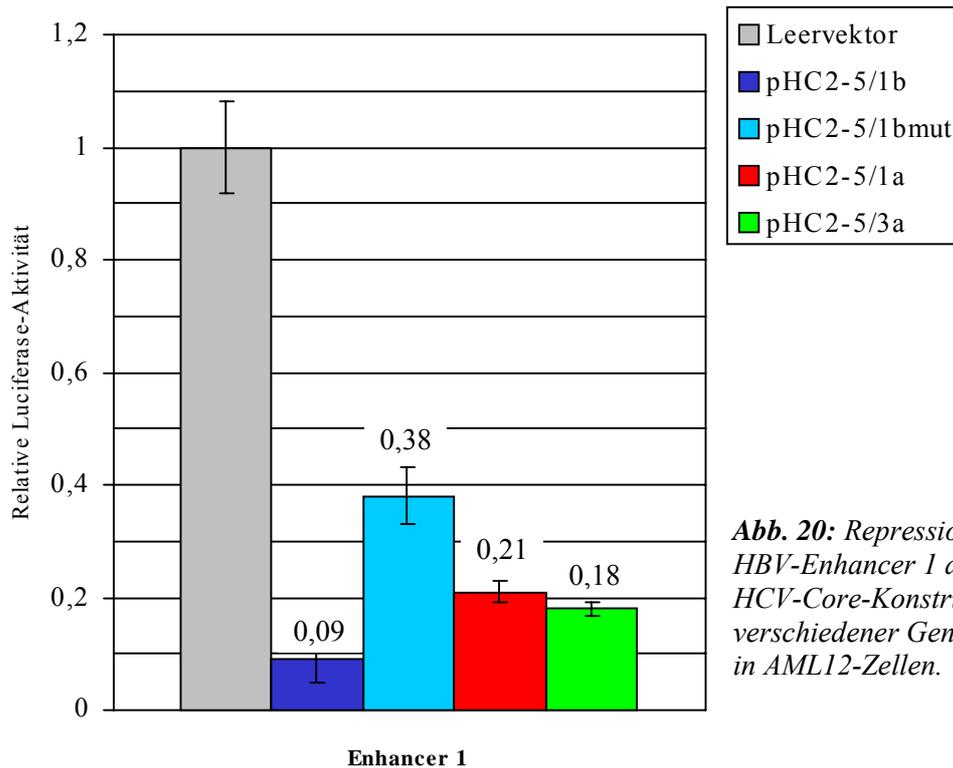


Abb. 20: Repression des HBV-Enhancer 1 durch HCV-Core-Konstrukte verschiedener Genotypen in AML12-Zellen.

Bei der Kotransfektion dieser Konstrukte mit dem Reporterplasmid pLuci-EII in AML12-Zellen zeigte sich bei einer insgesamt geringeren Luciferase-Aktivität (wie bei den obigen Experimenten mit dem EnhII-Konstrukt) kein signifikanter Unterschied in der Repressionsaktivität der verschiedenen Genotypen, die auch insgesamt deutlich niedriger war.

Aus dem HCV-Core-Expressionsplasmid des Genotyps 1a wurden ebenfalls trun-kierte Konstrukte subkloniert, die auf ihre Aktivität auf den EnhI hin untersucht wurden. Ein direkter Vergleich dieser mit den entsprechenden Plasmiden des Genotyps 1b zeigt *Abb. 21*. Auch bei diesen verkürzten Core-Plasmiden liegt, wie bei den Vollängenkonstrukten, ein Aktivitätsunterschied des Genotyps 1b zu 1a um etwa den Faktor 2 vor.

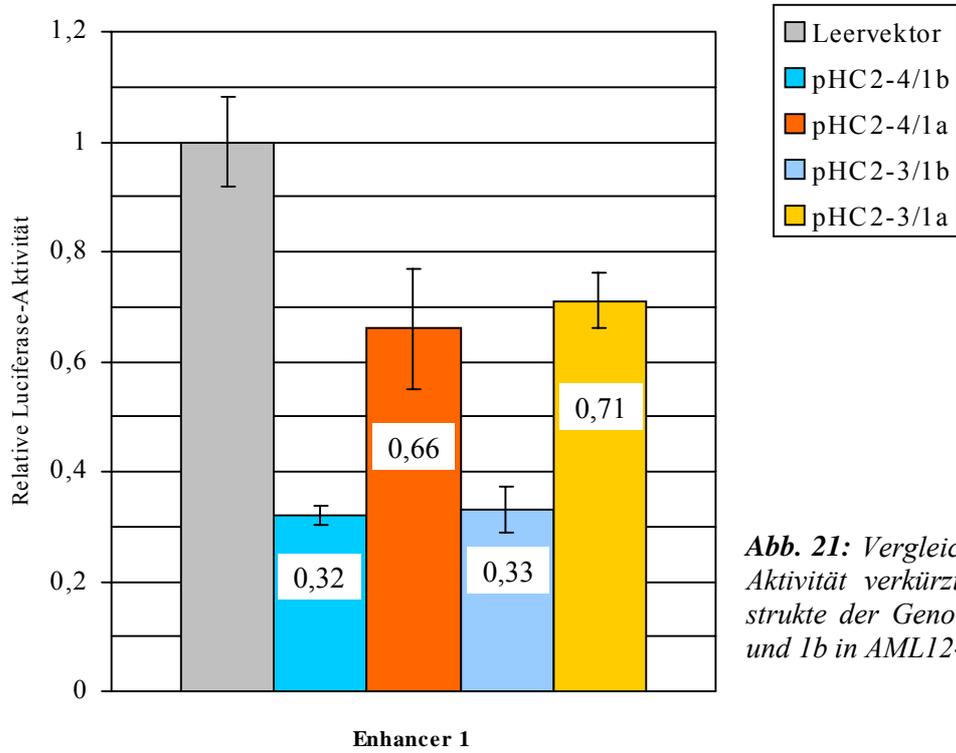


Abb. 21: Vergleich der EI Aktivität verkürzter Konstrukte der Genotypen 1a und 1b in AML12-Zellen

4.3.4. Konzentrationsabhängigkeit der Enhancer-Repression

Da man bei konstanten Plasmid-Mengen eine stets gleiche Expression von Core-Protein erzeugt, sollte untersucht werden, inwiefern die beschriebenen Effekte abhängig von der Menge an transfiziertem Reporter- und Core-Plasmid waren.

Hierzu wurden 1×10^5 AML12-Zellen/Napf in 24-Loch-Platten am Vortag ausgesät. Von dem zu transfizierenden Reporter-Plasmid pLuciEI wurden in einem Maxiansatz 1 μg in Medium einpipetiert, aufgeteilt, wobei dem einen Ansatz 1 μg des Core-Plasmids, dem anderen 1 μg pcDNA3-Leervektor beigefügt wurden. Durch eine Verdünnungsreihe ergaben sich folgende Konzentration, die mit Leervektor-DNA auf eine einheitliche DNA-Gesamtmenge von 1,5 μg DNA/Napf aufgefüllt wurden:

Core-Plasmid [ng]	1000	500	250	125	63	31	16	8
pLuciEI [ng]	500	250	125	63	31	16	8	4
μg pcDNA3 ad 1,5	0	0,75	1,13	1,31	1,41	1,45	1,48	1,49

Die Transfektion erfolgte im Doppelansatz mithilfe der Superfect-Methode in Anwesenheit von 5% FKS, um die Cytotoxizität des Transfektionsreagenz zu minimieren. Die Messung und Auswertung im Luciferase-Assay geschah wie oben beschrieben.

Abb. 22 zeigt den Verlauf der absoluten Luciferase-Aktivität bei verschiedenen Vollängenkonstrukten (cave: logarithmische Darstellung). Bei den maximalen Verdünnungstufen haben diese ihre maximale Repressionsaktivität und unterscheiden sich untereinander kaum, während bei Überexpression die Mutante pHC2-5/1bmut kaum Aktivität zeigt. Diese Abnahme der Aktivität bei höheren Konzentrationen kann mit einer Sättigungskinetik in Einklang gebracht werden.

Interessant ist der direkte Vergleich der relativen Luciferase-Aktivität zwischen Wildtyp pHC2-5/1b und der Mutante pHC2-5/1bmut (*Abb. 23*). Hier nähern sich die Aktivitäten der beiden Konstrukte erst bei niedrigen Konzentrationen einander an, während die Mutante im oberen Bereich keine signifikante Repressionsaktivität besaß.

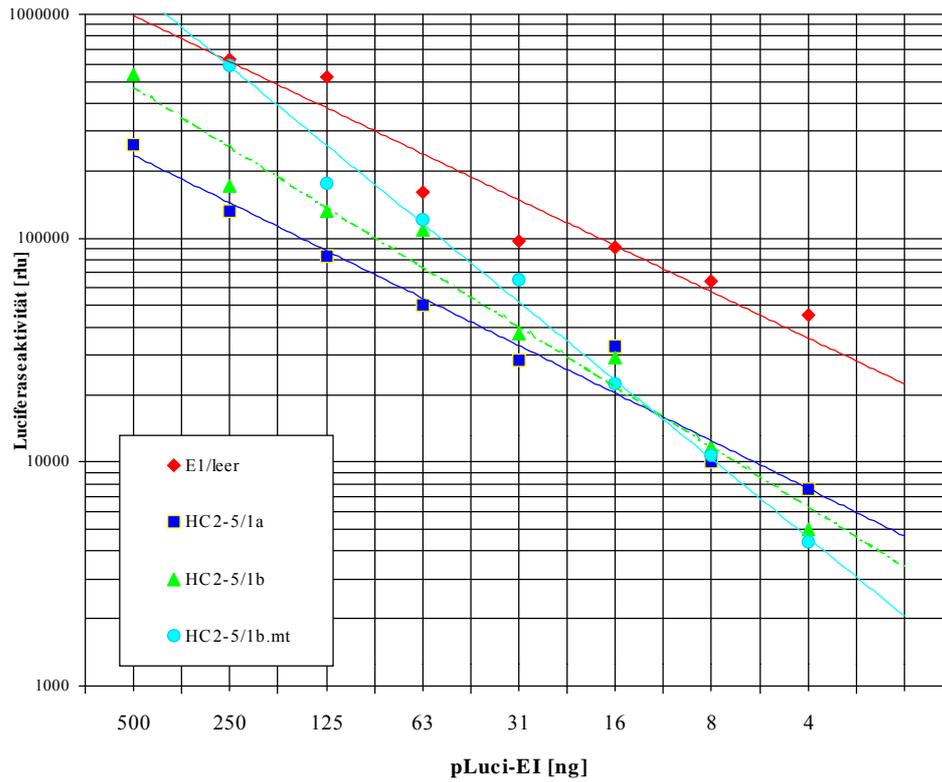


Abb. 22: Absolute Luciferase-Aktivität bei Transfektion von AML12-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von verschiedenen Vollängenkonstrukten des HCV-Core-Proteins mit dem HBV-Enhancer I. Regressionsgeraden sind eingefügt.

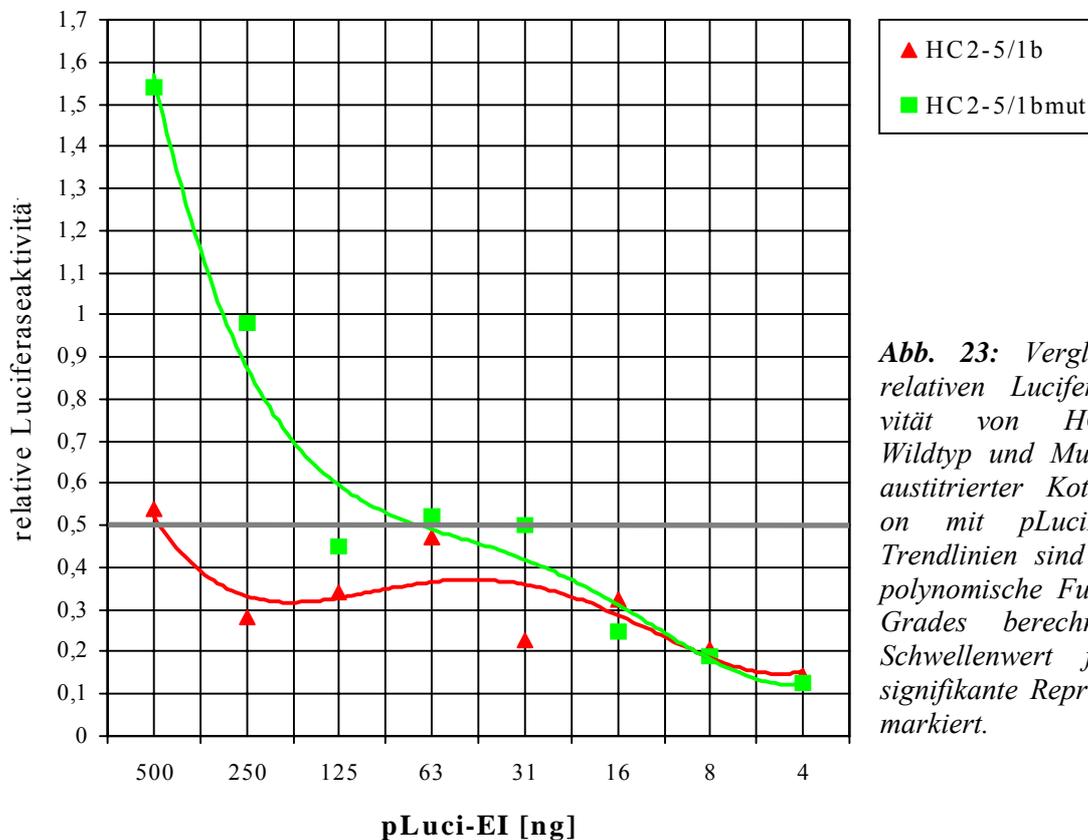


Abb. 23: Vergleich der relativen Luciferase-Aktivität von HCV-Core-Wildtyp und Mutante bei austitrierter Kotransfektion mit pLuciEI. Die Trendlinien sind für eine polynomische Funktion 4. Grades berechnet, der Schwellenwert für eine signifikante Repression ist markiert.

Es wurden auch die verkürzten Konstrukte des Genotyps 1b in diesen Titrations-Assay eingesetzt. Der Vergleich der relativen Luciferase-Aktivität (*Abb. 24*) zeigt für die Konstrukte HC2-4/1b und HC2-3/1b ein gegenläufiges Verhalten. Während das erstere bei hohen Konzentrationen keine signifikante Aktivität aufweist, verliert das letztere diese bei niedrigen Konzentrationen.

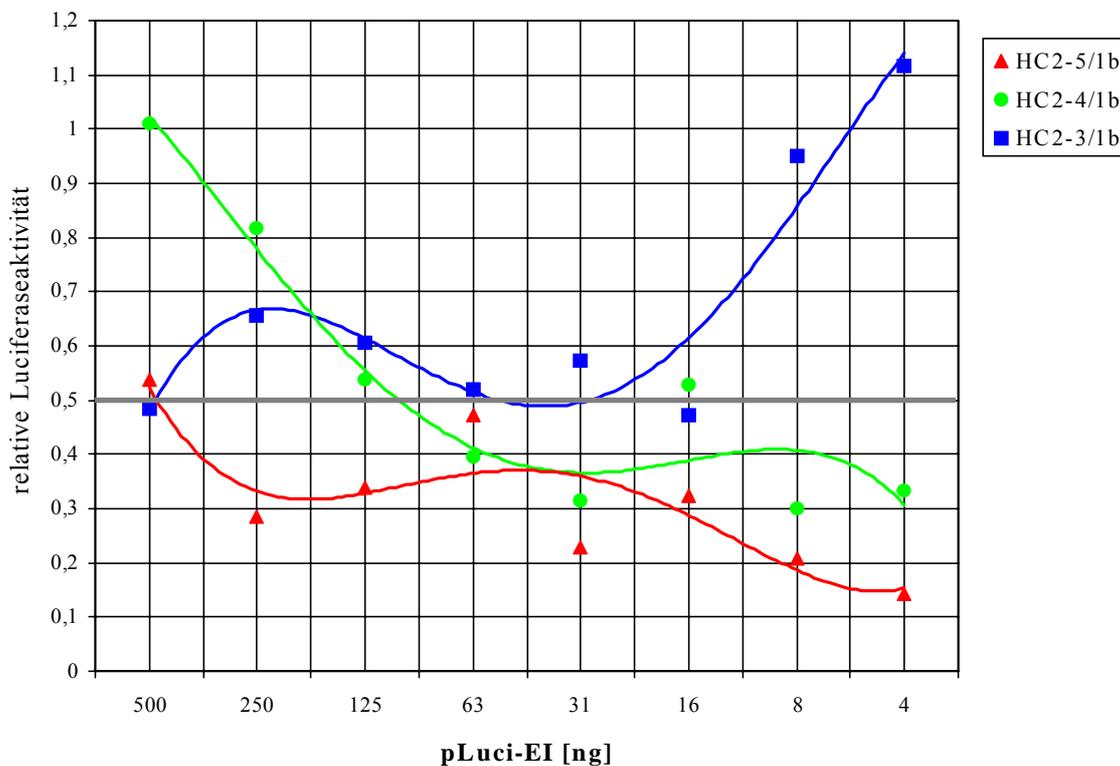


Abb. 24: Transfektion von AML12-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von verschiedenen trunkierten Konstrukten des HCV-Core-Proteins 1b mit dem HBV-Enhancer I im Konzentrationsverhältnis 2:1. Die Trendlinien sind für eine polynomische Funktion 4. Grades berechnet

Im Ergebnis konnte auch bei diesem Assay die Repressionsaktivität des HCV-Core-Proteins auf den EnhancerI gezeigt werden. Diese zeigt bei den Vollängenkonstrukten eine Sättigungskinetik, bei den trunkierten Konstrukten und der Mutante HC2-5/1bmut in ihrer Signifikanz einen stark konzentrationsabhängigen Verlauf.

