

**Analyse des Einflusses von seltenen Codons
auf das „Ribosome Pausing“ und die Effizienz der Translation
und Replikation des Hepatitis C Virus**

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

vorgelegt von Hess, Carolin Sophie
aus Wetzlar

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Biochemisches Institut

Gutachter: Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann
Gutachter: Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation: 16.06.2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Hepatitis C	1
1.1.1 Übertragung.....	2
1.1.2 Therapie	2
1.2 Hepatitis C Virus.....	3
1.2.1 Genetische Variabilität und Klassifikation.....	3
1.2.2 Aufbau	3
1.2.2.1 Genom	4
1.2.2.2 Virale Proteine.....	6
1.3 Replikationszyklus des HCV.....	7
1.3.1 Translation.....	7
1.3.2 Replikation.....	8
1.3.3 Replikons zur Untersuchung von Translation und Replikation.....	9
1.4 Ribosome Pausing	10
1.4.1 Ribosome Pausing des HCV.....	12
1.5 Zielsetzung	14
2 Material & Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.2 Wiederverwendbare Materialien.....	15
2.1.3 Geräte.....	15
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.5 Kit-Systeme	17
2.1.6 Puffer.....	18
2.1.7 Enzyme & verwendete Puffer.....	19
2.1.8 Plasmide.....	19
2.1.9 Nukleotide.....	21

2.1.10 Primer	21
2.1.11 Größen- und Längenstandards	22
2.1.12 Kulturmedien.....	22
2.1.13 Bakterienstämme	22
2.1.14 Zelllinien	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	24
2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterien	24
2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien	24
2.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter E. coli	24
2.2.1.4 Transformation	25
2.2.1.5 Plasmidpräparation	26
2.2.1.6 Bestimmung der OD ₆₀₀	28
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.2.1 Restriktionsverdau.....	28
2.2.2.2 Dephosphorylierung	29
2.2.2.3 Ligation.....	29
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.2.5 Färben der Gele	30
2.2.2.6 Gelextraktion	31
2.2.2.7 Sequenzierung	32
2.2.2.8 In vitro-Transkription.....	32
2.2.2.9 DNase-Verdau.....	33
2.2.2.10 Phenol-Chloroform-Extraktion	34
2.2.2.11 Präzipitation von Nukleinsäuren	34
2.2.2.12 Qubit Assays.....	35
2.2.2.13 Arbeiten mit RNA	35
2.2.3 Zellbiologische Methoden	35
2.2.3.1 Arbeiten mit Zellen	35

2.2.3.2	Auftauen eukaryotischer Zellen	36
2.2.3.3	Kultivierung und Splitten eukaryotischer Zellen	36
2.2.3.4	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer	36
2.2.3.5	Zellen aussäen	37
2.2.3.6	Transfektion mit Lipofectamine 2000	37
2.2.3.7	HiBiT Assay	38
2.2.3.8	WST-1 Assay	39
2.2.4	Qualitätskontrolle	39
2.2.5	Statistische Methoden	40
2.2.5.1	Datenaufbereitung	40
2.2.5.2	Datenanalyse	40
3	Ergebnisse	44
3.1	Allgemeines Design der Konstrukte	44
3.2	Etablierung eines geeigneten Replikonsystems	45
3.2.1	Minimales HCV-Konstrukt (pHCV-HiB-NS5B-26AS)	47
3.2.1.1	Spezielle Klonierungsschritte	48
3.2.1.2	HiBiT-Assay	49
3.2.2	Subgenomische Replikons des Hepatitis C Virus	51
3.2.3	5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt	51
3.2.3.1	Spezielle Klonierungsschritte	53
3.2.3.2	HiBiT-Assay	54
3.2.4	5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt	57
3.2.4.1	Spezielle Klonierungsschritte	59
3.2.4.2	HiBiT-Assay	59
3.2.5	SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt	62
3.2.5.1	Spezielle Klonierungsschritte	63
3.2.5.2	HiBiT-Assay	64
3.3	Stille Mutation der seltenen Codons beeinflusst die Replikation	66
4	Diskussion	72

4.1	Entwicklung eines geeigneten Replikonsystems.....	72
4.1.1	pHCV-HiB-NS5B-26AS-Konstrukt.....	73
4.1.2	5'UTR-Core-Konstrukt	74
4.1.2.1	Einfluss von Mutationen in der NS5B-Region auf die Translation	75
4.1.2.2	Keine Detektion von Replikation und Troubleshooting.....	76
4.1.3	Detektion von Replikation im SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt.....	78
4.2	Seltene Codons in der NS5B-Region sind funktionell relevant für die Replikation.....	80
4.3	Limitationen der hier vorgelegten Arbeit.....	85
4.4	Fazit und Ausblick.....	87
5	Zusammenfassung	89
6	Summary.....	90
7	Abkürzungsverzeichnis.....	91
8	Abbildungsverzeichnis.....	94
9	Tabellenverzeichnis	96
10	Literaturverzeichnis	98
11	Anhang.....	112
11.1	Plasmide	112
11.2	Buchstabencode Aminosäuren.....	116
11.3	Deskriptive Statistik und Annahmeprüfungen	117
11.3.1	5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt	117
11.3.2	5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt	118
11.3.3	SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt.....	119
11.4	Post-hoc-Vergleiche SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt.....	121
12	Publikationsverzeichnis	129
13	Ehrenwörtliche Erklärung	130
14	Danksagung	131

1 Einleitung

Eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) führt in der Mehrzahl der Fälle zu einer chronischen Hepatitis C, die mit schweren Leberzellschädigungen einhergeht und die Entwicklung einer Leberzirrhose sowie eines hepatozellulären Karzinoms begünstigt (Webster et al. 2015). Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) zufolge sind weltweit ca. 50 Millionen Menschen von einer chronischen Hepatitis C betroffen. Die höchste Prävalenz findet sich in der WHO-Region Östlicher Mittelmeerraum (engl. *Eastern Mediterranean Region*, EMR), gefolgt von Südostasien und Europa (World Health Organization 2024a).

Bis 2030 strebt die WHO eine Reduktion der Neuinfektionen um 90 % und der krankheitsassoziierten Todesfälle um 65 % an (World Health Organization 2016, 2022). Aufgrund des meist asymptomatischen akuten Krankheitsverlaufs werden HCV-Infektionen allerdings häufig erst nach Chronifizierung und Manifestation von Folgeerkrankungen diagnostiziert (Liu und Kao 2023). Das Zusammenwirken von später Diagnosestellung, hohen Arzneimittelkosten und einem begrenzten Zugang zu medikamentöser Therapie führt wiederum dazu, dass nur wenige der Infizierten erfolgreich behandelt werden, obwohl wirksame antivirale Pharmaka zur Verfügung stehen (World Health Organization 2022). Eine Impfung zur Prävention von Erkrankungen existiert bis heute nicht (World Health Organization 2024a). HCV-Infektionen stellen damit noch immer ein globales Gesundheitsproblem dar und es bedarf u. a. weiterer Forschung, um den Replikationszyklus des Hepatitis C Virus genauer zu verstehen und weltweit Infektionen sowie deren Folgeerkrankungen zu reduzieren.

1.1 Hepatitis C

Als hepatotroper (lat. *hepar*, Leber) Erreger befällt das HCV vorwiegend Leberzellen und kann dort zu einer akuten oder chronischen Hepatitis C führen. Die Inkubationszeit variiert zwischen zwei Wochen und sechs Monaten (World Health Organization 2024b). Die akute Hepatitis C heilt entweder spontan aus (bei 15 – 45 % der Infizierten) oder es kommt zur Chronifizierung der HCV-Infektion (bei 55 – 85 % der Infizierten, Nachweis von HCV-RNA > 6 Monate) (Fasano et al. 2024; World Health Organization 2024b).

Sowohl die akute als auch die chronische Hepatitis C verlaufen meist asymptomatisch oder mit unspezifischen Beschwerden und bleiben daher bis zur Entwicklung von Folgeerkrankungen durch die zunehmende Leberschädigung oft unentdeckt (RKI 2018; Liu und Kao 2023). Knapp ein Drittel der Patienten entwickelt auf dem Boden einer chronischen HCV-Infektion innerhalb von 20 Jahren eine

Leberzirrhose, mit der wiederum auch das Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom stark ansteigt (World Health Organization 2024b). Durch die Induktion von Autoantikörpern und pro-inflammatorischen Signalwegen kann eine chronische Hepatitis C darüber hinaus verschiedene extrahepatische Folgeerkrankungen, v. a. aus dem rheumatischen, endokrinen und hämatologischen Formenkreis, nach sich ziehen (El-Zayadi und Anis 2012; Younossi et al. 2016).

1.1.1 Übertragung

Die HCV-Infektion erfolgt parenteral durch infiziertes Blut oder kontaminierte Blutprodukte. Insbesondere gemeinsam verwendete Injektionsnadeln bei intravenösem Drogenkonsum sind als Hauptinfektionsquelle zu berücksichtigen. Im Gesundheitswesen kann eine Übertragung des HCV durch Nadelstichverletzungen, Transfusion von nicht-kontrollierten Blutprodukten, Hämodialyse oder unzureichende Sterilisation von medizinischen Utensilien erfolgen (Liu und Kao 2023; Fasano et al. 2024). Eine sexuelle Übertragung hingegen ist selten (Fasano et al. 2024). Neben den bereits genannten horizontalen Übertragungswegen ist auch eine vertikale Übertragung von einer HCV-infizierten Mutter auf ihr Neugeborenes möglich. Abhängig von der Viruslast der Mutter liegt das Übertragungsrisiko bei 5 – 7 % und ist peripartal am höchsten (Ferreira und Sheflin-Findling 2025).

1.1.2 Therapie

Im Jahr 2014 wurde die früher interferonbasierte Therapie durch direkt antiviral wirkende Medikamente (engl. *direct-acting antivirals*, DAAs) abgelöst (RKI 2018). Im Gegensatz zu den immunmodulatorisch wirksamen Interferonen greifen die DAAs gezielt an viralen Proteinen an. Zielstrukturen sind die NS3/4A-Protease, das Phosphoprotein NS5A und die NS5B-Polymerase (Sarrazin et al. 2020; Martinello et al. 2023).

Aufgrund der hohen Effektivität und des geringen Nebenwirkungsprofils ist die Behandlung mit DAAs bei jeder replikativen HCV-Infektion, d. h. dem Nachweis von HCV-RNA, indiziert. Lediglich bei einer akuten HCV-Infektion, niedrigem Übertragungsrisiko und hoher Wahrscheinlichkeit einer spontanen Elimination kann zunächst zugewartet werden (Sarrazin et al. 2020). Klassischerweise erfolgt eine Kombinationstherapie mit zwei pangenotypischen DAAs über mehrere Wochen. Die Wirkstoffauswahl und Therapiedauer richten sich u. a. nach der Vortherapie des Patienten und dem Vorhandensein von Komorbiditäten wie einer Leberzirrhose oder Niereninsuffizienz (Sarrazin et al. 2020).

Die Therapie mit DAAs wirkt bei 95 % der Erkrankten kurativ und senkt sowohl das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose als auch eines hepatozellulären

Karzinoms (Martinello et al. 2023; World Health Organization 2024b). Von einem anhaltenden virologischen Ansprechen wird ausgegangen, wenn 12 Wochen nach Therapieabschluss keine HCV-RNA mehr im Patientenserum nachgewiesen werden kann (engl. *sustained virological response at posttreatment week 12, SVR12*) (Sarrazin et al. 2020). Allerdings sind die antiviralen Substanzen kostenintensiv, und viele der Erkrankten haben weder ausreichenden Zugang zu Diagnostik noch zu Therapie. Infolgedessen wurden im Jahr 2022 trotz der hohen therapeutischen Wirksamkeit weltweit nur etwa 20 % der Infizierten medikamentös behandelt (World Health Organization 2024b).

1.2 Hepatitis C Virus

1.2.1 Genetische Variabilität und Klassifikation

Das HCV stellt einen wichtigen Vertreter der Gattung *Hepacivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae* dar (Niepmann et al. 2018). Es zeichnet sich durch eine hohe Mutationsrate und entsprechend große genetische Vielfalt aus (Smith et al. 2013). Ursächlich dafür ist die fehlende Korrekturleseaktivität der RNA-Polymerase, die zu einer hohen Fehlerrate bei der Replikation des Virusgenoms führt. Die ausgeprägte genetische Variabilität erleichtert die Immunevasion, begünstigt die Bildung von Arzneimittelresistenzen und steigert damit die Pathogenität des HCV (Martínez et al. 2012).

Bis heute sind insgesamt sieben Genotypen und 90 Subtypen bekannt, deren Kenntnis früher v. a. für die medikamentöse Therapie relevant war (Smith et al. 2019). Die Genotypen (GT) 1 – 7 unterscheiden sich in Sequenzanalysen des viralen Genoms in 30 – 35 % der Nukleotidsequenz. Weltweit ist GT 1 für die meisten HCV-Infektionen verantwortlich (46 %), gefolgt von GT 3 (30 %). GT 2, 4 und 6 verursachen ca. 23 % der Infektionen, während GT 5 nur eine untergeordnete Rolle spielt (< 1 %) (Messina et al. 2014).

1.2.2 Aufbau

Bei dem HCV handelt es sich um ein behülltes RNA-Virus, dessen Partikelgröße zwischen 40 und 100 nm variiert (Catanese et al. 2013; Lindenbach und Rice 2013). Die Virushülle wird von einer Lipiddoppelschicht der Wirtszelle und den darin integrierten viralen Oberflächenproteinen E1 und E2 (engl. *envelope*) gebildet (Abbildung 1-1A) (Lindenbach und Rice 2013). Von innen ist eine Vielzahl von Core-Proteinen an die Virushülle angelagert. Diese fungieren als Kapsid und umschließen das RNA-Genom (Abbildung 1 1A). Gemeinsam bildet der Komplex das Nukleokapsid (Lindenbach 2013).

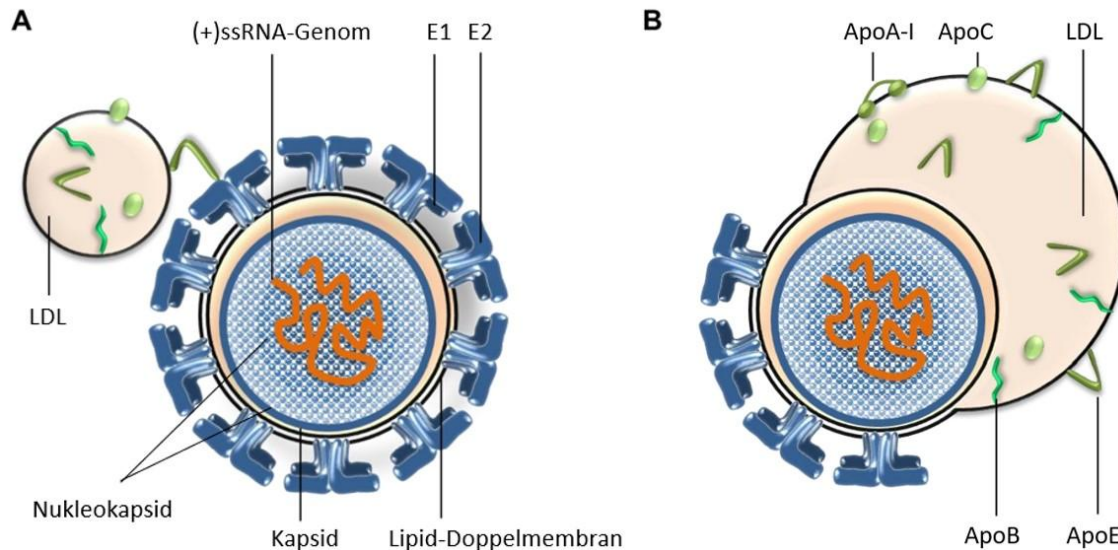


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des lipoviralen Partikels. Das (+)ssRNA-Genom liegt im Inneren des Viruspartikels und wird vom Kapsid umschlossen. Die Virushülle besteht aus einer von der Wirtszelle stammenden Lipiddoppelschicht und den darin integrierten E1/E2 Heterodimeren. Während das Viruspartikel in **(A)** peripher mit Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) und den assoziierten Apolipoproteinen (ApoA-I, ApoB, ApoCs, ApoE) interagiert, zeigt **(B)** das fusionierte „lipovirale“ Partikel. Verändert nach Gerresheim (Gerresheim 2020) (Abdruck mit Genehmigung von G. Gerresheim).

Charakteristisch für die HCV-Partikel ist die Interaktion mit Lipoproteinen niedriger Dichte (engl. *LDL*, *low-density lipoproteins* bzw. *VLDL*, *very low-density lipoproteins*) und den zugehörigen Apolipoproteinen (v. a. ApoA-I, ApoB, ApoC-I, ApoE), wodurch „lipovirale“ Partikel entstehen (Abbildung 1-1B). Diese erfüllen vermutlich zum einen eine Schutzfunktion, indem das Virus weniger zugänglich für neutralisierende Antikörper wird, und erleichtern zum anderen dessen Eintritt in die Wirtszellen (Wrensch et al. 2018; Awadh 2023).

1.2.2.1 Genom

Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das ca. 9,6 kb umfassende einzelsträngige RNA-Genom mit positiver Polarität (Niepmann et al. 2018; Moradpour und Penin 2013). Bei (+)ssRNA-Viren entspricht die Ribonukleinsäure in ihrer Nukleotidsequenz in Leserichtung der mRNA (engl. *messenger RNA*), sodass das Genom direkt nach Eintritt in die Wirtszelle translatiert werden kann.

Das HCV-Genom zeichnet sich durch einen langen offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) aus, der für ein einzelnes Polyprotein codiert und zu beiden Seiten von nicht-translatierten Regionen (engl. *untranslated regions*, UTR) flankiert wird (Abbildung 1-2) (Niepmann und Gerresheim 2020). Kennzeichnend für die nicht-translatierten Regionen ist die Ausbildung von hochkonservierten Haarnadelschleifen (engl. *stem-loops*, SL) als Sekundärstruktur, die an der Regulation der Translation und Replikation des HCV beteiligt sind (Niepmann und Gerresheim 2020; Paul et al. 2014).