Die Titrationsexperimente mit pLuciEII als Reporterplasmid waren nicht auswertbar, da aufgrund der schon sehr geringen Basisaktivität dieses Vektors (s.o.) bereits nach der zweiten Verdünnungsstufe die Lichtintensität in den Standardabweichungs-Bereich der Messung mit leerem Zellysat sank, und damit statistische Aussagen sinnlos wurden.

4.4 Repressionsaktivität bei HBV-Enhancer I-Deletionsmutanten

Wenn einzelne DNA-Strukturen des HBV, wie die Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen des Enhancer I im Zusammenhang mit der Supprimierbarkeit durch HCV-Core-Protein stehen sollten, so könnten diese Bereiche durch Verwendung verkürzter Enhancer-Sequenzen näher spezifiziert werden.

Abgeleitet von dem Vollängenkonstrukt pLuci-EI liegen von N. Fiedler subklonierte verkürzte Enhancer-Varianten vor. Das Reporterplasmid pLuci-EI enthält die Enhancer-Sequenz des Genotyps A im Bereich nt 1040-1372; zwei 5'-verkürzte Varianten, pLuci-EI(1114-1372) und pLuci-EI(1236-1372), wurden in einem Luciferase-Assay auf ihre Supprimierbarkeit bei Kotransfektion mit HCV-Core-Plasmiden hin untersucht.

Der Versuch wurde in 24-Loch-Platten mit 1×10^5 AML12-Zellen/Napf durchgeführt, wobei im Doppelansatz pro Napf 0,5 μ g des Enhancer-Konstruktes mit jeweils 1,0 μ g pHC2-5/1b, pHC2-4/1b, pHC2-3/1b oder pcDNA3 kotransfiziert wurden. Die Transfektion geschah mit SuperFect in Anwesenheit von 5% FKS.

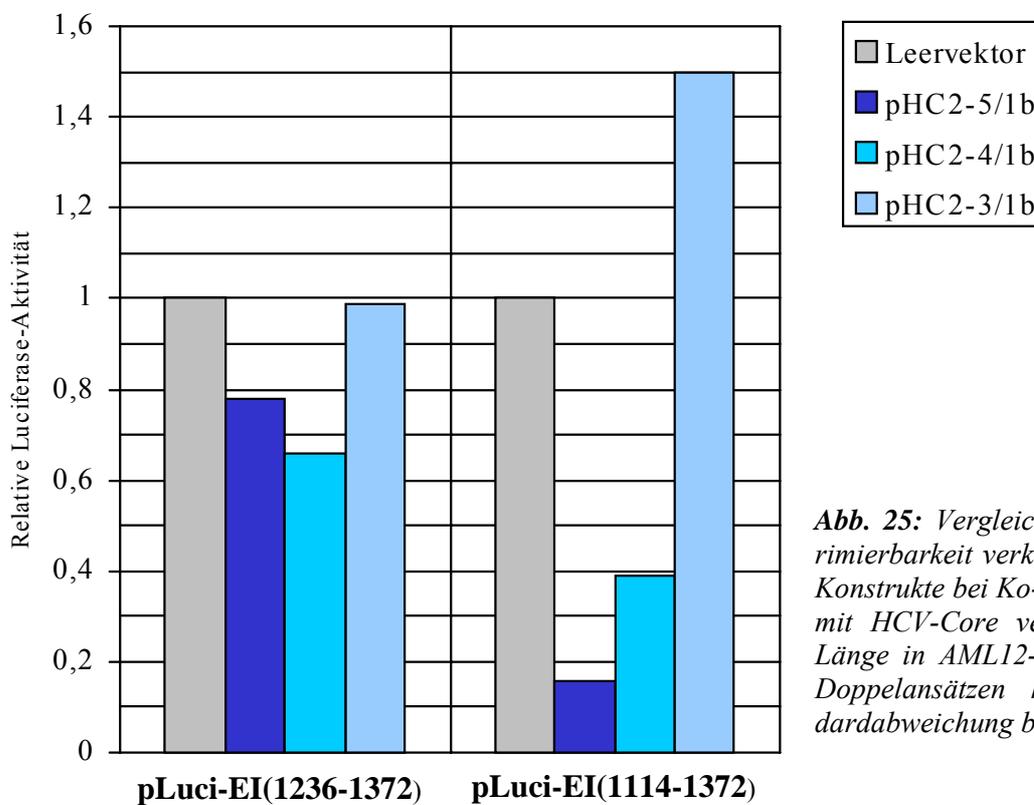


Abb. 25: Vergleich der Supprimierbarkeit verkürzter EnhI-Konstrukte bei Ko-transfektion mit HCV-Core verschiedener Länge in AML12-Zellen. (Bei Doppelansätzen keine Standardabweichung berechenbar)

Die Auswertung der Luciferase-Aktivität, unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehaltes der Lysate, zeigt eine noch vorhandene und mit dem Vollängenkonstrukt pLuci-EI (s. Abschnitt 4.2.1.) vergleichbare Supprimierbarkeit bei pLuci-EI(1114-1372). Das noch weiter verkürzte Konstrukt pLuci-EI(1236-1372) zeigt keine signifikante Suppression bei allen kotransfizierten HCV-Core-Plasmiden (s. *Abb. 25*).

4.5 Repressionsaktivität bei HBV-Enhancer II-Deletionsmutanten

Zur genaueren Eingrenzung der für die Suppression relevanten Sequenzabschnitte des Enhancer II, wurden die verkürzten Enh II-Plasmide des Genotyps D mit dem Expressionsplasmid des HCV-Core Genotyp 1b (pHC2-5/1b) kotransfiziert. Von jedem Enhancer-II-Plasmid wurde auch die entsprechende Variante in das Experiment einbezogen, die im Bereich nt 1763-1770 eine $\Delta 8\text{bp}$ -Deletion aufweist.

Die Transfektion wurde in niedrig passagierten (Passage 102) HepG2-Zellen durchgeführt. Dazu erfolgte die Aussaat von 1×10^5 Zellen/Napf in 24-Loch-Platten und die Kotransfektion im Dreifachansatz mit je $0,5 \mu\text{g}$ Enhancer-II-Reporterplasmid und $1 \mu\text{g}$ pHC2-5/1b bzw. $1 \mu\text{g}$ Leervektor pcDNA3; zur Minimierung von Pipettierfehlern wurden die Enhancer-Plasmide in einem Maxiansatz pipettiert und in die Portionen für Leer- und Expressionsplasmid aufgeteilt. Die Transfektion schließlich wurde mit $5 \mu\text{l}$ SuperFect/Napf und der Luciferase-Assay in der oben beschriebenen Weise durchgeführt.

Abb. 26 zeigt die Position des jeweiligen Inserts der Reporterplasmide im Bereich des Enhancer II und entsprechend tabellarisch die gemessene relative Luciferaseaktivität. Die gemessene Suppressionsaktivität schwankt jeweils zwischen einer signifikanten Repression ($< 0,5$) und einer statistischen Grauzone ($0,5 - 0,65$) wobei eher die Tendenz zu sehen ist, daß mit steigender Verkürzung die Suppression klarer zum Vorschein tritt. Die geringe Basisaktivität der Reporterplasmide (max. absolute Luciferaseaktivität etwa 20000 rlu) mag die Ursache für diese Schwierigkeit darstellen wie bereits oben bei den Untersuchungen zum Enhancer II des Genotyps A dargelegt ist (s. Abschnitt 4.2.2.). Der Vergleich mit der entsprechenden Deletionsvariante $\Delta 8\text{bp}$ zeigt zunächst keine signifikanten Unterschiede zur Suppression des Wildtyps (wt).

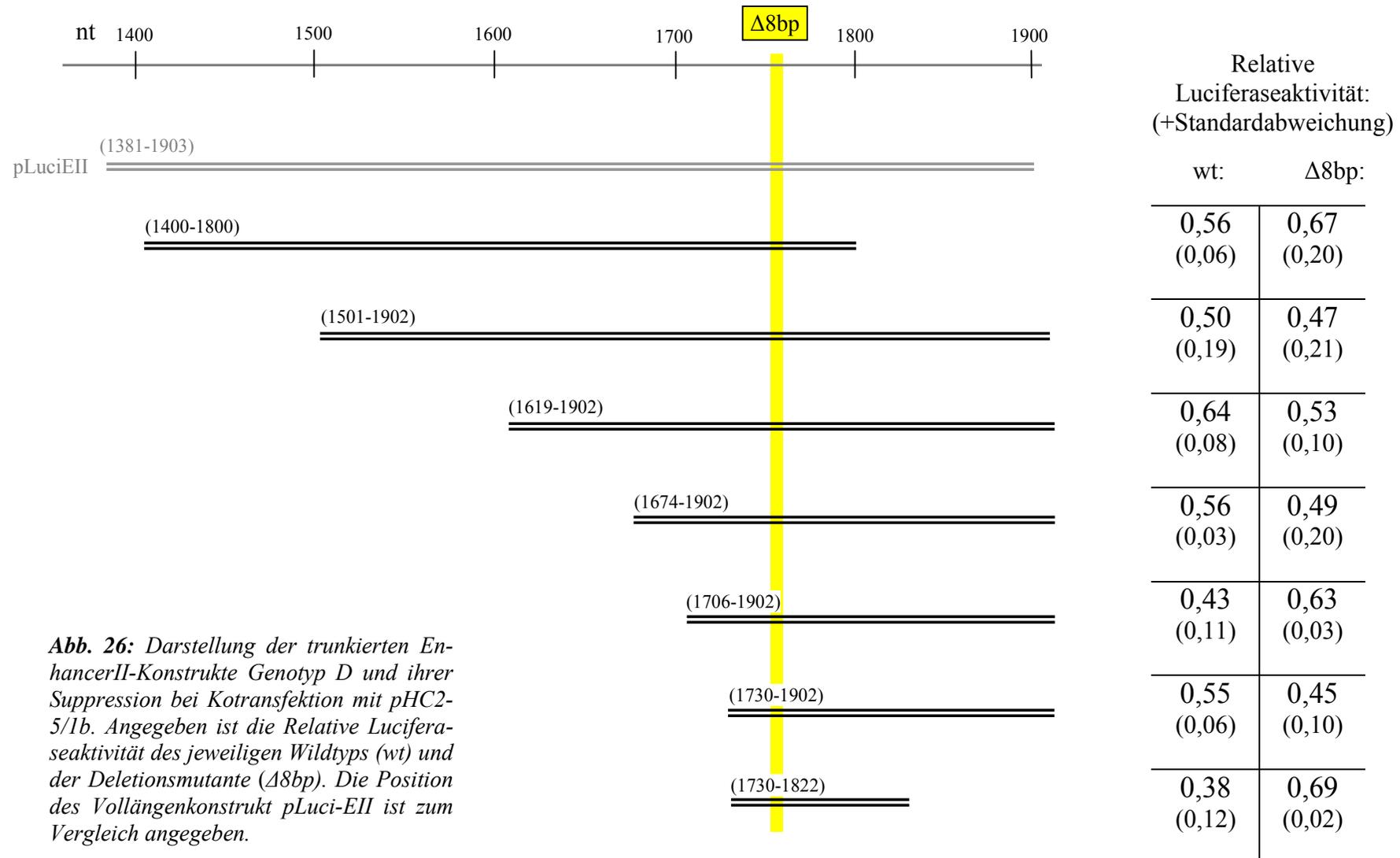


Abb. 26: Darstellung der trunkierten EnhancerII-Konstrukte Genotyp D und ihrer Suppression bei Kotransfektion mit pHC2-5/1b. Angegeben ist die Relative Luciferaseaktivität des jeweiligen Wildtyps (wt) und der Deletionsmutante ($\Delta 8bp$). Die Position des Vollängenkonstrukt pLuci-EII ist zum Vergleich angegeben.

Erst das kleinste Konstrukt, das nur noch den basic-core-Promotor (B3) des Enhancer II von nt 1730-1822 umfaßt, zeigt erstens eine klar signifikante Suppression des Wildtyps wie auch zweitens eine deutlich unterschiedliche Suppression der entsprechenden Deletionsmutante pL-EII(1730-1822)d8bp.

Von diesem Bereich wurde auch jenes Enhancer-II-Plasmid mitgeführt, das abgeleitet von der Wildtyp-Sequenz zusätzlich die in Abschnitt 1.1.2. erwähnte kombinierte Punktmutation 1762(A/T); 1764(G/A) im Bereich des basic-Core-Promotors aufweist {pL-EII(1730-1822)T/A}. In *Abb. 27* ist der direkte Vergleich der Aktivität zwischen der Wildtypsequenz und den beiden Mutanten gezeigt. Bereits die Mutation T/A genügt, um die Supprimierbarkeit des Wildtyps vollständig aufzuheben, die $\Delta 8$ bp-Deletions-Variante besaß ebenfalls keine signifikante Supprimierbarkeit mehr.

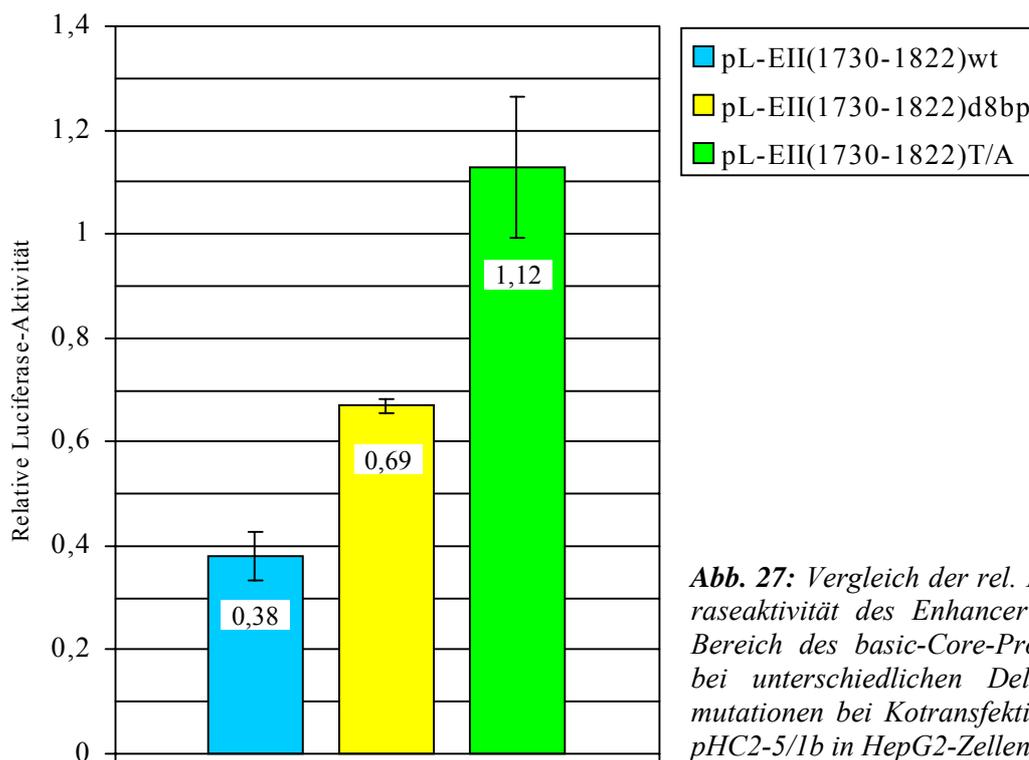


Abb. 27: Vergleich der rel. Luciferaseaktivität des Enhancer II im Bereich des basic-Core-Promotor bei unterschiedlichen Deletionsmutationen bei Kotransfektion mit pHC2-5/1b in HepG2-Zellen.

4.6 Variabilität der intrazellulären HCV-mRNA-Population

Eine intrazellulär vorhandene divergierende HCV-mRNA-Population könnte bei chronischen Infektionen eine Rolle bei der Suppression der HBV-Replikation spielen; insbesondere würde das Vorkommen von Stop-Mutationen im Bereich des Core zu kerngängigeren, verkürzten Produkten und einem Überschuß an Core-Protein führen, da die Translation beständig wieder am ATG des Cores beginnen würde, ohne weiteres Polyprotein zu generieren. Ein Einfluß auf die Suppression der HBV-Enhancer wäre denkbar, wenn sich stärker suppressionsaktive Varianten bedingt durch die höhere Mutationsrate und die fehlende Korrekturfunktion bei der HCV-Replikation fänden.

Um dies zu untersuchen, wurde intraoperativ gewonnenes Lebergewebe eines chronisch HCV-infizierten Patienten (Genotyp 3a) mit HCV-assoziiertem Leberzellkarzinom (jeweils getrennt in Tumor- und Nicht-Tumorgewebe) einer Extraktion der Gesamt-RNA unterzogen (GLEBE D, Diplomarbeit 1994). Das Resektat entstammte der Universitätsklinik Abt. Allgemein- und Thoraxchirurgie (Prof. Dr. K. Schwemmler) in Gießen.