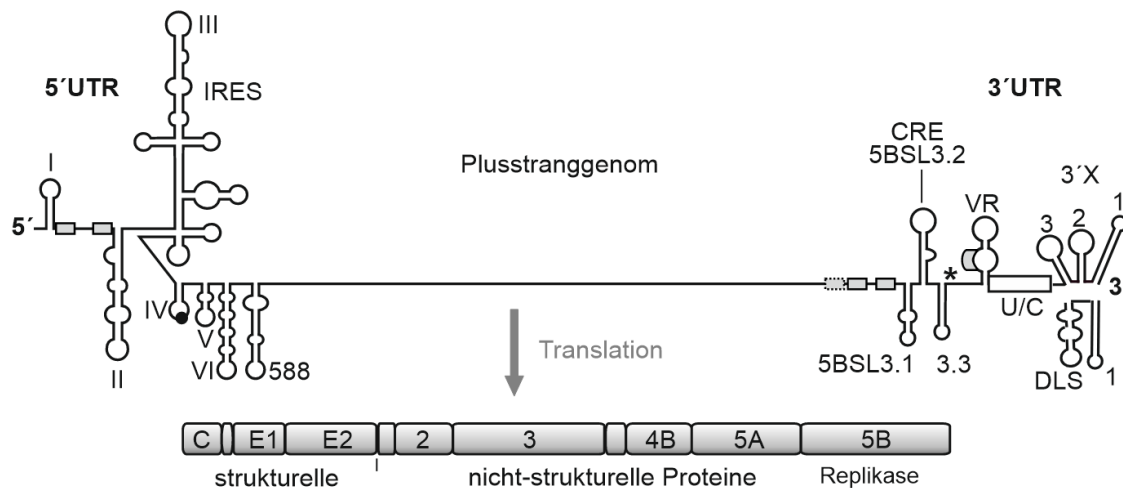


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des HCV-Genoms. Der offene Leserahmen (ORF) des HCV-Genoms codiert für ein einzelnes Polyprotein, das co- und posttranslational in die strukturellen (Core, E1, E2) und nichtstrukturellen Proteine (p7, NS2 – NS5B) prozessiert wird. Das Stoppcodon des ORFs ist mit einem Sternchen (*) markiert. Sowohl das 3' als auch das 5' Ende des ORFs wird von nicht-translatierten Regionen (3'UTR, 5'UTR) eingefasst. Die UTRs enthalten zahlreiche prominente Schleifenelemente als Sekundärstrukturen, die für die Regulation der Translation und Replikation von Bedeutung sind. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des HCV ist in der 5'UTR lokalisiert und stimuliert die Translation des Polyproteins. In der 3'UTR sind die variable Region (VR), der poly-U/C-Trakt (U/C) und der 3' X-Schwanz (3'X) als *cis*-regulatorische Elemente hervorgehoben. Das *cis*-replication element (CRE) befindet sich mit 5BSL3.1, 5BSL3.2 und 5BSL3.3 in der NS5B codierenden Region. Die Zielsequenzen der microRNA-122 in der 5'UTR und der NS5B-Region sind mit kleinen Boxen gekennzeichnet. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

Die 5'UTR zeichnet sich durch vier hochkonservierte Schleifenelemente aus (Shi und Lai 2006). Während SL I und SL II von wesentlicher Bedeutung für die HCV Replikation sind, bilden SL II – IV zusammen mit einigen Nukleotiden der Core-Region die interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. *Internal ribosome entry site*, IRES), die für die cap-unabhängige Translation essentiell ist (Niepmann und Gerresheim 2020). Die 3'UTR wird strukturell in eine variable Region (VR), den poly-Uracil/Cytosin-Trakt (p(U/C)) und den 3'X-Schwanz (3'X) unterteilt. Sowohl der 3'X-Schwanz als auch ein kleiner Teil des p(U/C) sind wesentlich an der Stimulation der HCV-Replikation beteiligt (Niepmann et al. 2018; Liu et al. 2009). Die 3'X-Region kann dabei in zwei dynamisch ineinander übergehenden Konformationen vorliegen, die sich in der Anzahl der Schleifenstrukturen unterscheiden (Ivanyi-Nagy et al. 2006; Romero-López und Berzal-Herranz 2017). Insbesondere die Konformation mit zwei Haarnadelschleifen, bestehend aus SL 1 und der DLS (engl. *dimerization linkage sequence*), ermöglicht potenziell eine funktionelle Dimerisierung des HCV-Genoms und fördert dadurch die Replikation (Masante et al. 2015).

In der NS5B codierenden Region sind die konservierten Domänen 5BSL3.1, 5BSL3.2 und 5BSL3.3 als funktionell relevant hervorzuheben. 5BSL3.2 gilt als *cis*-wirkendes Replikationselement (engl. *cis-replication element*, CRE) (You et al. 2004), wobei insbesondere die als „kissing loop“ bezeichnete Interaktion von 5BSL3.2 mit SL 2

des 3'X-Schwanzes essentiell für die Stimulation der HCV-Replikation ist (Friebe et al. 2005). Darüber hinaus trägt 5BSL3.2 durch eine weitreichende RNA-RNA-Interaktion mit Subdomäne SL IIId der IRES zu einer funktionellen Zirkularisierung des HCV-Genoms bei, die sowohl für die Replikation als auch für die Translation von Bedeutung ist (Romero-López et al. 2018; Romero-López und Berzal-Herranz 2017). Durch die Bindung der ribosomalen 40S Untereinheit (40S UE) sind die Domänen 5BSL3.1 und 5BSL3.3 vermutlich ebenfalls an der Regulation der Translation beteiligt (Romero-López et al. 2018).

Auch die Interaktion mit der leberspezifischen microRNA-122 (miRNA-122) ist für die Translation und Replikation des HCV von Bedeutung (Jopling et al. 2005; Henke et al. 2008). Während microRNAs i. d. R. zur Degradation der gebundenen mRNA führen, stabilisiert die Bindung von microRNA-122 das HCV-Genom und fördert die Virusausbreitung (Shimakami et al. 2012). Sowohl in den nicht-translatierten Regionen als auch in der NS5B-Region sind mehrere Zielsequenzen bekannt (Gerresheim et al. 2017) (Abbildung 1-2, Boxen).

1.2.2.2 Virale Proteine

Der offene Leserahmen des HCV-Genoms codiert für ein einzelnes Polyprotein, das co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in die einzelnen reifen Proteine zerlegt wird (Bartenschlager et al. 1994; Pietschmann et al. 2001). Die Hüllproteine E1 und E2 sowie das Core-Protein (C) zählen zu den strukturellen Proteinen und sind wesentliche Bestandteile des Viruspartikels (Abbildung 1-1). Die Glykoproteine E1 und E2 bilden Heterodimere auf der Virusoberfläche und ermöglichen über rezeptorvermittelte Endozytose den Eintritt in die Zellen (Lindenbach und Rice 2013). Das Core-Protein umschließt als Kapsid die HCV-RNA und interagiert darüber hinaus mit Lipidtröpfchen und NS5A zur Bildung der lipoviralen Partikel (Lindenbach 2013; Boulant et al. 2007; Masaki et al. 2008; Vieyres und Pietschmann 2019).

Die nicht-strukturellen Proteine erfüllen abhängig von ihren Interaktionspartnern eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen im Replikationszyklus des HCV. Das Viroporin p7 bildet innerhalb von Lipidmembranen hexa- oder heptamere Komplexe und dient in der Form als Kationenkanal (Clarke et al. 2006; Luik et al. 2009; Chen et al. 2018). Unabhängig von dem genauen Mechanismus gilt es genauso wie NS2 als essentiell für die Verpackung und Freisetzung der Virionen (Chen et al. 2018; Steinmann et al. 2007; Jones et al. 2007). Die Proteasen NS2 und NS3 katalysieren gemeinsam mit NS4A als Cofaktor die Prozessierung des Polyproteinvorläufers und führen zur Freisetzung der nicht-strukturellen Proteine NS2 – NS5B (Grakoui et al. 1993; Bartenschlager et al. 1995; Bartenschlager et al. 1994; Failla et al. 1994). NS3 weist

neben der Proteaseaktivität auch eine NTPase/RNA-Helikaseaktivität auf, die bei der Initiation der Replikation relevant ist (Yao et al. 1999; Raney et al. 2010). NS4B induziert durch seine Oligomerisierung vermutlich die Vesikelbildung in der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) der Wirtszelle und ist damit allen voran für die Bildung des membranösen Netzes von Bedeutung, in dem die virale Replikation geschützt ablaufen kann (Egger et al. 2002; Paul et al. 2011; Gouttenoire et al. 2010). Das Phosphoprotein NS5A dimerisiert und ist durch seine unterschiedlichen Domänen (D) sowohl an der RNA Replikation (D1, D2) als auch an der Verpackung der Virionen (D3) beteiligt (Appel et al. 2008; Zayas et al. 2016; Shanmugam et al. 2018). Die NS5B RNA-abhängige RNA-Polymerase stellt das Schlüsselenzym der Replikation dar (Behrens et al. 1996; Lohmann et al. 1997). Ausgehend von einem positiv-orientierten RNA-Template katalysiert sie die Synthese eines komplementären Minusstrangs, von dem aus wieder neue Plusstränge generiert werden können (Lohmann 2013). Sowohl für NS5A als auch für NS5B gibt es Indizien für eine funktionelle Oligomerisierung (Shanmugam et al. 2018; Clemente-Casares et al. 2011; Wang et al. 2002). Kennzeichnend für den Replikationskomplex des HCV und damit auch für alle beteiligten Proteine ist die Assoziation mit intrazellulären Lipidmembranen (Romero-Brey und Lohmann 2016; Awadh 2023).