Zur Einklonierung wurde der HCV-Core-Genomabschnitt mit den Klonierungs-Primern HC5-3a-XbaI und HC2-3a-EcoRI als Vollängen-Insert in der oben beschriebenen Weise mit Pfu-Polymerase amplifiziert, über die Restriktionsschnittstellen in pcDNA3-Basisvektoren einkloniert und in *E. coli* XL1Blue transformiert. 8 Tumor- und 12 Nicht-Tumorklone wurden selektioniert und vermehrt, schließlich die Plasmide wieder extrahiert und mit T7- und sp6-Primern in beide Leserichtungen sequenziert.

4.6.1. HCV-Core-Variabilität in chronisch infiziertem Lebergewebe

Der Vergleich der HCV-Core-Sequenzen aus dem nicht karzinomatös veränderten Lebergewebe (*Abb. 28*) mit dem Gesamt-Konsensus aller isolierten Klone zeigt gehäuft Basenaustausche innerhalb der ersten 35 Basen des 5'-Bereiches. Insgesamt ergibt sich eine Mutationsrate von 1,09 % im Bereich des gesamten Core auf RNA-Ebene. Bei Betrachtung der abgeleiteten Proteinsequenz (*Abb. 30*) ergibt sich eine Mutationsrate von 1,18 % für das Core-Protein.

Abb. 30: Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen der HCV-Core-Klone aus Nicht-Tumor (n1-12) und Tumor (t1-8). Die Abweichung von der Konsensussequenz ist angezeigt.

Kon	.MSTNPKPQRKTKRNTTRRPQDVKFFGGQIVGGVVI.PRRGPRLVGRATRKTSERSQPRRRQFIPKARRSEGRSQAQPGYPWPLYGNEGCGWAGWLLSP
n1Q.....
n2Q.....E.....L.....F.....
n3
n4
n5	..R..L..L.....
n6P.....
n7	..L.....I.....K..F.....
n8	..MI.....Y.....
n9Q.....
n10E.....
n11E.....
n12E.....
t1
t2V.....
t3
t4L......KW...P.....
t5L.....
t6L.....P.....
t7I.....
t8Q.....
Kon	RGSRPSWGNDRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGAPVGGVARALAHGVRALEDGINFATGNLPGCSFSIFLLALFSLIHPAAS
n1
n2
n3A.....
n4
n5A.....
n6
n7R.....
n8R.....
n9R.....
n10
n11I.....
n12I.....
t1F.....
t2
t3
t4V.....
t5
t6T.....
t7A.....T.....
t8

4.6.2. HCV-Core-Variabilität in HCV-assoziiertem Leberzellkarzinom

Abb. 29 zeigt den Vergleich der Sequenzen der isolierten HCV-Core-Klone aus dem Tumorgewebe des chronisch infizierten Patienten. Die Mutationsrate liegt hier auf der Ebene der RNA wie auch der des Proteins bei 0,98 %. Stop-Mutationen finden sich auch bei diesen Klonen nicht.

Im Ergebnis finden sich bei keinem Klon des HCV-Core-Proteins aus dem gewonnenen Resektat Stopmutationen. Die Mutationsraten liegen im unteren Bereich der üblichen Basen-Austauschrate innerhalb des gleichen Genotyps wie sie in der Literatur zu finden ist (SIMMONDS P et al., 1993).

4.7 Konservierung der HCV-Core-Sequenz bei klinischer Übertragung

Bezüglich der Konservierung des HCV-Core-Gens konnte ein Fall dokumentiert werden, bei dem die Sequenzanalyse zugleich als Instrument des Nachweises einer Infektionskette dienen konnte.

Im Juni 1998 fiel eine Blutspende (x+1) eines 26jährigen Spenders auf, die alle Zeichen einer akuten HCV-Infektion trug: antiHCV-positiv (Abbott), HCV-RT-PCR-positiv (Amplicor 100, Hofmann-LaRoche), Glutamatpyruvat-Transferase im Serum (sGPT) 410 IU/l. Die vorherige Spende vom April des gleichen Jahres war anti-HCV-negativ, HCV-RT-PCR negativ bei einer sGPT von 14 IU/l.

Aus dieser negativen Spende wurde ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt, das einer Patientin mit Chronisch-Myeloischer Leukämie unter Chemotherapie transfundiert wurde. Im Look-back-Verfahren zeigte die Empfängerin im August 1998 eine sGPT von 914 IU/l und war HCV-RT-PCR-positiv; antiHCV-Ak konnten bis zu ihrem Tod im November 1998 nicht nachgewiesen werden

Festzustellen war, ob ein Infektionszusammenhang zwischen Spender und Empfänger wirklich bestand, da die betreffende Blutspende auch in einer wiederholten PCR-Nachtestung negativ war. Gleichzeitig war zu prüfen, ob betreffende HCV-Core-Abschnitte hinreichend sind, um einen solchen Nachweis zu führen, da das Virus sich in einer immunsuprimierten Patientin replizierte.

Zur Bestimmung der Sequenzen wurde vom Empfängerserum (E) und dem späteren HCV-positiven Spenderserum (S, x+1) eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden je 50 µl Serum nach der GTC-Methode extrahiert, mit Hexanukleotiden revers transkribiert (s. Abschnitt 3.2. und 3.3) und 5 µl von 20 µl RT-Extrakt einer PCR unterzogen. Für die Core-PCR wurden die Primer Core-1s und Core-1as für die erste Runde der nested-PCR, die Primer Core-2s und Core-2as für die zweite Runde verwendet (nach OHNO O et al., 1997). Aus der ersten Runde wurden 5 µl in die zweite Runde eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren hierbei:

- | | | |
|------|--------------|--|
| 1. | 94°C, 3 Min. | |
| 2.1. | 94°C, 1 Min. | } 35 Zyklen, 1. Runde
25 Zyklen, 2. Runde |
| 2.2. | 56°C, 1 Min. | |
| 2.3. | 72°C, 1 Min. | |
| 3. | 72°C, 3 Min. | |

Zusätzlich wurde die Hypervariable Region 1 des E2 mit den Primern HVR-sA und HVR-asB für die erste Runde einer nested-PCR, und den Primern HVR-sC und HVR-asD für die zweite Runde, amplifiziert (nach BOOTH JC et al., 1998). Als Nachweis der HCV-Positivität wurde die sehr empfindliche PCR im 5'-NCR-Bereich mit den Primern NCR-sA, NCR-asB, bzw. NCR-sC und NCR-asD durchgeführt. Bei der Extraktion und PCR wurde als Kontrolle bei allen Amplifikationen ein positives Serum (ref) und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Nach erfolgter Amplifikation erfolgte die Sequenzierung in beide Leserichtungen und ein Sequenzabgleich (s. *Abb. 32 a und b*).

Dieser zeigt Sequenzidentität im Bereich des amplifizierten Core- und HVR-Abschnittes zwischen Spender und Empfänger. Damit ist unter Berücksichtigung der sonst hohen Mutabilität, besonders im Bereich der HVR I, ein Infektionszusammenhang anzunehmen.

Fraglich blieb, warum die übertragende Spende HCV-RNA-negativ ist, obwohl eine Übertragung stattgefunden hat. Dies wäre denkbar, wenn zum einen Inhibitoren im Serum des Patienten eine RT-PCR erschweren oder der infektiöse Titer weit unterhalb der Sensitivität der üblichen Testverfahren läge.

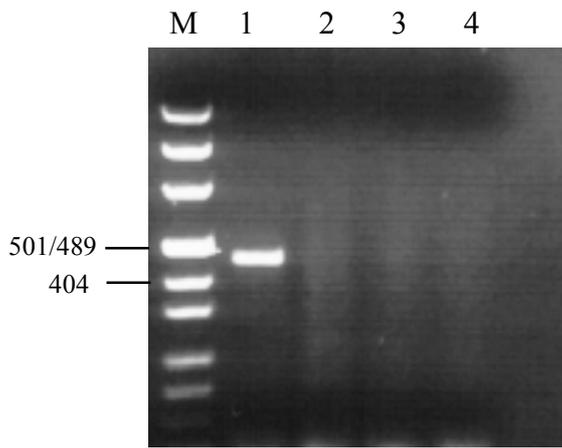


Abb.31 a-d: Agarosegele der PCR-Produkte aus Empfänger und Spender. Marker (pUC-Mix) in bp angegeben.

Abb.31 a: 1. PCR Core:
(Amplifikat 441 bp)
1: Positivkontrolle ref.
2: Empfängerserum
3: Spenderserum (x+1)
4: Negativkontrolle

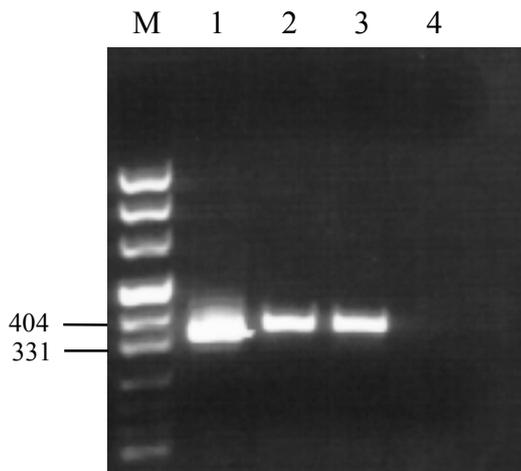


Abb.31 b: 2. PCR Core:
(Amplifikat 355 bp)
1: Positivkontrolle ref.
2: Empfängerserum
3: Spenderserum (x+1)
4: Negativkontrolle

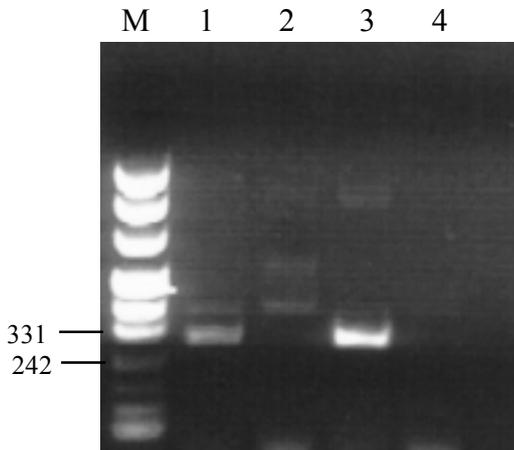


Abb.31 c: 1. PCR NCR:
(Amplifikat 287 bp)
1: Empfängerserum
2: Negativkontrolle
3: Positivkontrolle ref
4: Spenderserum (x+1)

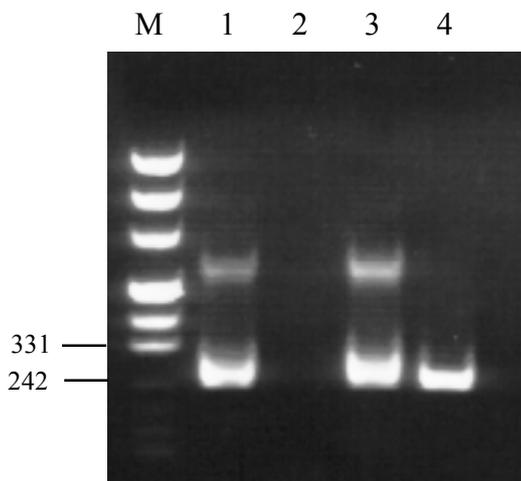


Abb.31 d: 2. PCR NCR:
(Amplifikat 240 bp)
1: Empfängerserum
2: Negativkontrolle
3: Positivkontrolle ref
4: Spenderserum (x+1)

Abb. 32: Sequenzvergleich der Isolate und einer Referenzsequenz [D166989].

A: Core, B: HVR 1

A

	nt 21	
Spender	TCAAAGAAAGACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGG	
Empfänger	-----	
[D166989]	-----A-----	
ref	-----A-----T-----	
	nt 81	
Spender	CGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGGGGCCCCAGGTTGGGTGTGCG	
Empfänger	-----	
[D166989]	T-----	
ref	T-----	
	nt 141	
Spender	CGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGTGGAAGGCGACAACCTATCCCCAA	
Empfänger	-----	
[D166989]	-----G-----	
ref	-----	
	nt 201	
Spender	GGCTCGCCATCCCGAGGGCAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGG	
Empfänger	-----	
[D166989]	-----A-----	
ref	-----G-----T---A-----C---	
	nt 261	
Spender	CAACGAAGGCATGGGGTGGGGCGGGATGGCTCCTGTCAACCCCGTGGCTCCCGGCC	
Empfänger	-----	
[D166989]	---T--G-----A-----C-----T-----	
ref	---T--G-----A-----T-----	

B

	nt 1273	
Spender	ACTGCCTTGAAGTCAATGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTGCCGCACTGTTCTACGCC	
Empfänger	-----	
[D11168]	-----C-----A-----A-C--C-----T-----A	
ref	--G-----T---CGAG---G-G--T--C-GGG-A--G-GG--C-----TTA-	
Spender	AGAAATTTCAACTCGACCGGGTGCACAGAGCGTATGGCCAGTTGCCGCTCTATTGACAAG	
Empfänger	-----	
[D11168]	CAC--G-----T---A--C-----C-----C--A--C--C-----	
ref	CAC--A-----TT-A--C--C-T--A-G-----C--TA-AC-CC--C-G-T	
Spender	TTTGATCAGGGGTGGGGGCCCATCACTTACACCGG	
Empfänger	-----	
[D11168]	--C-C-----A-----C-----C-T-----A	
ref	--CA-C-----C-----C--T---GC---G--AA	

Um die Sensitivität zu steigern, wurde eine nested-PCR im Bereich der 5'NCR durchgeführt, wobei einmal 100 µl Serum nach der GTC-Methode extrahiert wurden, und einmal 2 ml Serum einer automatischen Extraktion (Nuclisense Serum-Extraktor, Organon Teknika Corp., Durham USA) unterzogen wurden.

Die nested-PCR wurde mit den Primern NCR-sA und NCR-asB für die erste Runde sowie NCR-sC und NCR-asD für die zweite Runde durchgeführt (nach CH. JURSCH, Doktorarbeit 2000). Die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie bei der Amplifikation des Cores.

In beiden Fällen gelang eine Amplifikation aus dem übertragenden Spenderserum nicht, obwohl im Falle der Extraktion von 2 ml Serum eine 40fache Anreicherung vorlag. Dies entspräche einer Empfindlichkeit von 12 HCV-Genomen/ml (Standardisierung nach EUROHEP HCV-RNA reference panel, DAMEN M et al., 1996)

Um schließlich eine weitere Anreicherung zu erreichen, wurde eine Ultrazentrifugation aus 6 ml Serum durchgeführt. Um mögliche Inhibitoren nachzuweisen und um die Effizienz der Zentrifugation und Extraktion zu beurteilen, wurden weitere 6 ml Serum mit 100 µl eines Zellkulturüberstandes des Bovinen Virus Diarrhoe Virus (BVDV), Stamm Osloss mit einer TCID₅₀ von 10^{5,7} / ml versehen (freundlicherweise von Dr. König, Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin Gießen zur Verfügung gestellt). Das BVDV besitzt als Pestivirus (Flaviviridae) vergleichbare physikochemische Eigenschaften wie das HCV, und ist daher als Testvirus am besten geeignet.

Das Spenderserum wurde mit 3 ml PBS verdünnt und auf 600 µl 60% Sucrose/PBS geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 36.000 U/Min. für 100 Min. bei 4°C in einem Contron TST 41-14-Rotor.

Anschließend wurden jeweils 500 µl direkt (Fraktion u) und oberhalb (Fraktion o) des Sucrosekissens entnommen, einer GTC-Extraktion, reversen Transkription und nested-PCR für den 5'-NCR-Bereich unterzogen. Zum Nachweis des BVDV wurde eine PCR nach DEMOERLOOZE et al., 1993 durchgeführt. Hierzu wurden die Abschnitte BVDV-nt. 158-177 (sense) und BVDV-nt. 348-363 (antisense) als Primer verwendet.

Abb. 33 zeigt das Ergebnis der PCR aus den ultrazentrifugierten Seren. Lediglich das mit BVDV versehene Serum zeigt in der BVDV-PCR eine Positivität (durch Pfeil markiert; erwartetes Amplifikat: 205 bp). Die HCV-PCR für die 5'-NCR blieb weiterhin negativ, ebenfalls die BVDV-PCR im Bereich oberhalb des Sucrosekissens, was für eine suffiziente Ultrazentrifugation spricht.

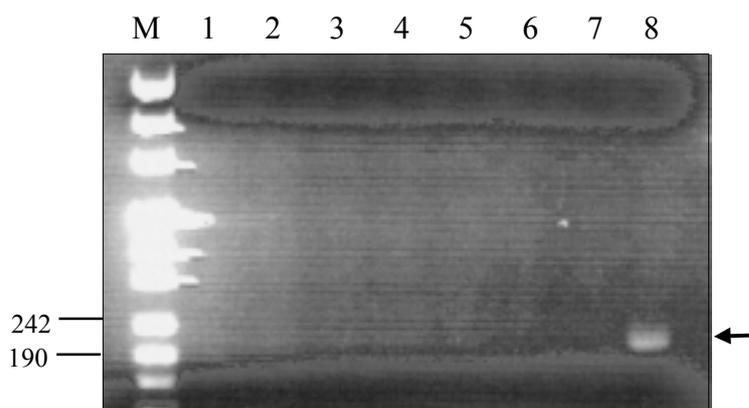


Abb. 33: PCR nach Ultrazentrifugation des Spenderserums mit und ohne BVDV. Spurbelegung tabellarisch aufgeführt.