1.3 Replikationszyklus des HCV

Das (+)ssRNA-Genom wird unmittelbar nach dem Eintritt in die Wirtszelle freigesetzt und an den Ribosomen im Zytosol translatiert (Niepmann 2013). Die entstehenden Polyproteinvorläufer werden co- und posttranslational in die einzelnen strukturellen und nicht-strukturellen Proteine gespalten, die für die anschließende Vermehrung des Virusgenoms benötigt werden (Bartenschlager et al. 1994). Während ein Teil der eingegangenen Plusstränge degradiert, wird von den überlebenden unter Katalyse der NS5B-Polymerase jeweils ein komplementärer Minusstrang gebildet, der als Matrize für neue Plusstränge dient. Die Tochterstränge durchlaufen entweder den Translations- und Replikationszyklus erneut oder werden zu neuen Viruspartikeln gepackt und aus der Zelle ausgeschleust (Lohmann 2013; Vieyres und Pietschmann 2019).

1.3.1 Translation

Im Unterschied zur zellulären eukaryotischen Proteinbiosynthese wird hier für die Initiation der Translation keine 5'-Cap-Struktur benötigt, sondern nur die HCV-IRES (Tsukiyama-Kohara et al. 1992; Wang et al. 1993; Niepmann und Gerresheim 2020). Von SL III_d, e, f und IV der IRES wird ein Pseudodoppelknoten (engl. *pseudoknot*) als

Sekundärstruktur gebildet, der zur Bindung der 40S UE und zur korrekten Positionierung des HCV-Genoms mit seinem AUG-Startcodon im mRNA-Bindungstunnel beiträgt (Berry et al. 2010; Wang et al. 1993).

An der Förderung der Translation sind die 3'UTR, *cis*-regulatorische Elemente der NS5B-codierenden Region (5BSL3.1, 5BSL3.2, 5BSL3.3), verschiedene zelluläre RNA-Bindungsproteine und die miRNA-122 beteiligt. Eine Stimulation durch die 3'UTR in *cis* stellt dabei wohl über End-zu-End-Interaktion mit der 5'UTR sicher, dass nur vollständig intakte RNAs translatiert werden (Niepmann und Gerresheim 2020; Edgil und Harris 2005).

1.3.2 Replikation

Die Vermehrung des Virusgenoms findet an Replikationskomplexen im Zytosol statt. Aktive Replikationskomplexe bestehen jeweils aus einem Minusstrang, mehreren Plusstrangkopien, Wirtszellfaktoren und Hunderten bis Tausenden viralen nicht-strukturellen Proteinen, die mit zellulären Lipidmembranen assoziiert sind (Lohmann 2013; Quinkert et al. 2005). Insbesondere NS3 – NS5B induzieren den Umbau von Membranen des ERs zu vesikulären Strukturen, die die Replikationskomplexe beherbergen und so vermutlich vor zellulären Proteasen und Nukleasen schützen (Egger et al. 2002; Lohmann 2013). Diese charakteristischen Membranansammlungen werden als membranöses Netz (engl. *membranous web*) bezeichnet (Egger et al. 2002).

Das Schlüsselenzym der Replikation ist die NS5B-Polymerase, die sowohl für die Minus- als auch für die Plusstrangsynthese verantwortlich ist (Lohmann et al. 1997). Die NS5B-Replikase besteht aus einer katalytischen Domäne, einer Linker-Sequenz und einem C-terminalen Membrananker (Lohmann 2013; Harrus et al. 2010). Nach der Bindung des RNA-Templates initiiert sie die RNA-Synthese in der Regel *de novo* durch die Bildung eines zum 3'-Ende komplementären Dinukleotidprimers (Ferrari et al. 2008). Das 3'-Ende des Minusstrangs stellt durch seinen einzelsträngigen Überhang ein ideales Template zur *de novo* Initiation dar, wohingegen sich das 3'-Ende des Plusstrangs durch die ausgeprägten Schleifenelemente weniger gut eignet (Lohmann 2013). Der Initiationskomplex besteht nur aus dem einzelsträngigen RNA-Template und einem Dinukleotidprimer und ist entsprechend fragil (Lohmann 2013). Die RNA-Bindung und die Initiation der Replikation durch die NS5B-Polymerase gelten *in vitro* als langsame und ineffiziente Vorgänge, wohingegen die nachfolgende Elongation sehr effizient abläuft und das gesamte Genom in einem Durchgang repliziert werden kann (Lohmann 2013).

Die Regulation der Replikation erfolgt maßgeblich durch die *cis*-agierenden Replikationselemente. Wichtige Elemente finden sich in der 3'UTR und der NS5B

codierenden Region des Plusstrangs (CRE) sowie in der 5'UTR des Minusstrangs (Lohmann 2013). Insbesondere die 3'UTR des Plusstrangs und die „kissing loop“-Interaktion mit dem stromaufwärts gelegenen CRE (5BSL3.2) in der NS5B-Region sind für die Initiation und Regulation der Minusstrangsynthese essentiell (Lohmann 2013; You und Rice 2008). Dabei kann die NS5B-Polymerase auch direkt an das CRE (5BSL3.2) binden (You et al. 2004; Lee et al. 2004). Auch die Interaktion mit viralen und zellulären Proteinen ist an verschiedenen Schritten der RNA-Synthese und der Bildung des membranösen Netzes von Bedeutung (Romero-Brey und Lohmann 2016). Über das genaue Zusammenspiel ist allerdings bislang wenig bekannt.

1.3.3 Replikons zur Untersuchung von Translation und Replikation

Zur Analyse des Replikationszyklus des HCV in Zellkultur wurden in den vergangenen Jahren für mehrere Genotypen verlässliche, genomische *full-length* (engl. = volle Länge) und subgenomische RNA-Replikons entwickelt (Lohmann et al. 1999; Khan et al. 2020). Subgenomische Replikons enthalten nicht das gesamte virale Genom, aber mindestens die Sequenzen für die RNA-Strukturelemente und Proteine, die für die Replikation essentiell sind (d. h. UTRs, NS3 – NS5B) (Lohmann et al. 1999; Khan et al. 2020). Dadurch können die *in vitro* transkribierten RNAs nach der Transfektion in geeignete Wirtszellen translatiert werden und selbstständig intrazellulär replizieren.

Die Translation der integrierten Proteine wird in monocistronischen Replikons einzig durch die HCV-IRES reguliert. In bicistronischen Replikons hingegen wird die Translation der nicht-strukturellen Proteine üblicherweise von den Funktionen der HCV 5'-UTR entkoppelt durch die Enzephalomyocarditis (EMCV)-IRES gesteuert (Khan et al. 2020). Um die Translation und Replikation der RNAs zu detektieren, können Reporter- und/ oder Resistenzgene eingebaut werden (Khan et al. 2020). Insertionen zwischen der Core und NS3 codierenden Region sowie innerhalb von NS5A wurden bereits toleriert, ohne den Replikationszyklus wesentlich zu beeinträchtigen (Reiss et al. 2011; Moradpour et al. 2004).

Zur Untersuchung der intrazellulären Replikation des HCV-Genoms bietet sich das Arbeiten mit subgenomischen Replikons besonders an. Zum einen können diese im Vergleich zu *full-length* Replikons durch Mutationen besser an die Bedingungen in Zellkultur angepasst werden und dort effizienter replizieren (Lohmann et al. 2001). Lediglich für das JFH1-Isolat des Genotyps 2a konnte bislang auch ohne adaptive Mutationen eine effiziente Replikation *in vitro* und in Zellkultur detektiert werden (Kato et al. 2003). Zum anderen können subgenomische Replikons mangels der codierenden Sequenzen für Strukturproteine keine infektiösen Virionen bilden, sodass keine Gefahr der Übertragung besteht und das Arbeiten mit ihnen auch in Laboren der

Sicherheitsstufe 1 gestattet ist (Khan et al. 2020; Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) 2003).

In der Arbeitsgruppe (AG) Niepmann wurden bereits mehrere bicistronische subgenomische HCV-Replikons von L. Shalamova etabliert (Shalamova 2019). Diese enthalten die beiden UTRs und die codierenden Regionen für NS3 – NS5B (aus JFH1) ± Core-Protein (aus J6) des chimären J6/JFH1 *full-length* HCV-Genoms (Jc1; Übergang zwischen den Isolaten innerhalb von NS2), das in Zellkultur besonders effizient replizieren kann (Pietschmann et al. 2006). Um Rückschlüsse auf die Replikation zu ziehen, wurden die Konstrukte sowohl in einer replikationsfähigen als auch einer als Negativkontrolle dienenden, replikationsdefizienten Variante erstellt (Shalamova 2019). In letzterer führt die Punktmutation 318D → N (GND) zur vollständigen Inaktivierung des aktiven Zentrums der NS5B-Replikase, sodass die RNAs nicht mehr selbstständig replizieren können (Lohmann et al. 1997). Nach Transfektion in Huh-7.5 Hepatomzellen zeigten die replikationsdefizienten „GND“-Varianten weder Minus- noch Plusstrangsynthese und eigneten sich somit als Negativkontrolle (Shalamova 2019). Für die replikationsfähigen „GDD“-Varianten hingegen konnte sowohl Plus- als auch Minusstrangsynthese beobachtet werden, sodass von einer funktionalen Translation und Replikation ausgegangen werden kann. Insbesondere für die Konstrukte SLI-III und 5'UTR-Core konnte eine deutliche Synthese von viralen Proteinen sowie Plus- und Minussträngen detektiert werden (Shalamova 2019), weshalb die beiden Konstrukte im Laufe dieser Arbeit zur Untersuchung des Ribosome Pausing verwendet wurden.