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8
BVDV			+	+			+	+
Fraktion	obere	untere	obere	untere	obere	untere	obere	untere
PCR	HCV	HCV	HCV	HCV	BVDV	BVDV	BVDV	BVDV

Der Nachweis des BVDV im damit versehenen Spenderserum mittels RT-PCR spricht gegen das Vorhandensein von Inhibitoren der RT oder der PCR.

Die Ultrazentrifugation bedeutete hier eine 120fache Konzentrierung der HCV-Partikel was einer Empfindlichkeit der verwendeten PCR von 4 Genomen /ml mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% entspräche. Dies liegt weit unterhalb der Empfindlichkeit angewandter Testverfahren; damit ist eine Übertragung durch Blutprodukte in einem frühen Stadium der Infektion trotz Testung möglich (SCHÜTTLER CG et al., 2000).

Der Vergleich der Basensequenzen aus Spender und Empfänger im Bereich der amplifizierten Core- bzw HVR-Bereiche zeigt Sequenzidentität. Dies lässt sich mit einem nicht vorhandenen Selektionsdruck insbesondere auf die HVR durch das Immunsystem in Einklang bringen. Dieser ist beim Spender in einer frühen anti-HCV-negativen Phase der Infektion noch nicht vorhanden, beim Empfänger ist durch die immunsuppressive Therapie kein Selektionsdruck zu erwarten.

5 Diskussion

5.1 *trans*-Repression des HBV durch das HCV-Core Protein

Aus klinischen Studien wie auch aus Experimenten mit Schimpansen ist seit Anfang der 80er Jahre ein Suppressionseffekt des NANB-Agens bzw. des HCV auf die Replikation des HBV *in vivo* bekannt. Bisherige Erklärungen zielten auf Phänomene der klassischen viralen Interferenz ab, also z.B. der lokal erhöhten Produktion von Interferon und einer unterschiedlichen Suszeptibilität beider Viren gegenüber Interferon.

Die ersten und bislang einzigen Hinweise auf eine andere Kausalität bei diesem Suppressionsphänomen wurden durch die Arbeitsgruppe um SHIH CM et al., 1993 und 1995 bei *in vitro*-Experimenten erbracht. So konnte eine Suppression der HBV-Replikation durch Transfektion von HCV-E1/Core- und HCV-Core-Konstrukten in mit HBV-Dimeren stabil transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden.

Aus Untersuchungen von Leberbiopsien koinfizierter Patienten ist bekannt, daß nicht nur eine globale Suppression der HBV-Replikation erfolgt, sondern HBV-Antigene in abweichender relativer Menge vorkommen als bei HBV-Monoinfizierten (GUIDO M et al., 1999). Hierbei war die relative Menge an HBsAg unberührt, jene des HBcAg jedoch reduziert. Eine differentielle, aber anders gerichtete Suppression war auch bei den *in-vitro*-Untersuchungen von SHIH CM et al. 1993 vorhanden: Die Expression der 3,5 und 2,1 kb Transkripte des HBV und des HBsAg wurden 2-4fach supprimiert, das HBcAg und HBeAg nur etwa 1,5fach. Die Sekretion reifer HBV-Partikel zeigte sich 20fach reprimiert.

Ausgehend von diesen Befunden, wurde in dieser Arbeit eine Suppression der HBV-Enhancer I und II durch das HCV-Core-Protein postuliert, wobei eine isolierte Wirkung auf diese Regulationselemente untersucht werden sollte.

Zunächst konnten entsprechende Expressionsplasmide für das HCV-Core-Protein kloniert werden, für die durch Immunblot gezeigt werden konnte, daß diese in HepG2- und AML12-Zellen in der Lage sind, HCV-Core-Protein zu exprimieren.

Diese Core-Expressionsplasmide wurden mit einem Luciferase-Reporterplasmid kotransfiziert, dem der Bereich nt 1040 – 1372 des Enhancers I (HBV-Genotyp A)

vor den Luciferase-ORF einkloniert war. Es konnte dadurch gezeigt werden, daß das Core-Vollängenkonstrukt des Genotyps 1b (aa 1-191) die Aktivität des Enhancers I in HepG2- und AML12-Zellen etwa um den Faktor 10 reprimierte. Die verkürzten Konstrukte des Core-Proteins von aa 1-115 und aa 1-148 zeigten noch eine signifikante Repression um den Faktor 3.

Bei der Untersuchung der Wirkung des HCV-Core-Proteins auf den Enhancer II wurden in gleicher Weise die Core-Expressionsplasmide mit dem Reporterplasmid für den Bereich nt 1381 – 1903 (HBV-Genotyp A), der den Enhancer II/Core-Promotor umfaßt, kotransfiziert. Die Repression lag hier bei dem Vollängenkonstrukt aa 1-191 signifikant zwischen 3-4fach während die verkürzten Konstrukte keine signifikante Repression mehr zeigten.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, daß das HCV-Core-Protein in der Lage ist, in beiden verwendeten Zelllinien die Enhancer des HBV signifikant zu reprimieren, wobei die Wirkung auf den EnhI um den Faktor 2 höher lag als bei EnhII. Eine C-terminale Verkürzung des Core-Proteins um die möglichen helikalen Domänen (aa 1-148) oder um den gesamten hydrophoben C-Terminus (aa 1-115) zeigte bezüglich des EnhI eine Minderung der Repressionsaktivität um den Faktor 3, während bei EnhII keine Repression mehr nachweisbar war.

Damit ist eine differentielle Wirkung des Core-Proteins auf die HBV-Enhancer gezeigt, wobei die Repressionsaktivität auf den EnhI in jenem Bereich liegt, den SHIH CM et al., 1993 bezüglich der Wirkung auf das HBV-Gesamtgenom beschreiben konnten. Man könnte vermuten, daß die Repression des EnhI die führende ist, dies aber unter der Bedingung, daß die Aktivität der beiden Enhancer auf die Replikation *in vivo* vergleichbar sein müßte, was durch die synergistischen Effekte untereinander nicht zweifelsfrei zu erkennen ist (SU H et al., 1992).

Die spezifische Suppression von Enhancern eines DNA-Virus durch Proteine eines zytosolisch replizierenden RNA-Virus konnte somit erstmals gezeigt werden.

Lediglich bei Koinfektion unter DNA-Viren ist eine Beeinflussung viraler Promotoren durch fremde virale Proteine bekannt. So ist beispielsweise das Rep68-Protein des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (AAV2) in der Lage, den MIE-(major

immediate early)-Promotor des humanen Cytomegalievirus zu transaktivieren (WONDERLING RS et al., 1997).

Auf der anderen Seite sind verschiedene Mechanismen von RNA-Viren beschrieben, um bei einer Monoinfektion die zelluläre Expressionsregulation zu beeinflussen. Diese expliziten Pathogenitätsmechanismen sind beispielsweise die Inhibition der zellulären RNA-Synthese durch kurze virale RNA-Fragmente, der sog. Leader-RNA beim Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (GRINELL BW & WAGNER RR, 1983), die Degradation zellulärer mRNA durch virale Proteine beim Influenzavirus (INGLIS SC, 1982) oder die Inhibition der 5'-Cap-abhängigen zellulären Translation durch Inaktivierung des Cap-bindenden Protein-Komplexes bei einer Poliovirus-Infektion (ETCHINSON D ET AL., 1982).

Diese Mechanismen von RNA-Viren zeigen jedoch keine Interaktion mit zellulären Enhancer- oder Promotor-Strukturen. Lediglich beim Nucleocapsid-Protein (!) des Virus der klassischen Schweinepest (CSF, Classical Swine Fever Virus) ist eine transaktivierende Wirkung auf den Promotor des Humanen Hitzeschockproteins 70 und eine Repression des SV40-Early-Promotor gezeigt worden (LIU JJ et al., 1998).

5.2 Einfluß von Core-Variabilität und HCV-Genotypen

Die unterschiedliche biologische Aktivität der HCV-Genotypen bezüglich Therapiemöglichkeiten wie auch dem Verhalten bei einer HBV/HCV-Koinfektion, wurde bereits erwähnt (Abschnitt 1.2.2 und 1.3.2). Um dies an dem etablierten Koinfektionsmodell zu untersuchen, wurden zunächst Core-Vollängenkonstrukte (aa 1-191) der Genotypen 1b, 1a und 3a jeweils mit dem Gesamtenhancer Reporterplasmid des EnhI in AML12-Zellen kotransfiziert.

Die exprimierten Core-Plasmide der Genotypen 1a und 3a waren hierbei um den signifikanten Faktor 2 bezüglich des EnhI weniger reprimierend als der Genotyp 1b. Würde man annehmen, daß dieser Unterschied durch eine unterschiedliche posttranslationale Prozessierung der Core-Proteine verschiedener Genotypen bedingt sein könnte, so dürfte dieser Effekt beim Vergleich der verkürzten Konstrukte nicht mehr auftreten. Es zeigte sich jedoch, daß die unterschiedliche Repressionsaktivität der Genotypen um den Faktor 2 auch bei den Konstrukten für die Core-Bereiche aa 1-148 und aa 1-115 erhalten blieb.

Die den Genotypen 1a und 3a gemeinsame Abweichung von der Sequenz des Genotyps 1b ist an aa-Pos. 50 der Austausch eines Prolins gegen Threonin und an aa-Pos. 91 ein Leucin gegen Cystein (s. *Abb 13*). Die Gründe für die unterschiedliche Repressionsaktivität durch diese Aminosäurenaustausche sind aus den experimentellen Daten nicht ableitbar. Es läßt sich aber möglicherweise annehmen, daß namentlich der Austausch an aa-Pos. 50 durch das Einfügen eines Threonins anstatt des Prolins die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen erleichtert wird, was einen Einfluß auf die Protein-Konformation wie auch auf die Interaktion mit anderen Proteinen zur Folge haben könnte. Da bislang keine Daten über die HCV-Core-Sekundärstruktur, insbesondere die Ausbildung von Disulfan-Gruppen vorliegen, ist die Bedeutung des Cysteins an aa-Pos. 91 nicht zu beurteilen.

Eine differierende Wirkung der Core-Proteine verschiedener Genotypen auf die Aktivität des Enhancer II konnte nicht gezeigt werden. Auch bei Wiederholung des Experiments lagen die Werte unter Berücksichtigung der Standardabweichungen in keinem sicher zu beurteilenden unterschiedlichen Bereich. Ob dies der insgesamt geringeren Basisaktivität des EnhII-Reporterplasmids anzulasten ist, oder ob es sich hier abweichend von dem bei EnhI beschriebenen Effekt um einen anderen Suppressionsmechanismus handelt, ist nicht sicher zu beurteilen. Für letzteres spricht, daß bereits die um den hydrophoben C-Terminus mit seinen helikalen Abschnitten verkürzten Core-Konstrukte, keine Repressionsaktivität auf den EnhII mehr ausübten.

Ein Vergleich der vom Vollängenkonstrukt des Genotyp 1b abgeleiteten Mutante, bei der an aa-Pos. 9 ein Lysin durch Arginin (9R/K) ausgetauscht wurde, zeigt gegenüber dem Wildtyp eine 4fach schwächere Repressionsaktivität von etwa 2,5. Da bei dieser Variante keine Reifung des Core-p21 zu einem p19 stattfindet (LO SY et al., 1994) kann vermutet werden, daß diese wahrscheinlich primäre Reifung zu einer repressions-aktiveren Form des Core-Proteins führt. Die Beeinflussung der Phosphorylierung des Core-Proteins durch diese Mutation ist darüberhinaus ebenfalls in Betracht zu ziehen, da diese *in vitro* bei Insektenzellen zu einer maximalen Repression des HBV-Gesamtgenoms beiträgt (SHIH CM et al., 1995).

Daß die Repression des EnhI durch Wildtyp und 9R/K-Mutante im Zusammenhang mit einer zusätzlichen, und bei der Mutation erschwerten Reifung stehen könnte, zeigt auch der direkte Vergleich beider im Titrationsexperiment (*Abb. 23*). Der Wildtyp zeigt eine abgeflachte Sättigungskinetik von einer Repression des Faktors 2 bei 1000 ng Core-Plasmid bis zur maximalen Repression des Faktors 10 bei 4 ng, während die Mutante erst bei Unterschreitung von 62 ng transfiziertem Core-Plasmid eine signifikante Aktivität zeigt um sich dann der Repressioneigenschaft des Wildtyps fast vollständig anzugleichen.

Bei den Titrationsexperimenten mit EnhI-Reporterplasmid ist auffällig, daß sich beim Vergleich des Cores aa1-191 mit den verkürzten Konstrukten aa1-148 und aa1-115 das letztere kürzeste Konstrukt gegenläufig verhält: bei niedrigen Konzentrationen verliert es seine anfänglich geringe Repressionsfähigkeit im Gegensatz zu Core-aa1-148 vollständig. Somit erscheint die Wirkung des bis auf den hydrophilen, basischen N-Terminus verkürzte Core direkt konzentrationsabhängig zu sein. Dieses Ergebnis ist jedoch mit Vorbehalt zu interpretieren, da diese Titrationsexperimente einer durch die transiente Transfektion bedingten Störanfälligkeit unterliegen, und eine Aktivität mithin erst bei einer relativen Luciferase-Aktivität deutlich unter 0,5 anzunehmen ist.

Da die intrazelluläre RNA-Population des HCV in einer für RNA-Viren typischen Weise einer gewissen Bandbreite der Variabilität bis hin zur Entstehung von Quasispezies unterliegt, könnte eine Anreicherung von exprimiertem Core-Protein abweichender Länge (bedingt durch die Einfügung einer Stop-Mutation) vorkommen. Diese aberrativen Produkte könnten einen Einfluß auf die Repression der HBV-Enhancer *in vivo* haben.

Bei der Untersuchung einer solchen HCV-RNA-Population des Genotyps 3a aus Tumor- und Nicht-Tumorgewebe wurden keine derartigen Stop-Mutationen im untersuchten Core-Genom gefunden und die Mutationsraten lagen in einem zu erwartenden Bereich um 1 %, wie dies auch in der Literatur zu finden ist (HORIE C et al., 1996).

Die bei ähnlichen Untersuchungen bei einem Patienten mit HCV Genotyp 1a gefundenen Stop-Mutationen, die zu Core-Produkten von aa1-28 oder aa1-41 in

Tumorgewebe führen sollten und damit eine Karzinogenese durch Core-Protein begründet wurde (RÜSTER B et al., 1996), konnten nicht bestätigt werden. Diese Stop-Mutationen wurden ebenfalls bei der Untersuchung von 7 derartiger Fälle nicht gefunden (HORIE C et al., 1996).

5.3 Responsible Elemente und Bedeutung von Enhancer-Mutationen

Um den mit der Repression in Zusammenhang stehenden Bereich innerhalb der Enhancer einzugrenzen, wurden zunächst 5'-verkürzte Konstrukte des EnhI HBV-Genotyp A auf ihre Supprimierbarkeit durch das Wildtyp-Core-Protein aa1-191 und seiner Verkürzungen untersucht.

Im Vergleich zum Gesamt-EnhI-Konstrukt (nt 1040 – 1372) ergab die erste Verkürzung (nt 1114 – 1372) noch eine signifikante Suppression des Cores aa1-191 und aa1-148, während die Aktivität des weiter verkürzten Cores aa1-115 nicht mehr vorhanden war (*Abb. 25*). Eine weitere Verkürzung des EnhI (nt 1236 – 1372) zeigte für keines der Core-Proteine eine Repressionsaktivität.

Damit ist zu folgern, daß sich der für die Repressionsaktivität der Core-Proteine 1b aa1-191 und aa1-148 verantwortliche Bereich innerhalb der HBV-Position nt 1114 und 1236 befindet. Eine entsprechende Deletion schließt zwei Bindungsstellen für NF1 und eine für C/EBP aus.

Ein Phänomen ist hierbei interessant: das bis auf aa1-115 verkürzte Core-Protein verhält sich wiederum nicht gleichförmig zu den anderen Core-Proteinen, indem es bei keinem der verkürzten EnhI-Konstrukte eine Repressionsaktivität mehr zeigt. Dies ist in weiteres Argument für die These, daß dieses extrem basische Protein aa1-115 über einer anderen Stimulus die Repression des Gesamtenhancer I bewirkt als die nicht so weit trunkierten Core-Proteine.

Bei der Eingrenzung des verantwortlichen Bereiches im EnhII wurden die verkürzten EnhII-Reporterplasmide des HBV-Genotyps D mit dem Expressionsplasmid für den HCV-Wildtyp Genotyp 1b aa1-191 kotransfiziert.

Bis auf ein Konstrukt zeigten die verkürzten EnhII-Varianten eine nicht sicher zu beurteilende Repressionsaktivität jeweils in einer Grauzone zwischen einer rel. Luciferase-Aktivität von 0,43 (mögliche Repression) und 0,64 (keine sichere Re-

pression) ohne erkennbares Muster. Auch die entsprechenden $\Delta 8\text{bp}$ -Deletionsmutanten zeigten dieses Phänomen und unterschieden sich nur innerhalb der Standardabweichung von ihren Wildtyp-Korrelaten.

Lediglich das kürzeste EnhII-Konstrukt (nt 1730 – 1822) zeigte erstens eine sicher zu beurteilende Supprimierbarkeit von 2,5 und eine signifikante Abweichung von der Aktivität der entsprechenden $\Delta 8\text{bp}$ -Mutante, die keine Supprimierbarkeit mehr aufwies. Ergänzend für den Bereich nt 1730 – 1822 wurde die EnhII-Variante mit der kombinierten Punktmutation 1762(A/T); 1764(G/A) überprüft. Diese zwei Basenaustausche führten zu einem vollständigen Verlust der Supprimierbarkeit gegenüber dem Wildtyp

Dieser Kernbereich des EnhII von nt 1730 – 1822 umfaßt nur noch den „basic core promotor“ und die Bindungsstelle für das TBP (*Abb. 2*). Es wurden also 6 von ursprünglich 7 Bindungsstellen für leberspezifische Transkriptionsfaktoren (C/EBP, HNF3, HNF4) und eine Bindungsstelle für Sp1 (ursprünglich 7 Bindungsstellen für ubiquitäre TF) entfernt, was die Gewichtung von ubiquitären zu leberspezifischen TF dramatisch in Richtung eines Überwiegens der ubiquitären TF verschiebt. Die nicht mehr klar signifikante Repression bei den längeren Konstrukten ist wohl auf eine Kompensation einer vorhandenen Repression durch die alternativ noch zugänglichen TF-Bindungsstellen außerhalb des basic-core-Promotors zu erklären.

Die verschwundene Repressionsfähigkeit durch Verlust der zweiten Hälfte der COUP-TF1-Bindestelle von nt 1763 – 1770 bei der Deletionsvariante wie auch die Veränderung dieser palindromischen Bindesequenz durch die kombinierte Punktmutation 1762/1764 zeigt, daß dem TF-Bindebereich nt 1756 – 1770 eine entscheidende Bedeutung bei der Suppression durch das Core-Protein zukommt. Somit konnte die Wirkung des HCV-Core-Proteins auf den HBV-EnhII auf diese wichtige Bindungsstelle eingegrenzt werden.

Offenbar spielt das Negativ-regulatorische Element (NRE) des HBV keine Rolle bei diesem Suppressionsphänomen der Enhancer, da es in keinem der verwendeten Konstrukte vorhanden war und trotzdem der Suppressionseffekt nachgewiesen werden konnte.

Ein für die cytoplasmatische Lokalisation der ungespleißten HBV-Transcripte verantwortlicher Bereich von nt 1151 – 1684, das sogenannte Post-transkriptionelle regulatorische Element (PRE) (HUANG J & LIANG TJ, 1993) könnte für eine Supprimierbarkeit durch das HCV-Core-Protein verantwortlich sein. Dies könnte durch direkte Blockierung der RNA-Sekundärstruktur des PRE durch das HCV-Core-Protein oder einer Interaktion mit dem PRE-bindenden Protein erfolgen.

Für die Funktion des PRE ist das Vorhandensein von zwei RNA-Schleifen, SL α (nt. 1278 – 1340) und SL β 1 (nt. 1388 – 1457) essentiell und die Sekundärstruktur der SL α ist innerhalb des Genus Orthohepadnavirus (HBV, GSHV, WHV, ASHV) hoch konserviert (SMITH GJ et al., 1998; DONELLO JE et al., 1996).

Das in dieser Arbeit verwendete EnhI-Konstrukt (nt. 1040 – 1372) würde lediglich die SL α umfassen. Da aber der für die Suppression durch HCV-Core-Protein responsible Bereich von nt. 1114 – 1236 eingegrenzt werden konnte, und damit keine RNA-Schleife mit normaler Funktion vorhanden war, ist eine Bedeutung der PRE für diesen Effekt auszuschließen.

Das EnhII-Konstrukt umfaßt keinen der PRE-essentiellen Bereiche vollständig; zusätzlich wäre der Verlust der Supprimierbarkeit durch die A/T-Mutation 1762/1764 oder die Δ 8bp-Deletion nt. 1763 – 1770, die beide außerhalb des PRE liegen, durch einen PRE-abhängigen Effekt nicht erklärbar.

Das PRE des HBV steht also in keinem Zusammenhang mit den aufgezeigten Suppressionsphänomenen.

Im Bereich nt 1756 – 1770 des EnhII/Cp befinden sich vorwiegend Bindestellen für TF der Kernrezeptorfamilie (auch Steroid-Thyroid Hormonrezeptorfamilie genannt), die einer komplexen Regulation unterliegen und ebenfalls aktivierende wie auch reprimierende Eigenschaften auf Regulationselemente ausüben können (GRONEMEYER H & MORAS D, 1995; MANGELSDORF DJ et al., 1995). Die Mitglieder dieser Kernrezeptorfamilie können untereinander heterodimerisieren und führen so zu einer von einander abhängigen, komplexen Regulation.

Das Core-Protein könnte also durch Interaktion mit diesen TF bereits eine Inhibition induzieren ohne direkt mit der DNA zu interagieren. Auf diesen Aspekt der möglichen Interaktion wird in Abschnitt 5.4 näher eingegangen.

Betrachtet man diese Befunde bezüglich der Eingrenzung der verantwortlichen Elemente unter Berücksichtigung, daß *in vitro* eine Repression des dimerisierten HBV-Gesamtgenoms durch HCV-Core-Protein in Insektenzellen gezeigt werden konnte (s.o.), in denen keine leberspezifischen Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, so erscheint eine Fokussierung auf die ubiquitären Transkriptionsfaktoren gerechtfertigt. Zumindest spielen diese Bindungsstellen in der komplexen Interaktion der TF untereinander bei der Repressionsaktivität des HCV-Core-Proteins eine dominierende Rolle. Zu beachten ist hierbei, daß die Wirkung von Transkriptionsfaktoren auch an die direkte Interaktion mit anderen TF durch die Bildung von Heterodimeren gebunden sein kann. So ist für die leberspezifischen Faktoren der C/EBP-Familie eine Interaktion mit dem ubiquitären TF Sp1 gezeigt worden (LOPEZ-RODRIGUEZ C, 1997), die durch Bindung an AP-1 eine transaktivierende Wirkung entfalten könnten.

Die Entscheidung also, welche Transkriptionsfaktoren letztendlich mit dieser interviralen Repression in Zusammenhang stehen, kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht entschieden werden, allenfalls können im Ausschlußverfahren Eingrenzungen und Hinweise für eine weitere fokussierte Untersuchung dargelegt werden.

5.4 Struktur motive des Core-Proteins und Repressionsmechanismen

Über die Sekundärstruktur des HCV-Core-Proteins liegen bislang keine definitiven Erkenntnisse vor, ebenso nicht über mögliche Konformationsalternativen und ihre biologische Aktivität. So lange keine Daten durch Röntgenstrukturanalysen einen Einblick in diese Konformation erlauben, sind wir bei der Untersuchung von Wirkmechanismen des Core-Proteins auf die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenz und der darin enthaltenen Struktur motive angewiesen. Im folgenden soll eine solche Analyse im Hinblick auf den beschriebenen Repressionseffekt erfolgen.

Bei der Betrachtung der Core-Sequenz wurde bereits die Aufteilung in zwei Hauptdomänen bezüglich der Ladungsverteilung und der Hydrophibizität besprochen (Abschnitt 1.2.3, *Abb. 5*). Insgesamt erscheint das Core-Protein als besonders basisch mit einem berechneten isoelektrischen Punkt bei pH 11,6. Der basische

Anteil ist auf den N-Terminus konzentriert, dem damit eine Bindung an Nukleinsäuren ermöglicht wird. Mögliche helikale und hydrophobe Abschnitte innerhalb der C-terminalen Domäne vermitteln wahrscheinlich eine Assoziation an Membranen, wie dies für die Lokalisation am ER gezeigt werden konnte (RAVAGGI A et al., 1994).

Diese Assoziation des Core-Proteins am ER, die analog zu den anderen Flaviviridae zum Virusassembly beiträgt, könnte zur Induktion eines sog. ER-Overload-Response führen. Diese durch die Anhäufung ungefalteter Proteine oder Überexpression sekretorischer Proteine induzierte Streßreaktion des ER, kann über einen noch nicht näher charakterisierten Weg über Ca^{2+} -Freisetzung und reaktiver oxygenierter Intermediate eine Aktivierung von NF κ B bewirken und damit eine Veränderung der Transkription im Nukleus in Gang setzen (PAHL HL & BÄUERLE PA, 1995 und 1997).

Ein vom Core-Protein induzierter ER-Overload könnte damit zu einer globalen Repression zellulärer Regulationselemente führen.

Ein solcher Repressionsmechanismus wäre für das, bis auf die basische Domäne trunkierte Core-Protein aa1-115 zu diskutieren, da es einen reprimierenden Effekt ausschließlich bei Überexpression entfaltet, in den Titrationsexperimenten bei hoher Verdünnung seine Aktivität jedoch verlor (s.o.). Die Repressionsaktivität der längeren Core-Produkte, insbesondere des aa1-191 können durch einen ER-Overload nicht erklärt werden, da sie eine maximale Repression gerade nicht bei einer Überexpression entfalten und eine sehr differentielle Wirkung auf die Enhancer-Varianten ausüben, was einem globalen Effekt auf alle Regulationselemente widerspricht.

Die zweite Möglichkeit, um die Transkriptionregulation zu beeinflussen wäre ein Eingreifen in den Signalweg der Apoptose. Zu dieser möglichen Wirkung des HCV-Core-Proteins im Zusammenhang mit der Zelltransformation gibt es widersprüchliche Publikationen (MARUSAWA H et al., 1999; DUMOULIN FL et al., 1999). Ein transformierender Effekt des Core-Proteins mit kooperierenden Onkogenen in primären Rattenembryofibroblasten konnte auch in unserem Labor nicht bestätigt werden (R. SCHUSTER, 1999 unveröffentlichte Daten).

Auch eine Interaktion des HCV-Core-Proteins mit proapoptotischen Faktoren wie beispielsweise den Interferon-induzierten Gene über den Jak-STAT-Signalweg wäre spekulativ (HEIM H, 2000; DARNELL JE, 1997), aber aufgrund der ungenügenden Daten nicht völlig auszuschließen. Eine Bedeutung der STAT's (Signal transducers and activators of transcription) für das HBV konnte nicht zweifelsfrei gezeigt werden (LEE YH & YUN Y, 1998). STAT's besitzen darüberhinaus kein bZIP-Motiv (s.u.).

Eine dritte Möglichkeit wäre die Inhibition von zellulären Kinasen durch das Core-Protein, die zu einer mangelhaften Phosphorylierung und damit fehlenden Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen könnte. Abgesehen von der Herleitung einer gesteigerten Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) durch eine noch zu diskutierende Repression des p21-Promotors (RAY BR et al., 1998), ist bislang lediglich eine Aktivierung der Raf-1-Kinase durch Interaktion des Core-Proteins mit einem 14-3-3-Protein gezeigt (AOKI H et al., 2000). Der Bereich aa25-91 des Core-Proteins konnte für eine Bindung an das Heterogene Nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP-K) kartiert werden, die eine fehlende Suppression des Thymidinkinase-Promotors durch hnRNP-K zur Folge haben sollte (HSIEH TY et al., 1998). Dies würde jedoch nur eine Erklärung für die HBV-Enhancer-Repression des nukleär lokalisierten Core-Protein aa1-115 bieten. Die experimentellen Daten reichen jedoch zur klaren Beurteilung einer Wirkung des Core-Proteins auf Kinasen nicht aus.

Es bleiben also zwei wichtige Mechanismen der Repression durch das Core-Protein zu prüfen: die direkte repressorische Wirkung des Core-Proteins durch eine Transkriptionsfaktoren-ähnliche Bindung an die DNA bzw. eine durch die Bindung bedingte Verdrängung von Transkriptionsfaktoren, und zweitens die direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren durch Bildung von inaktiven Heterodimeren bei Aktivatoren oder aktiven Heterodimeren bei Repressoren.

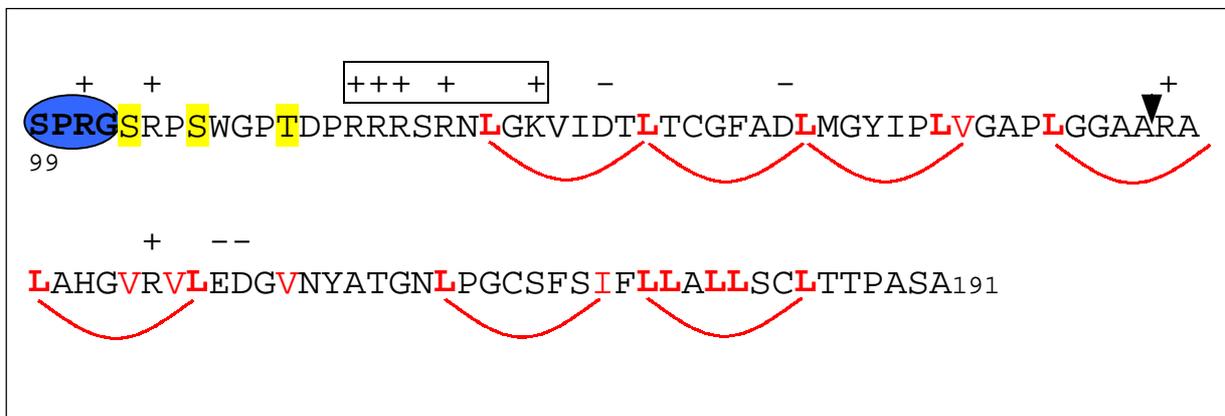
Zwischen beiden Hypothesen kann durch die vorliegenden Daten nicht entschieden werden; beide verlangen jedoch spezifische Struktur motive, zur DNA-Bindung und/oder zur Heterodimerisierung, die im folgenden diskutiert werden sollen.

In der Literatur wurde bislang nur ungenügend auf ein wichtiges Strukturelement des HCV-Core-Proteins hingewiesen, das in vielen Proteinen zur Dimerisierung beiträgt und ein wesentliches Element einiger Transkriptionsfaktoren darstellt: das basische Leucin-Zipper Motiv (bZIP).

Dieses Motiv fordert das Vorhandensein mehrerer Leucin-Reste im Abstand von jeweils ungefähr 7 Aminosäuren, die dadurch innerhalb eines α -helikalen Bereiches nebeneinander zu liegen kommen. Zusätzlich ist vor den Leucinen ein Bereich mit basischen Aminosäuren erforderlich, der eine Bindung an Nukleinsäuren vermitteln kann. In den bZIP-Motiven der TF findet sich noch stromaufwärts ein DNA-Bindemotiv.

Alle diese Eigenschaften sind beim HCV-Core-Protein vorhanden wie in *Abb. 34* gezeigt. Das verkürzte Core-Protein aa1-148 würde noch einen kurzen Leucin-Zipper beinhalten.

Abb.34. Mögliches bZIP-Motiv des HCV-Core Proteins (Sequenz: [M58335], Genotyp 1b)
Die Ladungsverteilung ist angegeben. Blau: DNA-Bindemotiv. Gelb: mögliche Phosphorylierungsstellen. Rot: Hydrophobe Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, rote Bögen: Abstände von 7 aa. Die Trunkierungsstelle an pos. 148 ist angezeigt.



Das in *Abb. 34* gelb markierte Motiv für eine mögliche Phosphorylierung findet sich in dieser Form, also ein S-S-T direkt vor dem basischen Bereich des Leucin-Zippers, ebenfalls bei dem Transkriptionsfaktor Jun, der durch die Dephosphorylierung an diesen Positionen aktiviert (!) wird (BOYLE WJ et al., 1991).

Die berechnete Anordnung der Aminosäuren auf diesem möglichen helikalen Abschnitt des Core-Proteins ist in *Abb. 35 A und B* für die Bereiche aa119-160 und aa119-184 gezeigt, wobei eine extreme Konzentration der hydrophoben Aminosäuren im markierten Segment auffällt.