1.4 Ribosome Pausing

Ribosome Pausing beschreibt das Phänomen, dass Ribosomen während der Translation kurz auf der RNA pausieren, wodurch die weitere Proteinbiosynthese verzögert wird. Die Verlangsamung der Translation ermöglicht die cotranslationale Faltung, Markierung und/oder Interaktion des entstehenden Polypeptids mit anderen Proteinen oder Membranen und stellt damit vermutlich einen evolutionär erwünschten Regulationsprozess dar (Collart und Weiss 2020; Sabi und Tuller 2017). Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit nehmen die Sequenz und Struktur der RNA, der zelluläre tRNA-Pool und die Aminosäuresequenz der wachsenden Polypeptidkette selbst (Collart und Weiss 2020).

Die Aminosäuresequenz des entstehenden Polypeptids kann die Translation u. a. durch die Blockade des enzymatischen Zentrums der Ribosomen wesentlich beeinflussen (Sabi und Tuller 2017). Insbesondere Di- oder Tripeptidsequenzen aus mehreren aufeinanderfolgenden Prolinen (P) oder Argininen (R) werden häufig im

Zusammenhang mit Ribosome Pausing beobachtet (Schuller und Green 2018; Sabi und Tuller 2017). Prominente RNA-Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen und Pseudoknoten oder repetitive RNA-Abschnitte können als Hindernisse ebenfalls zu einer Verzögerung der Translation führen (Schuller und Green 2018; Meydan et al. 2017).

Darüber hinaus wird die Translationseffizienz auch durch die zelluläre tRNA-Verfügbarkeit sowie durch die Nutzung von unterschiedlichen, für die gleichen Aminosäuren codierenden Triplets moduliert (Schuller und Green 2018; Yu et al. 2015; Aguilar Rangel et al. 2024). 18 von 20 Aminosäuren des genetischen Codes werden von mehreren Triplets codiert, die allerdings nicht alle mit der gleichen Effizienz von den Ribosomen decodiert werden (Quax et al. 2015; Aguilar Rangel et al. 2024). Die meisten Organismen verfügen nicht über ein vollständiges Set von tRNAs, um jedes Codon mit einer jeweils eigenen tRNA erkennen zu können. Zur Decodierung der fehlenden sind sie auf eine lockerere Paarung von Codon und Anticodon angewiesen, die typischerweise an der dritten Stelle des Codons von der klassischen, von Watson und Crick beschriebenen Basenpaarung abweicht. Der Mechanismus wird als „Wobble“-Basenpaarung bezeichnet (Crick 1966).

Aufgrund der geringeren Bindungsaffinität der Basen zueinander ist die Erkennung von Codons über Wobble allerdings weniger effizient und kann so zu einer Verlangsamung der Translation führen (Quax et al. 2015; Wang et al. 2017; Nakamura et al. 2000; Aguilar Rangel et al. 2024). Dabei sind zum Beispiel diejenigen Codons, die an der dritten Position ein A, C oder U enthalten, die also mit Inosin in der tRNA paaren können, aus sterischen Gründen unterschiedlich effizient. Diejenigen, die dabei ein C in der dritten Position haben, sind immer effizienter als diejenigen mit A oder U (Sabi und Tuller 2014; Curran 1995), wohl weil C eine etwas stabilere Bindung mit Inosin eingeht als U oder A. Darüber hinaus spielt jeweils die intrazelluläre Abundanz der tRNAs eine Rolle (Dong et al. 1996; Zhang und Ignatova 2011). Solche Codons, für die der Zelle keine oder nur wenige spezifisch korrespondierende tRNAs zur Verfügung stehen oder/und die aus sterischen Gründen weniger effizient sind, werden im Folgenden als selten (engl. *rare*) bzw. ineffizient bezeichnet.

Seltene Codons sind dabei nicht überall zufällig im Genom verteilt, sondern finden sich gehäuft strangabwärts von Regionen, die für einzelne Domänen in Multidomänen-Proteinen codieren. Um die Translation dort gezielt zu entschleunigen, scheinen funktionell relevante Cluster aus seltenen Codons im Genom konserviert zu sein (Zhang und Ignatova 2011). Stille Mutationen dieser seltenen zu effizienten Codons können zu einer verminderten Löslichkeit oder Aktivität des codierten Proteins führen (Komar et al. 1999; Kimchi-Sarfaty et al. 2007; Yu et al. 2015). In mehreren proteincodierenden Regionen des HCV wurden bereits statistisch relevante Cluster von

seltene Codons detektiert (Core, NS2, NS3, NS4B, NS5A, NS5B), die funktionell von Bedeutung sein könnten (Fattahi et al. 2014).

1.4.1 Ribosome Pausing des HCV

Durch Ribosome Profiling Experimente von G. Gerresheim konnten Indizien für Ribosome Pausing auf der HCV-RNA identifiziert werden (Gerresheim 2020). Beim Ribosome Profiling werden die Fragmente des Genoms sequenziert, die zum Zeitpunkt der Zelllyse mit Ribosomen besetzt sind, also i. d. R. translatiert werden (Ingolia et al. 2009). Da die Ribosomen auf Pausing-Sequenzen länger verweilen, sind die zugehörigen RNA-Fragmente mit einer größeren Wahrscheinlichkeit von Ribosomen bedeckt und diese Sequenzen somit überrepräsentiert, was sich in der Auswertung als Peaks äußert. Die Ribo-Seq Daten des HCV-Plusstrangs zeigen drei prominente Peaks an den Positionen 1980, 3100 und nahe des Stoppcodons des ORFs. Letzterer der drei Peaks hebt sich durch seine Größe von den anderen beiden ab (Abbildung 1-3B).

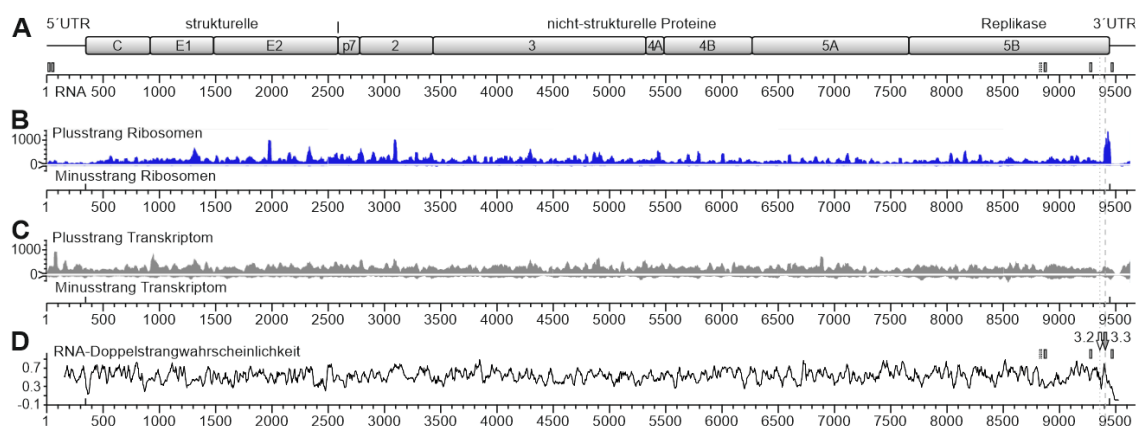


Abbildung 1-3: Ribosome Profiling des HCV Genoms in Huh-7.5 Hepatomzellen. (A) (+)ss HCV-RNA-Genom mit den nicht-translatierten Regionen zu beiden Genomenden und dem eingerahmten offenen Leserahmen für die viralen, strukturellen und nichtstrukturellen Proteine. Die Skala bezieht sich auf die Nukleotidsequenz des für das Ribosome Profiling genutzten Jc1-Klons. (B) zeigt die Ergebnisse des Ribosome Profilings von Ribosomen des Plus- und Minusstrangs, (C) die Transkriptomreads des HCV-Plus- und Minusstrangs als Kontrolle und (D) die Doppelstrangwahrscheinlichkeit des Plusstrang-RNA-Genoms. Die Pfeile deuten auf die beiden Schleifenelemente 5BSL3.2 (weißer Pfeil) und 5BSL3.3 (grauer Pfeil) innerhalb der NS5B-Region und zeigen deren Nähe zu dem Peak im Bereich des Stoppcodons. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

In den Transkriptomreads zeigt sich aber kein korrespondierender Peak (Abbildung 1-3C), sodass im Bereich des Peaks am Stoppcodon von einer erhöhten Ribosomendichte auf der HCV-RNA ausgegangen werden kann. Betrachtet man die umliegende RNA-Sequenz, findet sich dort weder strangaufwärts eine Anhäufung von klassischen Pausing-Aminosäuren noch strangabwärts eine starke Sekundärstruktur bzw. Doppelstrangwahrscheinlichkeit, die für das Pausieren der Ribosomen verantwortlich sein könnte (Abbildung 1-3D). Das Schleifenelement 5BSL3.3 könnte zwar aufgrund seiner Position als Ursache in Betracht gezogen werden, liegt während

der Translation allerdings genau an der Stelle eines ribosomalen Peaks und damit ungefaltete vor (Abbildung 1-3 grauer Pfeil) (Gerresheim et al. 2020).