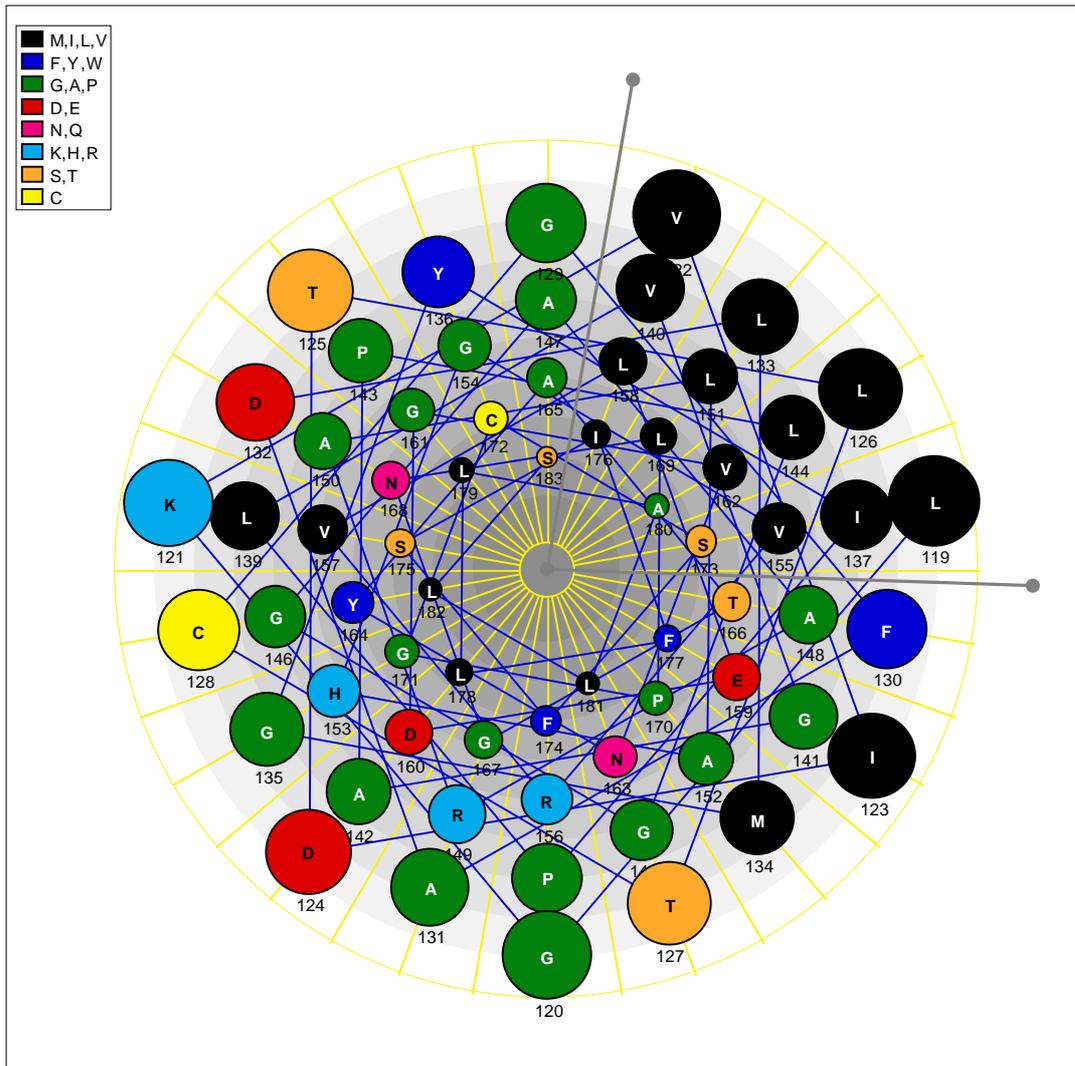


Abb. 35 B: Berechnung der Aminosäuren-Position in den möglichen helikalen Domänen des HCV-Core Proteins von pos. 119-184 [M58335]. Blickrichtung von N- zu C-Terminus (verwendetes Programm Protean, helical wheel, DNASTar Inc). Legende und Parameter s. Abb. 35 A.

Es sind also Strukturelemente neben der basischen Domäne des N-Terminus gezeigt, die eine Interaktion mit DNA oder eine Heterodimerisierung mit bZIP-haltigen Transkriptionsfaktoren (z.B. C/EBP, Jun, Fos, Myc) ermöglicht, für die eine Hetero- und/oder Homodimerisierung entscheidend für ihre Aktivität ist (LANDSCHULTZ WH et al., 1989; HSU W et al., 1994).

Zur Familie der bZIP-Proteine gehört auch der kürzlich in seiner repressorischen Wirkung auf den HBV-EnhII charakterisierte Transkriptionsfaktor E4BP4 (LAI CK et al., 1999).

Daß das HCV-Core-Protein in der Lage ist, mit zellulären Transkriptionsfaktoren zu interagieren, ist in einer Untersuchung gut belegt (JIN DY et al., 2000). Das HCV-Core-Protein war hier in der Lage, den bZIP-Transkriptionsfaktor LZIP zu

inaktivieren, und seinen Transport in den Kern zu unterbinden. Die für diese Inaktivierung verantwortliche Domäne des Core-Proteins wurde im Bereich aa91-191 kartiert, was dem möglichen bZIP-Bereich entspricht. Ein Core-Konstrukt für den Bereich aa1-123 zeigte gegenüber dem Vollängenkonstrukt noch eine geringere, aber signifikante Inaktivierung. Es ergaben sich Hinweise, daß das Core-Protein eine Homodimerisierung des LZIP zur aktivierten Form verhindert und nicht einen schon vorhandenen LZIP-Komplex inaktiviert.

LZIP aktiviert die CRE (cyclic AMP response element)-abhängige Transkription, was durch das Core-Protein nun inhibiert wurde. Eine Interaktion des Core-Proteins mit den Faktoren CREB (CRE-bindendes Protein), ATF4, c-Jun und c-Fos konnte nicht gezeigt werden.

Bezüglich einer möglichen direkten Bindung des Core-Proteins an Promotorelemente, gibt es leider nur einen Hinweis: trotz Vorliegen einer Suppression des p21-Waf1/Cip1/Sid1-Promotors durch Core-Protein konnte seine Bindung an den Promotor-Bereich nicht gezeigt werden (RAY RB et al., 1998).

Aus der Sequenz des HCV-Core-Proteins abgeleitete Struktur motive wie auch Untersuchungen mit zellulären Transkriptionsfaktoren können also Hinweise zur Aufklärung des in dieser Arbeit gezeigten interviralen Suppressionseffektes liefern. Die genaue Erforschung des Mechanismus könnte nun über Band-shift-Assays mit HBV-DNA sowie Interaktionsuntersuchungen (z.B. Yeast-Two-Hybrid-System, Koimmunpräzipitation) von Transkriptionsfaktoren und HCV-Core-Protein erfolgen. Auch Pull-down Experimente könnten Hinweise geben.

5.5 Repressionsaktivität des HCV als viraler Pathogenitätsfaktor

Betrachtet man es auf der Basis dieser Arbeit als gegeben, daß das HCV-Core-Protein in der Lage ist, die Enhancer des HBV zu supprimieren, stellt sich die Frage, inwiefern das HCV durch diese spezifische Fähigkeit einen evolutionären Selektionsvorteil erlangt. Bei der Situation einer beschriebenen HBV-HCV-Koinfektion liegt dies durch den Konkurrenzvorteil bei der Nutzung des zellulären Transkriptions- und Translationsapparates zur Verwirklichung viraler Transkripte auf der Hand.

Die Entstehung solcher Suppressionsmechanismen ist jedoch primär im Zusammenhang mit der Replikation des HCV als Monoinfektion zu sehen, da hier ein primärer zellulärer Selektionsdruck vorliegt.

Im Falle einer HCV-Monoinfektion also ist zu diskutieren, ob eine Suppression zellulärer Enhancer, die in ihrem grundsätzlichen Aufbau jener des HBV gleichen, möglich erscheint bzw. eine Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren durch das HCV-Core-Protein vorliegen könnte, die eine entsprechende Wirkung auf die zelluläre Transkription haben könnte. Ein solcher Effekt würde nicht nur die Möglichkeit der Verwirklichung viraler Transkripte erhöhen, sondern auch zelluläre Abwehrmechanismen, wie die Produktion von Interferon, herabsetzen. Da das HCV als RNA-Virus die zellulären RNA-Polymerasen nicht zur Replikation benötigt und für eine eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase codiert, bewirkt eine Suppression zellulärer Transkripte auch eine Erhöhung des in der Zelle zur Verfügung stehenden Pools an Ribonukleosidtriphosphaten zur Synthese viraler RNA.

Die Suppression des HBV durch das HCV wäre dann eine Folge der hoch spezifischen Anpassung des HBV an die Transkriptionsregulation der Hepatocyte: da das HBV sich in seiner sehr komplexen Regulation an das Vorhandensein des Transkriptionsfaktoren-Musters der Leberzelle anpaßte und die zellulären Regulationselemente, insbesondere das Vorhandensein von Enhancern im Verlauf der Evolution nachahmt, ist der reprimierende Effekt des HCV auch auf das HBV wirksam.

Aus dieser These wäre zu folgern, daß Suppressionseffekte des HCV-Core-Proteins auch bei der Expression zellulärer Gene nachweisbar sein müßten.

In der Tat gibt es experimentelle Hinweise auf die Suppression zellulärer Regulationselemente durch das HCV-Core-Protein. So ist eine reprimierende Wirkung auf die Aktivität des p21/WAF1/Cip1/Sid1-Promotors (dieser beeinflusst die Cyclin-abhängige Kinase und damit die Regulation des Zellzyklus) von einer Gruppe beschrieben worden (RAY BR et al., 1998) aber nicht genauer bezüglich des Mechanismus spezifiziert. In ähnlicher Weise wurde die Repression des p53-Promotors vermutet (RAY BR et al., 1997). Eine andere Arbeit widerspricht beiden reprimierenden Effekten und zeigt hingegen eine Erhöhung des transaktivierenden Effektes des Tumorsuppressors p53 durch das Core-Protein (LU W et al., 1999). Ein Einfluß des Core-Proteins ist auch auf die differentielle Regulation nukleärer Transkriptionsfaktoren beschrieben, insbesondere eine Suppression der Tumor-Nekrose-Faktor-induzierten NF- κ B Aktivierung (SHRIVASTAVA A et al., 1998).

Die experimentellen Daten sind insgesamt noch nicht hinreichend, um die Rolle des HCV-Core-Proteins im Zusammenhang mit Aktivierung oder Repression zellulärer Regulationselemente zu beurteilen. Eine konsequente Erforschung dieser Frage könnte jedoch einen Einblick in die Pathogenitätsmechanismen des HCV ermöglichen.

5.6 Klassifikation viraler Koinfektionen

In der virologischen Literatur sind mehrere Interaktionsmöglichkeiten bei Koinfektionen beschrieben, die sich zum Teil auf den Infektionsablauf und klinische Effekte beziehen, zum anderen auch auf die Virusreplikation selbst oder Phänomene der Entstehung genotypisch und phänotypisch neuer Virusstämme nach viraler Koinfektion. Ergänzt wird dieses komplexe Bild durch Mechanismen der Koreplikation bei abhängigen oder defekten Viren (Dependoviren, interfering particles) bis hin zur Interaktion von Viren mit nicht viralen Erregern bei einer klinischen Koinfektion. Bislang wurde kein Versuch unternommen, diese sehr heterogenen Phänomene einer Klassifizierung zuzuführen.

Mögliche Konstellationen viraler Koinfektionen

Als erstes Kriterium einer Koinfektion erscheint es sinnvoll, die Art der beteiligten Partner zu klassifizieren. Es werden 5 Hauptgruppen unterschieden:

- I. Zwei verschiedene Sub-/Genotypen einer Virusspezies
- II. Ein Virus mit abhängigem Partner
- III. Zwei unabhängige Viren verschiedener Spezies
- IV. Mehr als zwei virale Erreger
- V. Komplexe Koinfektion mit nichtviralem Erreger

Art der viralen Interaktion

Es werden 6 abgestufte Nebengruppen unterschieden:

- a. Keine gegenseitige Beeinflussung
- b. Nur Beeinflussung des klinischen Verlaufes von mind. einem Partner
- c. Wechselwirkung auf Immunebene
(klassische Interferenz bis hin zur Beeinflussung des Virusattachment)
- d. Beeinflussung der Virusreplikation auf zellulärer Ebene
(Translation/Transkription)
- e. Phänotypische Beeinflussung (phänotypische Mischung)
- f. Genotypische Beeinflussung (Rekombination, Reassortment)

Zur Klassifikation wird jeweils das maximal zutreffende Kriterium für eine virale Koinfektion gewählt. Bei Kombination von der Konstellations- und Interaktionsgruppen, ergeben sich 30 verschiedene Konstellationen (*Abb.36*) für die bislang untersuchte Beispiele angeführt sind.

Diese Klassifikation nimmt sowohl klinische als auch molekularbiologische Kriterien in die Bewertung mit auf. Für einige Kombinationen gibt es noch keine klar belegten Beispiele, da die Erforschung von Koinfektionen noch nicht systematisch erfolgt. Aber gerade im Hinblick auf viral/bakterielle Koinfektionen nimmt ihre Bedeutung im klinischen Bereich stark zu vor allem im Hinblick auf Koinfektionen des Respiratorischen Systems (RSV und Influenzavirus als Partner bakterieller Infektionen) und parenterale virale Koinfektionen bei HIV.

Eine zusätzliche Nomenklatur zur Unterscheidung von Simultaninfektionen und Superinfektionen wäre vorzuschlagen, z.B.:

HBV-HCV : Simultaninfektion

HBV/HCV : Superinfektion durch HCV

HCV/HBV : Superinfektion durch HBV

Nach der vorgeschlagenen Systematik würde man die gezeigten Suppressions-Phänomene zwischen HBV und HCV als Typ IIIId klassifizieren.

	I	II	III	IV	V
a	HCV/HCV (Matsubara T, 1996) HHV6 A/B (Cone RW, 1996) CMV/CMV (Baldanti F, 1998)		unabhängige virale Koinfektion		unabhängige bakteriell-virale Koinfektion
b	EBV A/B (Bouzid M, 1993)	HBV/HDV (Chen PS, 1988)	HIV/VZV HSV/HHV6 (Tang YW, 1997)	HGV/HCV/HIV (Thiers V, 1998)	Influenza/ H. influenzae HCV/Schistosoma mansoni (Pereira LM, 1995)
c	YFV/ Impfstamm (David-West TS, 1975)		TBV/Powassan (Khozinskaia GA, 1982)		HIV/bakterielle Inf. LDV/ Nippostrongylus bras. (Morimoto M, 1998)
d		Adenovirus/AAV AAV/HSV (Heilbronn R, 1990) Parvovirus/AAV (Berns KI, 1990)	HBV/HCV CMV/HIV (Jault FM, 1994) CMV/HTLV1 (Szabo J, 1998) Influenza A/RSV (Shinjoh M, 2000)	HIV/EBVA/EBVB (Sculley TB, 1990)	
e	Poliovirus 1 und 2 (Ledinko N, 1961)		ECHO7/Coxsackie A9 (Itoh H, 1959) Influenza/Oncornavirus (Migunova BV, 1981) VSV/HSV (Huang AS, 1974)		
f	Influenzaviren (Sharp GB, 1997) Rotaviren (Chnaiderman J, 1998) SinNombreVirus-Stämme (Hendersson WW, 1995)	SV40/AAV (Grossmann Z, 1984)	(CuMV/ToAsV) (Masuta C, 1998) SNV, NMR11/BlackCreek Canal Virus (Rodriguez LL, 1998)		

Abb.36: Beispiele für die Klassifikation viraler Koinfektionen: HHV: Humanes Herpes Virus, EBV: Epstein-Barr-Virus, YFV: Gelbfiebervirus, AAV: Adeno-assoziiertes Virus, HDV: Hepatitis-D-Virus, VZV: Varizella Zoster Virus, TBV: Tick-borne Encephalitis Virus, RSV: Respiratory Syncytial Virus, CuMV: Cucum-ber Mosaic Virus, ToAsV: Tomato Aspermie Virus, SNV, NMR11: Sin-nombre Virus Stamm NMR11, LDV: Lactat-Dehydrogenase-Virus

5.7 Ausblick

Aus den dargelegten Daten zur differentiellen Suppression der HBV-Enhancer durch das HCV-Core-Protein ergeben sich wichtige Fragestellungen für weitere Untersuchungen. Die weitere Aufklärung des Suppressionsmechanismus könnte auch wesentliche Pathogenitätsmechanismen des HCV aufdecken und bei der Entwicklung neuer Ansätze der Therapie einer HBV/HCV-Koinfektion bzw HCV-Monoinfektion hilfreich sein.

In einem therapeutischen Ansatz gegen HBV wäre die artifizielle Nachahmung der dargelegten Enhancer-Suppression denkbar, zumindest gibt es Ansätze, bZIP-Heterodimerisierungen vorherzusagen und spezifische Peptide für eine solche Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren zu designen (VINSON CR et al., 1993).

Bei der Erforschung von komplexen Regulationssystemen, wie der Regulation der Genexpression, insbesondere bei zusätzlicher Anwesenheit von zwei replizierenden Viren, gibt es jedoch auch prinzipielle Probleme erkenntnistheoretischer Art. Es ist zu überlegen, wieviele Parameter man in einem solchen dynamischen System konstant halten kann, um die Wirkung einzelner Proteine noch zu untersuchen und ob die Ergebnisse einer solchen Untersuchung einen Einblick in die tatsächlichen Verhältnisse des Regulationssystems noch bieten können. (PRIGOGINE I, 1977). In der Literatur sind beispielsweise zahlreiche Interaktionen des HCV-Core-Proteins wie z.B. des HBx-Proteins publiziert, die in keinem Zusammenhang mit einer gezeigten tatsächlichen Wirkung stehen können. Die Prüfung dieser Daten kann schließlich nur in ihrer Wertigkeit am Makrosystem überprüft werden, d.h. in ihrer tatsächlichen Wirksamkeit auf das Verhalten im Organismus.