Bei genauerer Betrachtung des Peaks ist zu erkennen, dass es sich nicht um einen, sondern um zwei etwas überlappende Peaks handelt (Abbildung 1-4A). Während sich im Zentrum des strangabwärts gelegenen Peak 1 das Stoppcodon des ORFs befindet, sitzt der strangaufwärts gelegene Peak 2 mittig auf einem seltenen Valincodon (Position 9407- Diamant-Symbol).

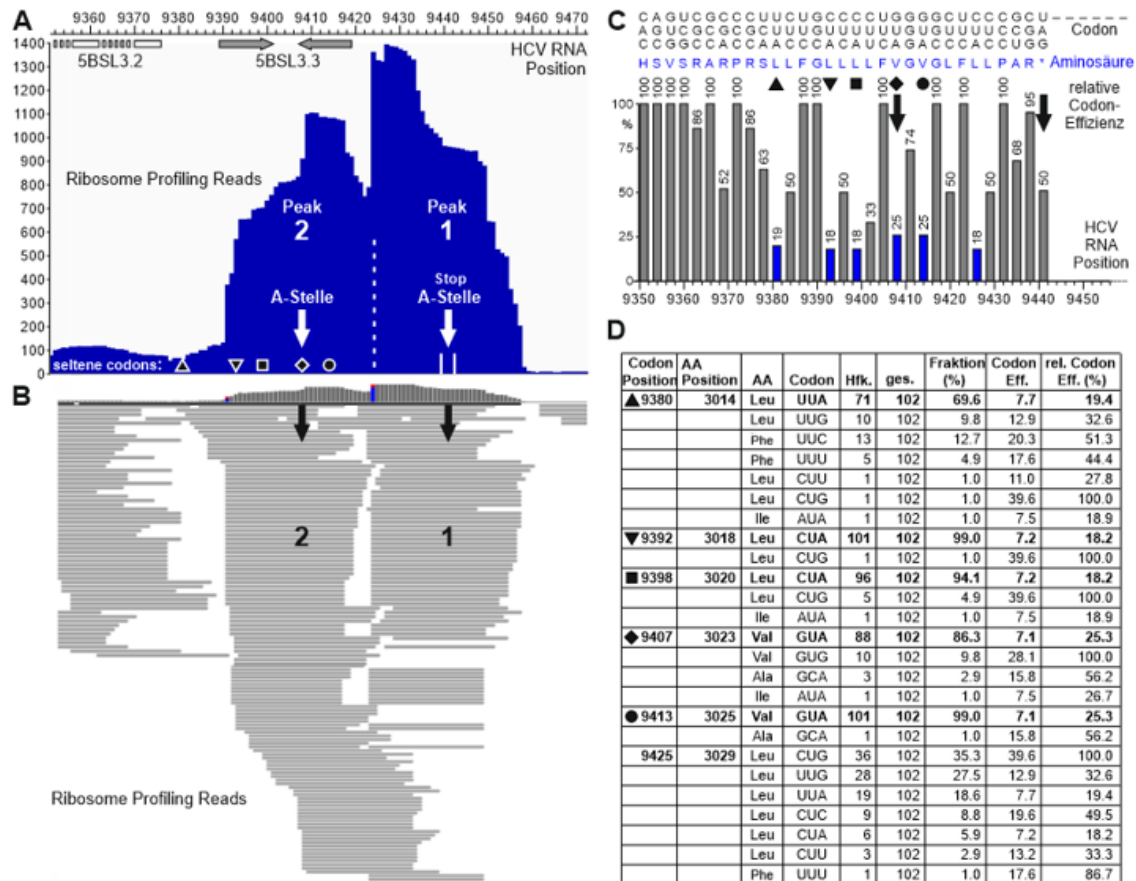


Abbildung 1-4: Ribosome Pausing in der NS5B-Region. (A) stellt den Ausschnitt der Ribosome Profiling Reads der Ribosomen des Plusstrangs am Ende der NS5B codierenden Region dar. Es zeigt sich ein Peak über dem Stoppcodon (Peak 1) und ein zweiter strangaufwärts gelegener Peak über einem seltenen Valincodon (Peak 2). Die weißen Pfeile markieren das Zentrum des jeweiligen Ribosoms. Die seltenen Codons sind als schwarze Symbole eingezeichnet. Im Zentrum von Peak 2 fallen das seltene Valincodon (Diamant) und strangaufwärts mehrere seltene Leucincodons (Dreiecke, Quadrat) auf. Die Positionen der Schleifenelemente 5BSL3.2 (weiße Blöcke) und 5BSL3.3 (graue Pfeile) sind in der Skala der Nukleotidsequenz des HCV-Genoms eingezeichnet. (B) zeigt einen Ausschnitt der einzelnen Reads im Bereich der beiden Peaks. In (C) sind von oben nach unten die translatierten Codons inklusive ihrer korrespondierenden Aminosäuren (Einbuchstabencode in blau) und relative Codoneffizienz (gemäß der menschlichen Codon Usage Tabelle) dargestellt (z.B. 5'-CAC-3', codierend für Histidin (H) mit einer relativen Codoneffizienz von 100 %). Wie auch in (A) sind die seltenen Codons durch schwarze Symbole gekennzeichnet und die zentral in den ribosomalen Peaks gelegenen Codons mit schwarzen Pfeilen hervorgehoben. (D) zeigt die Nutzung von seltenen Codons in verschiedenen HCV-Isolaten. Dazu wurde das Genom von 102 repräsentativen HCV-Isolaten aller Genotypen und Subtypen analysiert. Veranschaulicht ist, wie häufig (Häufigkeit, „Hfk.“) ein bestimmtes Codon unter allen (gesamt, „ges.“) HCV-Isolaten gefunden wurde. Die Effizienz der Codons ist der Datenbank für Codonverwendung für *Homo sapiens* entnommen (Nakamura et al. 2000). Die relative Codoneffizienz ergibt sich, indem die Effizienz des jeweiligen Codons ins Verhältnis zu der des effektivsten Codons der vorliegenden Aminosäure gesetzt wurde. Die seltenen Codons sind wieder durch schwarze Symbole gekennzeichnet. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

Auch zwischen den beiden Peaks flacht das Ribo-Seq-Profil des Plusstrangs nicht vollständig ab, was darauf hinweisen könnte, dass die Ribosomen bei der Translation, gebremst von Peak 2, langsam zu Peak 1 hinübergleiten (Abbildung 1-4B). Beachtet man die RNA-Sequenz, finden sich im Bereich von Peak 2 mehrere seltene Valin- und Leucincodons (Position 9392- Dreieck-Symbol, 9398- Quadrat-Symbol, 9407- Diamant-Symbol, 9413- Kreis-Symbol), die mit geringer Effizienz decodiert werden und darüber die Ribosomen bereits kurz vor dem Stoppcodon ausbremsen könnten (Abbildung 1-4C). Sowohl die seltenen Codons strangaufwärts von Peak 2 als auch das zentrale Valincodon sind unter den HCV-Isolaten hochkonserviert (Abbildung 1-4D), sodass angenommen werden kann, dass sie für die Termination der Translation und/oder Initiation der Replikation funktionell relevant sein könnten.

1.5 Zielsetzung

Aufbauend auf den Ergebnissen des Ribosome Profilings sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der seltenen Codons in der NS5B-Region auf die Translation und Replikation des HCV analysiert werden. Mit der Hypothese, dass die stille Mutation der konservierten seltenen (ineffizienten) Codons zu effizienten Triplets die verlangsamte Termination der Translation stört (Kimchi-Sarfaty et al. 2007), wurden verschiedene Replikons konstruiert. Zur Mutation der konservierten seltenen Triplets wurden überwiegend häufige (engl. *common*; *com*), also effiziente Codons, verwendet, die auch natürlicherweise in HCV-Isolaten vorkommen, und die Aminosäuresequenz nicht verändert (Abbildung 1-4D). Auch die betroffenen RNA-Sekundärstrukturen sollten so in den entsprechenden Mutanten intakt belassen werden. Potenzielle Auswirkungen auf den viralen Replikationszyklus konnten dadurch isoliert auf die stillen Mutationen zurückgeführt werden. Als Kontrolle dienten Replikons, bei denen durch Missense-Mutationen sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Sekundärstruktur von 5BSL3.3 verändert wurden. Zur Detektion der Effekte auf den viralen Replikationszyklus wurden die Replikons in Huh-7.5 Hepatomzellen transfiziert und die Translations- und Replikationseffizienz des Wildtyps gegenüber der der Mutanten über HiBiT-Translationsreporter-Assays zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert und verglichen.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Costar UV Platten (96 Well)	Sigma-Aldrich
Filter Tips (20 - 1250 µl)	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Phase Lock Gel™ Heavy	VWR
Pipettenspitzen (10 - 1250 µl)	Sarstedt
Qubit™ Assay Tubes	Sarstedt
SafeSeal Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Schraubröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml - 50 ml)	Sarstedt
Tubes 5 ml	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² - 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 well, 12 well, 24 well)	Sarstedt

2.1.2 Wiederverwendbare Materialien

Tabelle 2-2: Verwendete wiederverwendbare Materialien

Materialien	Hersteller
Erlenmeyerkolben	Duran
Glasflaschen (50 ml – 2000 ml)	Duran
PPCO-Zentrifugenflaschen	Nalgene™

2.1.3 Geräte

Tabelle 2-3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti JXN-26 Centrifuge, Rotoren JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter
Bakterien-Inkubator Certomat® H	Braun
Bi-Destille, Destamat	Heraeus
Biophotometer	Eppendorf

Blue Light Transilluminator	Syngene
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Elektrophorese Netzgerät, EPS 500/400	Pharmarcia Fine Chemicals
Fluorometer Qubit™	Invitrogen
Geldokumentationssystem, GelDoc XR	Bio-Rad
Gel-Elektrophoresekammern	Von Keutz
Heizblock, Accublock™ Digital Dry Bath	Labnet
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Kippschüttler DuoMax1030	Heidolph Instruments
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Lumat LB 9501 Single Tube Luminometer	Berthold
Mikroskop, Leica DM IL invers	Leica Microsystems
Mikrowelle	Severin
Mixing Block MB-102	BIOER
Pipetboy	Integra
Pipetten (2 µl - 1000 µl)	Gilson
Platteninkubator B15	Thermo Scientific
Sterile Bank, Lamin Air HA 2448 BS	Heraeus
Tecan infinite M200 multimode reader	Tecan
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C	Eppendorf
Ultrazentrifuge LE-80K	Beckman
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Waage	Kern/ Sartorius
Zählkammer, Neubauer-improved (0,1 mm Tiefe)	Superior Marienfeld

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenz	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
Borsäure, ≥ 99,8 %	Carl Roth
Bromphenolblau	FlukaChemie
CaCl ₂ , ≥ 98 %	Carl Roth
DTT	Gerbu
EDTA, ≥ 99 %	Carl Roth
Ethanol vergällt, ≥ 99,6 %	Carl Roth

Ethanol reinst 96 %	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FBS (Fötales Kälberserum)	Thermo Scientific
Formamid	Merck
Glycerin, $\geq 99,5$ %, p.a., wasserfrei	Carl Roth
Glycin, ≥ 99 %	Carl Roth
Isopropanol, $\geq 99,5$ %	Carl Roth
Kaliumacetat	Merck
Lipofectamine 2000	Invitrogen
MgCl ₂ , 25 mM	NEB
NaCl, ≥ 99 %	Carl Roth
Natriumacetat, ≥ 99 %	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
PBS, 10x	Carl Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich/Carl Roth
SYBR TM Gold Nucleic Acid Gel Stain	Invitrogen
Trypsin, 0,5 % Trypsin-EDTA 10x	Gibco
Xylencyanolblau	Carl Roth
Zellproliferationsreagenz WST-1	Sigma-Aldrich

2.1.5 Kit-Systeme

Tabelle 2-5: Verwendete Kit-Systeme

Kit	Hersteller
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific
Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System	Promega
Qubit TM Assay Kits	Thermo Scientific

2.1.6 Puffer

Tabelle 2-6: Verwendete Puffer

Puffer	Endkonzentration	Ansatz
DNA-Probenpuffer	75 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 8,0) Bromphenolblau und Xylencyanol	Für 20 ml: 15 ml 2 ml 0,5 M Einige Körner Auffüllen mit ddH ₂ O
DTT	1 M	Für 10 ml: 1,5 mg Auffüllen mit ddH ₂ O
EDTA	0,5 M	Für 100 ml: 14,61 g Auffüllen mit ddH ₂ O
MgCl ₂	0,5 M	Für 100 ml: 10,16 g Auffüllen mit ddH ₂ O
NaCl	5 M	Für 500 ml: 146,1 g Auffüllen mit ddH ₂ O
NaOH	1 M	Für 1 l: 40 g Auffüllen mit ddH ₂ O
Natriumacetat	3 M	Für 50 ml: 20,41 g Auffüllen mit ddH ₂ O
PBS	1x	Für 1 l: 100 ml 10x Auffüllen mit ddH ₂ O
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 10 % Glycerol 50 mM EDTA (pH 7,5) Bromphenolblau und Xylencyanol	Für 20 ml: 16 ml 2 ml 2 ml 0,5 M Einige Körner Auffüllen mit ddH ₂ O

TBE-Puffer	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA	Für 1 l (10x): 108 g 55 g 40 ml Auffüllen mit ddH ₂ O
------------	--	--

2.1.7 Enzyme & verwendete Puffer

Tabelle 2-7: Verwendete Enzyme und Puffer

Enzym	Puffer	Hersteller
Antarctic Phosphatase	Antarctic Phosphatase Puffer	NEB
BamHI-HF	Cutsmart	NEB
BciVI	Cutsmart	NEB
BglII	3.1	NEB
DNase I	DNase I Puffer	NEB
EcoRI-HF	Cutsmart	NEB
EcoRV-HF	Cutsmart	NEB
HindIII-HF	Cutsmart	NEB
KpnI-HF	Cutsmart	NEB
NotI-HF	Cutsmart	NEB
RNase Inhibitor	-	NEB
RNase Out	-	Invitrogen
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase Puffer	NEB
T7 RNA Polymerase	RNA Pol Reaction Buffer	NEB
TURBO DNase	-	NEB

2.1.8 Plasmide

Tabelle 2-8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pUC57-pHCV-SNAPf-Fluc2	C. Hess AG Niepmann
pUC57-pP2A-HiB-NS5B-26AS-rare	Biocat GmbH
pUC57-pP2A-HiB-NS5B-26AS-com	Biocat GmbH
pUC57-pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare	C. Hess AG Niepmann

pUC57-pHCV-HiB-NS5B-26AS-com	C. Hess AG Niepmann
pUC57-NS5B-HiB-rare-3'UTR-HDV-T7T	Biocat GmbH
pUC57-NS5B-HiB-com-3'UTR-HDV-T7T	Biocat GmbH
pUC57-NS5B-HiB-AA-3'UTR-HDV-T7T	Biocat GmbH
pUC18-5'UTR-Core-GDD	G. Gerresheim AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GND	G. Gerresheim AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GDD-NS5B-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GND-NS5B-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GDD-NS5B-HiB-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GND-NS5B-HiB-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GDD-NS5B-HiB-AA	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GND-NS5B-HiB-AA	C. Hess AG Niepmann
pUC57-EMCV-IRES-HiB-Gly	Biocat GmbH
pUC18-5'UTR-Core-GDD-EMCV-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-5'UTR-Core-GND-EMCV-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GDD	L. Shalamova AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GND	L. Shalamova AG Niepmann
pUC18-SL-I-III-GDD-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SL-I-III-GND-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SL-I-III-GDD-AA	C. Hess AG Niepmann

pUC18-SLI-I-III-GND-AA	C. Hess AG Niepmann
pUC57-NS5B-com-3'UTR-HDV-T7T	Biocat GmbH
pUC57-NS5B-AA-3'UTR-HDV-T7T	Biocat GmbH
pUC18-SLI-III-GDD-EMCV-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GND-EMCV-HiB-rare	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GDD-EMCV-HiB-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GND-EMCV-HiB-com	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GDD-EMCV-HiB-AA	C. Hess AG Niepmann
pUC18-SLI-III-GND-EMCV-HiB-AA	C. Hess AG Niepmann

2.1.9 Nukleotide

Tabelle 2-9: Verwendete Nukleotide

Nukleotide	Hersteller
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Carl Roth
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs)	Carl Roth

2.1.10 Primer

Tabelle 2-10: Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
3'UTR-Fluc	TGTTGTGTTTCGTGGACGAGG	Microsynth Seqlab
5'UTR-Fluc	CTCGATATGTGCGTCGGTAA	Microsynth Seqlab
Lac-Op-for (Standard)	CGGATAACAATTTACACAG	Microsynth Seqlab
Spinach_minus_qPCR_rev	ACCATATTGCCGTCTTTTGG	L. Shalamova AG Niepmann
T7 (Standard)	TAATACGACTCACTATAGGG	Microsynth Seqlab

2.1.11 Größen- und Längenstandards

Tabelle 2-11: Verwendete Größen- und Längenstandards

Standard	Hersteller
HyperLadder 1 kb	Bioline

2.1.12 Kulturmedien

Tabelle 2-12: Verwendete Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
DMEM	Hoher Glukosegehalt (4,5 g/l), L-Glutamin, Pyruvat, Phenol Rot	Thermo Scientific
DMEM (farblos)	Hoher Glukosegehalt; ohne Zusatz von L-Glutamin, Pyruvat oder Phenol Rot	Thermo Scientific
DMEM 10 %	DMEM versetzt mit: 10 % FBS, 1 % Penicillin/ Streptomycin	
Lennox Broth (LB)-Medium	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l	Carl Roth
LB-Agar	400 ml LB-Medium 2 % Bacto Agar	Carl Roth

2.1.13 Bakterienstämme

Tabelle 2-13: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Eigenschaften	Hersteller
Escherichia coli TOP10F'	F- mcrA (mrr- hsdRMS- mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu) 7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

2.1.14 Zelllinien

Tabelle 2-14: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Hersteller
Huh-7.5 Hepatomzellen	Humane Hepatokarzinoma-Zelllinie aus einer menschlichen Leberbiopsie. Derivat von Huh-7 Zellen, das eine zusätzliche Mutation im RIG-I Gen aufweist, und sehr erfolgreich mit dem HCV infiziert werden kann.	Rice Laboratorien, Rockefeller Universität, US

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Arbeitsschritte mit Bakterien nahe der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt, inklusive der Vorbereitung der Kulturmedien. Nährmedien wurden vor der Verwendung zur Sterilisierung autoklaviert und alle Materialien wie Drigalskispatel, die in direkten Kontakt mit Bakterien kamen, zuvor mit Ethanol desinfiziert und abgeflammt. Vor und nach jeder Tätigkeit erfolgte eine sorgfältige Desinfektion der Arbeitsflächen mit 70 % Ethanol.