Im Falle des untersuchten Suppressionsmechanismus ist der Zusammenhang mit der Konsequenz für das Makrosystem, d.i. der Patient dargelegt. Es wurde auch durch den Beweis einer differentiellen Suppression der Enhancer die Grundlage für eine Erklärung zweiter Ordnung gelegt, im Vergleich zur bloßen Beschreibung der Suppression des HBV durch HCV, die eine Erklärung erster Ordnung darstellen würde (GADENNE V, 1994).

Die Erforschung viraler Koinfektionen bleibt eine Herausforderung für den Kliniker wie auch den molekularbiologisch-orientierten Virologen.

6 Literaturverzeichnis

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB: Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615 – 618

Alberti A, Chemello L, Benvegno L: Natural history of hepatitis C. *J. Hepatol.* 1999; 31, suppl. 1: 17 - 24

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS: The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *New Engl. J. Med.* 1999; 341, 8: 556 - 562

Amann E, Ochs B, Abel KJ: Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988; 69, 2: 301-315

Andreone P, Zignego AL, Cursaro C, Gramenzi A, Gherlinzoni F, Fiorino S, Giannini C, Boni P, Sabattini E, Pileri S, Tura S, Bernardi M: Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 1998; 129, 4: 294-298

Aoki H, Hayashi J, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O: Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase raf-1. *J. Virol.* 2000; 74, 4: 1736 - 1741

Baldanti F, Sarasini A, Furione M, Gatti M, Comolli G, Revello MG, Gerna G: Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. *Arch. Virol.* 1998; 143, 9: 1701 – 1709

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C: Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 1200-1205

Berg T, Hopf U: Interferontherapie der HCV-Infektion, in: Häussinger D, Niederau C (eds.) *Hepatitis C; Berlin; Wien [u.a.] Blackwell-Wiss.-Verl.* 1997.

Berns KI: Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 1990; 54, 3: 316 – 329

Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 1979; 7, 6: 1513 - 1523

Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI: A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 1967; 66, 5: 924 - 931

Booth JCL, Kumar U, Webster D, Monjardino J, Thomas HC: Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 1998; 27, 1: 223 - 227

Bouزيد M, Belkaid MI, Colonna P, Bouguermouh AM, Ooka T: Co-existence of the A and B types of Epstein-Barr virus DNA in lymph node biopsies from Algerian patients with Hodgkin's disease and non-Hodkin's lymphoma. *Leukemia* 1993; 7, 9: 1451 – 1455

Boyle WJ, Smeal T, Defize LHK, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T: Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c Jun at sites that negatively regulate its DNA binding activity. *Cell* 1991; 64: 573 - 584

Bradley DW, Maynard JE, McCaustland KA, Murphy BL, Cook EH, Ebert JW: Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: interference with acute hepatitis A virus and chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 1983; 11: 207 - 213

Bradley DW. The agents of non-A, non-B viral hepatitis. *J. Virol. Methods* 1985; 10, 4: 307 - 319

Brasier AR, Tate JE, Habener JF: Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 1989; 7, 10: 1116 - 1122

Brotman B., Prince AM, Huima T, Richardson L, van den Ende MC, Pfeifer U: Interference between non-A, non-B and hepatitis B virus infection in chimpanzees. *J. Med. Virol.* 1983; 11: 191-205

Brown RA, Zhang H, Ping L-H, Lemon SM: Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids. Res.* 1992; 20: 5041-5045

Bruß V, Gerlich WH: Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral core precore protein. *Virology* 1988; 163: 268 - 275

Buckwold VE, Xu Z, Yen TS, Ou JH: Effects of a frequent double-nucleotids basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J. Gen. Virol.* 1997; 78, 8: 2055 - 2065

Buendia MA, Paterlini P, Tiollais P, Brechot C: Hepatocellular Carcinoma, Molecular Aspects. in: Zuckerman AJ, Thomas HC (eds.) *Viral Hepatitis, London, Edinburgh, Philadelphia, Sydney* 1998; p. 179 - 200

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341,1: 22 - 26

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis SJ: Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *J. Infect. Dis.* 1989; 2: 588 - 591

Chang HK, Wang BY, Yuh CH, Wei CL, Ting LP: A liver-specific nuclear factor interacts with the promoter region of the large surface protein gene of human hepatitis B virus. *Mol. Cell Biol.* 1989; 9: 5189 - 5197

Chen CM, You LR, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MMC: Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin- β receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin- β receptor. *J. Virol.* 1997; 71: 9417 - 9426

Chen PS, Chen DC, Chen CR: Delta infection in asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen: low prevalence of delta activity and effective suppression of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1988; 8: 1121 - 1124

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18, 24: 5294 - 5299

Chnaiderman J, Diaz J, Magnusson G, Liprandi F, Spencer E: Characterization of a rotavirus rearranged gene 11 by gene reassortment. *Arch. Virol.* 1998; 143, 9: 1711 - 1722

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

Chou PY: Prediction of protein structural classes from amino acid composition, in: *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation*, Plenum Press, 1990, New York, NY, pp. 549-586

Cone RW, Huang ML, Hackman RC, Corey L: Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34, 4: 877 - 881

Damen M, Cuypers HT, Zaajer HL, Reesink HW, Schaasberg WP, Gerlich WH, Niesters HG, Lelie PN: International collaborative study on the second EUROHEP HCV-RNA reference panel. *J. Virol. Methods* 1996; 58: 175 - 185

Dane DS, Cameron CH, Briggs M.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698

Darnell JE: STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630 - 1635

David-West TS: Concurrent and consecutive infection and immunisation with yellow fever and UGMP-359 viruses. *Arch. Virol.* 1975; 48, 1: 21 - 28

DeMoerlooze L, Lecomte C, Brown-Shimmer S, Schmetz D, Guiot C, Vandenberg D, Allaer D, Rossius M, Chappuis G, Dina D: Nucleotide sequence of the BVDV Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 1433 - 1438

Dienes HP, Purcell RH, Popper H, Bonino F, Ponzetto A: Light microscopic and ultrastructural findings in chimpanzees with dual infections of hepatitis B virus and non-A, non-B agents (abstract); in: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE (Hg.): *Viral Hepatitis International Symposium*. Philadelphia, Franklin Institute Press, 1981, S. 773f

Donato F, Boffetta P, Puoti M: A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 1998; 75, 3: 347-354

Donello JE, Beeche AA, Smith GJ, Lucero GR, Hope TJ: The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *J. Virol.* 1996; 70, 7: 4345 - 4351

Dumoulin FL, Von dem Bussche A, Sohne J, Sauerbruch T, Spengler U: Hepatitis C virus core protein does not inhibit apoptosis in human hepatoma cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999; 29, 11: 940 - 946

Etchinson D, Milburn SC, Edery I, Sonenberg N, Hershey JWB: Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the pro-

teolysis of a 220,000 dalton polypeptide associated with eukaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 14806 - 14810

Fong TL, DiBisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle JH: The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1991; 14, 1: 64 - 67

Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F: Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 1991;(suppl 2): 223

Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, Kushiya Y, Uchida Y, Iihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y: Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 201 - 207

Gadenne V: Theoriebewertung. in: *Hermann T, Tack W (eds.) Methodologie und Methoden. Serie 1, Band 1, Göttingen 1994.*

Gerlich WH, Robinson WS: Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980; 21, 3: 801 - 809

Glück D: Risiko der HIV-, HCV- und HBV-Übertragung durch Blutpräparate. *Infusionsther. transfusionsmed.* 1999; 26: 335 - 338

Grinell BW, Wagner RR: Comparative inhibition of cellular transcription by vesicular stomatitis virus serotypes New Jersey and Indiana: role of each viral leader RNA. *J. Virol.* 1983; 48: 88 - 101

Gronemeyer H, Moras D: Nuclear receptors: how to finger DNA. *Nature* 1995; 375: 190 - 191

Grossman Z, Wincour E, Berns KI: Recombination between simian virus 40 and adeno-associated virus: virion coinfection compared to DNA cotransfection. *Virology* 1984; 134, 1: 125 - 137

Guido M, Thung SN, Fattovich G, Cusinato R, Leandro G, Cecchetto A, Cesaro S, Panese P, Rugge M: Intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens: effect of hepatitis C virus infection. *Mod. Pathol.* 1999; 12,6: 599 - 603

Günther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H: Type, prevalence, and significance of Core Promoter/Enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J. Virol.* 1996; 70, 12: 8318-8331

Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH: Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13, 1: 443 - 448

Guo WT, Bell KD, Ou JH: Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and X promoter complex. *J. Virol.* 1991; 65, 12: 6686 - 6692

Hanahan D: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983; 166, 4: 557 - 580

Heermann K-H, Gültekin H., Gerlich WH: Protein blotting: techniques and application in virus hepatitis research; *Ric. Clin. Lab.* 1988; 18(2-3):103 - 221

Heilbronn R, Burkle A, Stephan S, zur Hausen H: The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J. Virol.* 1990; 64, 6: 3012 – 3018

Heim MH: Intracellular signalling and antiviral effects of interferon. *Dig. Liver Dis.* 2000; 32, 3: 257 - 263

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJM, Rice CM, Thiel HJ: Genus Hepacivirus. in: *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, van Regenmortel MHV et al. (eds.), International Union of Microbiological Societies, 1999; p.872 - 878*

Henderson WW, Monroe MC, StJeor SC, Thayer WP, Rowe JE, Peters CJ, Nichol ST: Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 1995; 214, 2: 602 – 610

Horie C, Iwahana H, Horie T, Shimizu I, Yoshimoto K, Yogita S, Tashiro S, Ito S, Itakura M: Detection of different quasispecies of hepatitis C virus core region in cancerous and noncancerous lesions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218, 3: 674 - 681

Hsieh TY, Matsumoto M, Chou HC, Schneider R, Hwang SB, Lee AS, Lai MMC: Hepatitis C virus core protein interacts with heterogenous nuclear ribonucleoprotein K. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 28: 17651 - 17659

Hsu W, Kerppola TK, Chen PL, Curran T, Chen-Kiang S: Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol. Cell Biol.* 1994; 14, 1: 268 - 276

Huang AS, Palma EL, Hewlett N, Roizman B: Pseudotype formation between enveloped RNA and DNA viruses. *Nature* 1974; 252: 743 – 745

Huang J, Liang TJ: A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13: 7476 - 7486

Inglis SC: Inhibition of host protein synthesis and degradation of cellular mRNAs during infection by influenza and herpes simplex virus. *Mol. Cell Biol.* 1982; 2: 1644 - 1648

Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N: Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. *J. Virol.* 2000; 74, 3: 1241 - 1251

Itoh H, Melnick JL: Double infections of single cells with ECHO 7 and Coxsackie A9 viruses. *J. Exp. Med.* 1959; 109: 393 – 406

Jault FM, Spector SA, Spector DH: The effects of cytomegalovirus on human immunodeficiency virus replication in brain-derived cells correlate with permissiveness of the cells for each virus. *J. Virol.* 1994; 68, 2: 959 – 973

Jin DY, Wang HL, Zhou Y, Chun AC, Kibler KV, Hou YD, Kung H, Jeang KT: Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J.* 2000; 19, 4: 729 - 740

Kane A, Lloyd J, Zaffran M, Simonsen L, Kane M: Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bulletin of the WHO* 1999; 77, 10: 801 - 807

Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with nonA, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 9524 - 9528

Khozinskaia GA, Pogodina VV: Modeling of mixed infection by tick-borne encephalitis and Powassan viruses in mice. *Vopr. Virusol.* 1982; 27, 4: 491 - 495 (nur Abstract erhältlich)

Koike K, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Hino K, Kurokawa K, Iino S: Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C. *J. Med. Virol.* 1995; 45, 2: 236-239

Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM: Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 1996; 70: 3363 - 3371

Kosovsky MJ, Qadri I, Siddiqui A: The regulation of hepatitis B virus gene expression: an overview of the *cis*- and *trans*-acting components. in: *Koshy R, Caselmann WH (eds.), Hepatitis B Virus; London 1998, p. 21- 50*

Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982; 157: 105-132

Labat, R., Un Traité medical akkadien, essai de reconstruction de la série enuma ana bit marsi asipu illikui. *Rev. Assyr.* 1945/46; 40: 27f

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 1970; 227:680-685

Lai CK, Ting LP: Transcriptional repression of human hepatitis B virus genes by a bZIP family member, E4BP4. *J. Virol.* 1999; 73,4: 3197 - 3209

Landschultz WH, Johnson PF, McKnight SL: The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 1989; 243: 1681 - 1688

Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS: Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J. Immunol.* 1999; 162, 2: 931 - 938

Lau GKK, Wu PC, Lo CK, Lau V, Lam SK: Histological changes of concurrent hepatitis C virus infection in asymptomatic hepatitis B virus patients. *J. Gastro. Hepato.* 1998; 13: 52 - 56

Ledinko N, Hirst GK: Mixed infection of cells with poliovirus types 1 and 2. *Virology* 1961; 14: 207 - 219

Lee DS, Huh K, Lee EH, Lee DH, Hong KS, Sung YC: HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1997; 12, 12: 855-861

- Lee YH, Yun Y:** HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 39: 25510 - 25515
- Li M, Xie YH, Kong YY, Wu X, Zhu L, Wang Y:** Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 44: 29022 - 29031
- Liaw YF, Chien RN, Chen TJ, Sheen IS, Chu CM:** Concurrent hepatitis C virus and hepatitis delta virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 1992; 37, 4: 294-297
- Liaw YF, Chien RN, Sheen IS, Lin DY, Lin HH, Chu CM:** Hepatitis C virus infection in patients with chronic liver diseases in an endemic area for hepatitis B virus infection. *Gastroenterol. Jpn.* 1991; 26 Suppl. 3: 167-169
- Liaw YF, Tsai SL, Chang JJ, Sheen IS, Chien RN, Lin DY, Chu CM:** Displacement of hepatitis B virus by hepatitis C virus as the cause of continuing chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 106, 4: 1048 - 1053
- Liu JJ, Wong ML, Chang TJ:** The recombinant nucleocapsid protein of classical swine fever virus can act as a transcriptional regulator. *Virus Res.* 1998; 53, 1: 75-80
- Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P:** Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localisation. *J. Virol.* 1997; 71, 1: 657 - 662
- Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH:** Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology* 1994; 199, 1: 124 - 131
- Lo WY, Ting LP:** Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J. Virol* 1994; 68, 3: 1758 - 1764
- Lobigs M:** Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer section require the function of the viral proteinase NS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6218 - 6222
- Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A:** Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87, 13: 5069 - 5073
- Lopez-Rodriguez C, Botella L, Corbi AL:** CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 46: 29120 - 29126
- Lu W, Lo SY, Chen M, Wu KJ, Fung YK, Ou JH:** Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999; 264, 1: 134 - 141
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich F, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kustner P, Mark M, Chambon P, Evans RM:** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83: 835 - 839

Manns MP, Rambusch EG: Extrahepatische Manifestationen und Autoimmunität bei HCV-Infektionen. in: Häussinger D, Niederau (Hrsg.): *Hepatitis C*. Blackwell, Wien 1997, S. 165-182

Marasuwa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K: Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappa B activation. *J. Virol.* 1999; 73, 6: 4713 - 4720

Masuta C, Ueda S, Suzuki M, Uyeda I: Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95, 18: 10487 - 10492

Matsubara T, Sumazaki R, Shin R, Nagai Y, Takita H: Genotyping of hepatitis C virus: coinfection by multiple genotypes detected in children with chronic post-transfusion hepatitis C. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1996; 22, 1: 79 - 84

Migunova BV, Kuznetsov OK: Incorporation of influenza virus antigens into the envelope of the avian oncornavirus. *Vopr. Onkol.* 1981; 27, 10: 63 - 67 (nur Abstract erhältlich)

Mondelli MU, Silini E: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J. Hepatol.* 1999; 31, suppl. 1: 65 - 70

Morimoto M, Yamada M, Arizono N, Hayashi T: Lactic dehydrogenase virus infection enhances parasite egg production and inhibits eosinophil and mast cell response in mice infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 1998; 93, 4: 540 - 545

Nakanishi-Matsui M, Hayashi Y, Kitamura Y, Koike K: Integrated hepatitis B virus DNA preserves the binding sequence of transcription factor Yin and Yang 1 at the virus-cell junction. *J. Virol.* 2000; 74, 12: 5562 - 5568

Nakano I, Fukuda Y, Katano Y, Nakano S, Kumada T, Hayakawa T: Why is the interferon sensitivity-determining region (ISDR) system useful in Japan? *J. Hepatol.* 1999; 30, 6: 1014 - 1022

Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H: Viral dynamics in hepatitis B viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 4398-4402

Ohno O, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba K, Orito E, Mukaide M, Williams R, Lau JY: New hepatitis C virus genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 1: 201 - 207

Pahl HL, Bäuerle PA: A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* 1995; 14, 11: 2580 - 2588

Pahl HL, Bäuerle PA: The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends. Biochem. Sci.* 1997; 22, 2: 63 - 67

Palitzsch KD, Hottenträger B, Schlottmann K, Frick E, Holstege A, Schölmerich J, Jilg W: Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 11, 11: 1215-1220

- Pallas JR, Farinas-Alvarez C, Prieto D, Delgado-Rodriguez M:** Coinfections by HIV, hepatitis B and hepatitis C in imprisoned injecting drug users. *Eur. J. Epidemiol.* 1999; 15, 8: 699 - 704
- Pereira LM, Melo MC, Saleh MG, Massarolo P, Koskinas J, Domingues AL, Spinelli V, Mies S, Williams R, McFarlane IG:** Hepatitis C virus infection in Schistosomiasis mansoni in Brazil. *J. Med. Virol.* 1995; 45, 4: 423 – 428
- Pontisso P, Gerotto M, Benvegno L, Chemello L, Alberti A:** Coinfection by hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Antiviral Ther.* 1998; 3, *supp.* 3: 137 - 142
- Pontisso P, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Gallorini A, Ruol A, Alberti A:** Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterology* 1993; 105, 5: 1529-1533
- Prigogine I:** From Being to Becoming – Time and Complexity in Physical Sciences. 1977 (*dtsch. Übersetzung München* 1979).
- Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, Milian SJ:** Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus, *Lancet* 1974; *ii*: 241-246
- Prince AM.** An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968; 60, 3: 814-821
- Raney AK, Johnson JL, Palmer CNA, McLachlan A:** Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J. Virol.* 1997; 71, 2: 1058 - 1071
- Ravaggi A, Natoli G, Primi D, Alberti A, Levrero M, Cariani E:** Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells. *J. Hepatol.* 1994; 20, 6: 833-836
- Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R:** Hepatitis C virus core protein represses p21-WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 1998; 208: 331 - 336
- Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R:** Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 17: 10983-10986
- Repp R, v. Hörsten B, Fischer HP, Gerlich WH, Lampert F:** Hepatitis B virus infection in children with cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993; 12, 7: 620 - 621
- Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, Nichol ST:** Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 1998; 242, 1: 99 - 106
- Ross RS, Viazov S, Renzing-Kohler K, Roggendorf M:** Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J. Med. Virol.* 2000;60, 2: 122-125
- Rüster B, Zeuzem S, Roth WK:** Hepatitis C virus sequences encoding truncated core proteins detected in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 219: 911 - 915
- Sato S, Fujiyama S, Tanaka M, Yamasaki K, Kuramoto I, Kawano S, Sato T, Mizuno K, Nonaka S:** Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 1994; 21, 2: 159-166

Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR: Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233, 2: 374 - 381

Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems RW, Gerlich WH, Schaefer S: Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000; 355: 41-42

Sculley TB, Apolloni A, Hurren L, Moss DJ, Cooper DA: Coinfection with A- and B-type Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.* 1990; 162, 3: 643 - 648

Seitz H, Thomssen R, Heermann KH: Zentrale Prozesse der Hepatitis-C-Virus-Kapsidbildung: Proteolytische Prozessierung und Dimerisierung. *Poster der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg 1998 und persönliche Mitteilung R. Thomssen.*

Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, Bean WJ, Pryor SP, Hinshaw V, Webster RG: Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution and biological significance. *J. Virol.* 1997; 71, 8: 6128 - 6135

Shaul Y, Rutter WJ, Laub O: A human hepatitis B viral enhancer element. *EMBO J.* 1985; 4, 2: 427 - 430

Sheen IS, Liaw YF, Lin DY, Chu CM: Role of hepatitis C and delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariate analysis in a longitudinal follow-up study. *J. Infect. Dis.* 1994; 170, 2: 358 - 361

Shibata H, Nawaz Z, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ: Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11, 6: 714 - 724

Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH: Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J. Virol.* 1995; 69, 2: 1160 - 1171

Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH: Suppression of Hepatitis B Virus Expression and Replication by Hepatitis C Virus Core Protein in HuH-7 Cells. *J. Virol.* 1993; 67, 10: 5823-5832

Shimizu YK, Purcell RH: Cytoplasmic antigen in hepatocytes of chimpanzees infected with non-A, non-B hepatitis virus or hepatitis delta virus: Relationship of interferon. *Hepatology* 1989; 10: 764-768

Shinjoh M, Omoe K, Saito N, Matsuo N, Nerome K: In vitro growth profiles of respiratory syncytial virus in the presence of influenza virus. *Acta Virol.* 2000; 44, 2: 91 - 97

Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB: Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J. Virol.* 1998; 72, 12: 9722 - 9728

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, Brouwer JT, Chan SW, Chayama K, Chen DS, et al.: A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19, 5: 1321-1324

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS: Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* 1993;74 (Pt 11):2391-2399

Smith GJ, Donello JE, Lück R, Steger G, Hope TJ: The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucl. Acids Res.* 1998; 26, 21: 4818 - 4827

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* 1985; 150: 76 - 85

Spandau DF, Lee CH: Repression of the hepatitis B virus enhancer by a cellular factor. *J. Gen. Virol.* 1992; 73, 1: 131 - 137

Srinivas RV, Ray RB, Meyer K, Ray R: Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus Res.* 1996; 45, 2: 87-92

Su H, Yee JK: Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 2708 - 2712

Summers J, Mason WS: Replication of the genome of a hepatitis B-like Virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403 - 415

Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T: Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J. Gen. Virol.* 1995; 76, Pt 1: 53 - 61

Szabo J, Bacsı A, Andırko I, Kiss J, Nemes J, Toth FD: Reciprocal interactions between human cytomegalovirus and human T cell leukemia-lymphoma virus type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1998; 14, 8: 699 - 709

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K: Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* 1996; 70: 3307 - 3312

Tang YW, Espy MJ, Persing DH, Smith TF: Molecular evidence and clinical significance of herpesvirus coinfection in the central nervous system. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 11: 2869 - 2872

Taniguchi M, Shakil AO, Vargas HE, Laskus T, Demetris AJ, Gayowski T, Dodson SF, Fung JJ, Rakela J: Clinical and virologic outcomes of hepatitis B and C viral coinfection after liver transplantation: effect of viral hepatitis D. *Liver Transplant.* 2000; 6,1: 92 - 96

Thiers V, Pol S, Persico T, Carnot F, Zylberberg H, Berthelot P, Brechot C, Nalpas B: Hepatitis G virus infection in hepatitis C virus-positive patients co-infected or not with hepatitis B virus and/or human immunodeficiency virus. *J. Viral. Hepat.* 1998; 5, 2: 123 - 130

Tsai SY, Tsai MJ: Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev* 1997; 18, 2: 229 - 240

Tsukiyama KK, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A: Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 1992; 66: 1476 - 1483

Uchida T, Kaneita Y, Gotoh K, Kanagawa H, Kouyama H, Kawanishi T, Mima S: Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker-negative hepatitis B virus: probable replication promotion of the former by the latter as demonstrated by in vitro cotransfection. *J. Med. Virol.* 1997; 52, 4: 399 - 405

Vendrely R, Alexandrov K, De Sousa Lechner MC, Coirault Y: Fractionation of ribonucleic acids by 'Sephadex' agarose gel electrophoresis. *Nature* 1968; 218, 138 : 293 - 294

Vinson CR, Hai T, Boyd SM: Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev.* 1993; 7, 6: 1047 - 1058

Wang C, Le SY, Ali N, Siddiqui A: An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* 1995;1:526 - 537

Wang Y, Chen P, Wu X, Sun AL, Wang H, Zhu YA, Li ZP: A new enhancer element, ENII, identified in the X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* 1990; 64; 8: 3977 - 3981

Wengler G, Castle E, Leidner U, Nowak T, Wengler G: Sequence analysis of the membrane protein V3 of the flavivirus West Nile virus and of its gene. *Virology* 1985; 147: 264 - 274

WHO: Global surveillance and control of hepatitis C, Report of a WHO Consultation with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J. Viral Hepatitis* 1999; 6: 35 - 47

Wietzke P, Schott P, Braun F, Mihm S, Ramadori G: Clearance of HCV RNA in a chronic hepatitis C virus-infected patient during acute hepatitis B virus superinfection. *Liver* 1999; 19: 348 - 353

Williams I: Epidemiology of hepatitis C in the United States. *Am. J. Med.* 1999;107, 6B: 2S-9S

Wonderling RS, Kyostio SR, Walker SL, Owens RA: The Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 increases RNA levels from the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Virology* 1997; 236, 1: 167 - 176

Wu JC, Merlino G, Fausto N: Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 18; 91(2):674 - 678

Yee JK: A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science* 1989; 246: 658 - 661

Yeh CT, Chiu CT, Tsai SL, Hong ST, Chu CM, Liaw YF: Absence of precore stop mutant in chronic dual (B and C) and triple (B, C, and D) hepatitis virus infection. *J. Infect. Dis.* 1994; 170, 6: 1582-1585

Yuh CH, Ting LP: The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J. Virol.* 1990; 64, 9: 4281 - 4287

Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM: Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor ne-

rosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J. Virol.* 1998; 72, 5: 3691 - 3697

Zignego AL, DeCarli M, Monti M, Careccia G, LaVilla G, Giannini C, D'Elis MM, DelPrete G, Gentilini P: Hepatitis C virus infection of mononuclear cells from peripheral blood and liver infiltrates in chronically infected patients. *J. Med. Virol.* 1995; 47, 1: 58 – 64

7 Appendix

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 Einbuchstaben-Code wiedergegeben.

μ	mikro (10 ⁻⁶)
aa	Aminosäuren
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP1	Aktivator Protein 1
ASHV	Arctic Squirrel Hepatitis Virus
ATF	Activating transcription factor
BCA	Bicinchonininsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BVDV	Bovines-Virus-Diarrhoe-Virus
bZIP	basisches Leucin-Zipper Motiv
C	Core
C/EBP	CCAAT-Enhancer binding protein
cccDNA	covalently closed circular DNA
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	C/EBP-homologes Protein
CMV	Cytomegalie Virus
COUP	Chicken ovalbumin upstream promotor
Cp	Core-Promotor
CRE	cyclic AMP response element
CSF	Classical Swine Fever Virus
D	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Pyrokohlensäurediethylester

DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Envelope (Hüllprotein)
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Enh	Enhancer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
gp	Glykoprotein
GRE	Glucocorticoid-responsible Element
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde
HBc	Hepatitis-B-Core-Protein
HBe	Hepatitis-B-Hüllprotein
HBs	Hepatitis-B-Oberflächenprotein
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus, Delta-Agens
HHV6	Humanes Herpes-Virus 6
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNF	Hepatozyten-Nukleärer Faktor
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IU	Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
m	milli (10^{-3})

MCS	Multiple Klonierungsstelle
Min.	Minute
NANB	Non-A-Non-B
NF	Nukleärer Faktor
NRE	Negativ-regulatorisches Element
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame
p	Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PRE	Post-transkriptionelles regulatorisches Element
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rlu	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Respiratory syncytial virus
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RXR	Retinoid X receptor
S	S-Protein (surface)
s	Svedberg-Einheit
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	stemm loup
SP1	SV40 Promotor Protein 1
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tick-borne encephalitis virus
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCID	Toxic Calf-Infectious Dose

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehungen
v/v	Volumenverhältnis
VSV	Vesikuläre Stomatitis-Virus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
w/w	Gewichtsverhältnis
WHV	Woodchuck hepatitis virus
Xp	X-Promotor
YFV	Gelbfiebervirus
YY1	Ying-Yang Transkriptionsfaktor 1

Zusammenfassung

Die Suppression einer HBV-Infektion bei gleichzeitigem Vorliegen einer HCV-Infektion bzw. –Superinfektion ist seit etwa 20 Jahren bekannt. Diese intervirale Repression ist aufgrund der Häufigkeit einer solchen Koinfektion sowie der diagnostischen Relevanz beim Erkennen vermeintlich „stumme“ HBV-Infektionen klinisch von großer Bedeutung.

Da erste Hinweise für die Suppression der HBV-Replikation *in vitro* auf einen Effekt des HCV-Core-Proteins deuteten, konnte die Hypothese einer differentiellen Wirkung des Core-Proteins auf Regulationselemente des HBV in dieser Arbeit angenommen werden.

Es wurde gezeigt, daß das HCV-Core-Protein den EnhancerI/ X-Promotor des HBV 10fach, und den EnhancerII/ Core-Promotor 3-4fach supprimieren kann. Die Suppressionsaktivität war abhängig vom HCV-Genotyp: die Genotypen 1a und 3a zeigten nur etwa die Hälfte der Aktivität des Genotyps 1b. Aufgrund der Untersuchungen mit verkürzten Core-Protein-Konstrukten und einer nicht prozessierten Core-Mutante wurde gezeigt, daß für eine maximale Suppressionsaktivität die Reifung des Vollängen-Proteins aa1-191 zu einem p19 notwendig ist. Die Core-Proteine aa1-148 und aa1-115 zeigten nur noch eine etwa 2-3fache Repressionsaktivität auf den EnhI/Xp und keine signifikante Repression auf den EnhII/Cp.

Die Bedeutung von Stop-Mutationen innerhalb des HCV-Core-Bereiches konnte durch Untersuchung der intrazellulären Variabilität der mRNA, wie auch durch den Nachweis der Konservierung bei einer klinischen Übertragung verneint werden.

Die für die Suppression relevanten Bereiche der Enhancer konnten durch Deletionsmutanten näher bestimmt werden. So ist für die Suppression des EnhI/Xp der Abschnitt nt 1114 – 1236, und für den EnhII/Cp die Transkriptionsfaktoren-Bindestelle nt 1756 – 1770 im Bereich des „basic core promoters“ notwendig.

Unter Berücksichtigung der erhobenen Daten und weiterführender theoretischer Strukturanalysen des HCV-Core-Proteins, konnte die Bedeutung eines basischen Leucin-Zipper-Motivs für den Repressionseffekt in Betracht gezogen werden.

Das erste Klassifikationssystem für virale Koinfektionen wurde vorgeschlagen und die HBV/HCV-Koinfektion aufgrund der vorliegenden Daten als Typ IIIId klassifiziert.

Lebenslauf

Christian Gisbert Schüttler

geb. am 24.01.1967 in Karlsruhe

Vater: Gisbert Schüttler, selbst. Kaufmann

Mutter: Christiana Schüttler geb. Hummel

1973-86 Schulausbildung Grundschule Karlsruhe-Durlach/Aue
Markgrafengymnasium Durlach, Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe

1986 Abitur
Scheffelpreis der Literarischen Gesellschaft Karlsruhe

1985-88 Hauptorganist und Kantor der Liebfrauenkirche Karlsruhe

1986-88 Zivildienst Altenpflegeheim Durlach

SS 1988 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Justus-Liebig Universität Gießen

seit 1989 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

4/1990 Ärztliche Vorprüfung

4/1991 Erstes Medizinisches Staatsexamen

8+9/1991 Hilderstone College, Broadstairs GB

1992 Beginn der wissenschaftlichen Arbeit am Institut für Med. Virologie
der JLU Gießen (Prof. Dr. Gerlich)

ab WS92/93 Aufnahme des Studiums der Chemie als Nebenfach an der JLU

1992-95 Dozent für Pathologie an der Staatlichen Lehranstalt für MTA, Gießen

10/1995 Zweites Medizinisches Staatsexamen

4/1996-97 Medizinisches Praktisches Jahr am Universitätsklinikum der JLU
(Gynäkologie, Chirurgie, Innere Medizin)

4/1997 Drittes Medizinisches Staatsexamen

9/97-8/98 AiP am Zentrum für Med. Mikrobiologie und Virologie

9/98 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Med. Virologie Gießen

10/99-3/00 AiP an der Med. Klinik II, Infektionsstation der JLU

4/2000 Erteilung der Approbation als Arzt

4/00-9/00 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Med. Mikrobiologie Gießen

seit 10/00 Wiss. Mitarbeiter am Institut für Med. Virologie Gießen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. H. Gerlich möchte ich für die vertrauensvolle Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten danken, ebenfalls für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen über die unterschiedlichsten Bereiche der Virologie und des Lebens als Wissenschaftler.

Herrn Dr. med. Stephan Schaefer danke ich für die stetige und vertrauensvolle Unterstützung der praktischen und theoretischen Arbeit, sowie für seine unermüdlige Aufmunterung beim ständigen Kampf mit dem Core-Protein und all dem, was man damit anfangen kann. Ohne seine Hilfe hätte ich wohl vorzeitig kapituliert.

Herrn Prof. Dr. G. Wengler, Institut für Virologie (Vet. Med.) Gießen, danke ich für die wichtigen Diskussionen über Protein-Prozessierung bei den Flaviviridae zu Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Bein, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen, bedanke ich mich für die Überlassung der Seren im Rahmen des dokumentierten HCV-Übertragungsfalles.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Med. Virologie, die mich in ihrer Mitte erdulden mußten. Für die Hilfe bei Zellkulturen danke ich herzlichst Frau Siggie Bröhl, MTA; für die Hilfe bei Sequenzierungen danke ich besonders Frau Karin Schultheiß, MTA.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine lieben Mitarbeiter des Labors 341, von deren menschlicher und wissenschaftlicher Substanz ich vielseitig Unterstützung erfuhr: Herrn Dr. Ralph Schuster, Herrn Dr. Christian Jursch, Frau Dipl.-biol. Nicola Fiedler und Frau Dipl.-biol. Katja Schmidt.

Mein Dank gilt auch meiner Lieblingsschwester Kirsten und meinem Vater, der mir diesen Lebensweg ermöglichte und bei allem was ich verwirklichen wollte, mir stets vertraute. Meine beiden lieben Großmütter haben mich bei allen Schwierigkeiten begleitet und unterstützt. Ihren Wunsch, die Promotion ihres Enkels zu erleben, konnte ich nicht erfüllen, sie verstarben beide 1999.