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die chemisch kompetenten *E. coli* TOP10F['] wurden bei 33 – 37 °C in flüssigem LB-Medium auf dem Schüttelinkubator oder auf Agarplatten im Brutschrank kultiviert. Eine Kultivierung von Bakterien erfolgte zur Vermehrung von Plasmiden im Zuge einer Klonierung. Zur Selektion wurde eine Ampicillinresistenz (Amp^R) auf dem gewünschten Plasmid genutzt. Das jeweilige Kulturmedium wurde daher vor der Nutzung mit 3 µl/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) versetzt. Bei 37 °C sind die Bakterien einem hohen Wachstumsdruck ausgesetzt und selektieren häufiger Plasmide mit spontan aufgetretenen Deletionen, um schneller wachsen zu können. Wenn große Plasmide vermehrt werden sollten, wurde deshalb eine Temperatur niedriger als 37 °C verwendet, um die Selektion von fehlerhaften Plasmiden zu vermeiden.

Bei der Verwendung von flüssigem LB-Medium wurde die Ampicillin-Lösung direkt vor Gebrauch zugegeben und die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Kolben oder Röhrchen (engl. *tubes*). Um sicherzustellen, dass ausreichend Sauerstoff zu den Bakterien gelangte, wurden die Deckel der Tubes nur locker zuge dreht. Der feste Agar musste zur Verflüssigung zum Gießen der Platten zunächst in der Mikrowelle aufgekocht werden. Die Ampicillin-Lösung wurde erst nach einer kurzen Abkühlzeit zugegeben, um eine Schädigung des Antibiotikums durch Hitze zu verhindern. Zur Vermeidung einer Kontamination des Kulturmediums wurden die Ampicillinzugabe und das Gießen der Platten stets nahe der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Die Platten wurden nach dem Aushärten des Agars sofort zur Kultivierung der Bakterien verwendet oder auf dem Deckel liegend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

E. coli nehmen Fremd-DNA aus ihrer Umgebung von Natur aus nur mit sehr geringer Effizienz auf. Um die Permeabilität der Zellmembran und damit die Aufnahme von Plasmid-DNA im Rahmen einer Transformation zu erhöhen, müssen daher chemisch

kompetente Zellen hergestellt werden. Dazu wurde die Calcium-Chlorid-Methode verwendet, bei der die Steigerung der Membrandurchlässigkeit auf der Behandlung mit Calcium-Ionen basiert.

Zunächst wurde ein Reaktionsgefäß chemisch kompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut und ein steriler Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium vorbereitet. Zum Starten der neuen Kultur wurden 150 µl *E. coli* zum Medium hinzugegeben und bei 37 °C und 200 rpm auf dem Heizschüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht wurde. Die OD₆₀₀ von 0,4 sollte nicht überschritten werden, da die Bakterien sonst eine geringere Kompetenz aufweisen können. Im Anschluss an eine 20-minütige Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert (15 ml CaCl₂/50 ml Kultur). Anschließend folgten erneut eine 20-minütige Inkubation auf Eis und eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet in etwa 10 ml 0,1 M CaCl₂/15 % Glycerol resuspendiert. Danach wurde die Suspension auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt (je 200 µl pro Reaktionsgefäß). Die Lagerung der chemisch kompetenten Zellen erfolgte bei -40 °C. Alle Arbeiten wurden am Gasbrenner und unter Verwendung von sterilen Gefäßen und Reagenzien durchgeführt, um Kontaminationen der Bakterien zu vermeiden.

2.2.1.4 Transformation

Die Transformation dient dem Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien. Durch das Wachstum der Bakterien wird der entsprechende Vektor vervielfältigt.

2.2.1.4.1 Standardtransformation

Bei der Standardtransformation wird die Plasmid-DNA sehr effizient durch einen Hitzeschock in die Bakterien eingebracht. Aufgrund der hohen Effizienz eignet sich die Methode vor allem im Anschluss an Ligationsreaktionen, um durch Klonierungen neu erzeugte Plasmide in die Bakterien einzubringen und zu vermehren. Durch den Hitzeschock werden Poren in der bakteriellen Zellmembran erzeugt, durch die die Plasmid-DNA in die Bakterien eingeschleust werden kann.

Nach dem Auftauen der eingefrorenen *E. coli* TOP10F' auf Eis wurden 10 µl des Ligationsansatzes zu 100 µl der Bakterienlösung gegeben. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren und leichtes Schnipsen gegen das Reaktionsgefäß gründlich gemischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Daraufhin wurden die Bakterien für 3 s bei 42 °C hitzegeschockt und im Anschluss zur Erholung 5 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit 450 µl LB-Medium versetzt und zum Wachsen für 1 h bei 37 °C und 180 rpm auf den Heizschüttler gebracht, damit sie vor dem Aufbringen auf antibiotikahaltige Platten das Resistenzgen exprimieren

konnten. Daraufhin wurden die kompetenten *E. coli* auf vorgewärmten Agarplatten (2.2.1.2) ausgestrichen. Dazu wurde ein Drigalskispatel verwendet, der vor jeder Probe in vergälltem Ethanol desinfiziert und in der Flamme des Bunsenbrenners kurz abgeflammt wurde. Um die Bakterien nicht durch Hitze abzutöten, erfolgte das Ausstreichen erst nach einer Abkühlzeit des Spatels von ca. 30 s. 50 µl des Transformationsansatzes wurden direkt auf einer Viertelplatte aufgetragen. Der verbliebene Ansatz wurde 10-fach konzentriert. Zur Konzentrierung wurde dieser kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Bakterienpellet resuspendiert und die Suspension auf einem Viertel der Platte ausgestrichen. Eine Negativkontrolle ohne Plasmid-DNA wurde mitgeführt, um sicherzustellen, dass nur Bakterien, die dank des jeweiligen Plasmids über eine Ampicillinresistenz verfügten, auf den Platten wachsen konnten. Über Nacht wurden die Platten bei 34 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.4.2 Schnelle Transformation ohne Hitzeschock

Die kompetenten Bakterien nehmen freie DNA mit niedriger Effizienz auch ohne Hitzeschock auf. Aufgrund der niedrigen Effizienz fand die Methode der schnellen Transformation allerdings nur bei bereits etablierten Plasmiden Anwendung.

Die kompetenten *E. coli* TOP10F⁺ wurden zunächst auf Eis vollständig aufgetaut. Zu 50 µl Bakterienlösung wurde 1 µg Plasmid-DNA zugegeben. Zur Plasmidaufnahme wurde der Transformationsansatz danach für 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss direkt auf einer halben Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 34 °C im Brutschrank.

2.2.1.5 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur durch alkalische Lyse. Je nach Größe der Bakterienkultur unterscheidet man zwischen Mini- und Maxipräparation.

2.2.1.5.1 Maxipräparation

Für die Maxipräparation wurde eine Bakterienkultur mit einem Volumen von 250 ml verwendet. Vor der Hauptkultur wurde zunächst eine kleinere Vorkultur von den zuvor transformierten Bakterien gestartet. Dazu wurde pro Plasmid eine möglichst einzeln, aber nicht am Rand liegende Bakterienkolonie mit sterilen Zahnstochern von der entsprechenden Agarplatte gepickt und in 3 ml mit 3 µl/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) versetztes LB-Medium übertragen. Die Inkubation der Vorkultur erfolgte für 6 – 8 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Heizschüttler. Je nach Bakteriendichte der Vorkultur wurde diese beim Ansetzen der Hauptkultur für die Maxipräparation unterschiedlich stark verdünnt (1:1000 oder 1:10000), um ein Überwachsen der

Bakterien über Nacht zu verhindern. Für die Hauptkultur wurden entsprechend 250 bzw. 25 µl der Vorkultur in 250 ml mit 3 µl/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) versetztes LB-Medium überführt. Inkubiert wurde die Hauptkultur über Nacht für 16 h bei 34 – 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttelinkubator.

Am Folgetag wurde die Hauptkultur bei einer OD₆₀₀ von 2 – 3 (2.2.1.6) vom Schüttler genommen und in große Zentrifugenröhrchen überführt. Der Maxipräparationsansatz wurde dann für 10 min bei 5000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit dem Bakterienpellet weitergearbeitet. Für alle weiteren Schritte wurde das „GeneJET Plasmid Maxiprep Kit“ genutzt und das enthaltene Protokoll „Plasmid DNA purification using low speed centrifuges“ nach Herstellerangaben befolgt.

Die Bakterienpellets wurden zunächst resuspendiert und im Anschluss durch Zugabe von alkalischer Lösung lysiert, um die Plasmid-DNA herauszulösen. Die Lösung zum Resuspendieren des Bakterienpellets enthält sehr viel RNase, die während der folgenden Prozedur (trotz der für die RNase sehr ungünstigen Salzbedingungen) die bakterielle RNA weitestgehend verdaut. Die nachfolgend verwendete Lyse-Lösung enthält SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), um die Bakterienzellmembran aufzulösen und die aus der Zelle freigesetzten Proteine zu denaturieren. NaOH als weiterer wichtiger Bestandteil dient zur Denaturierung der zellulären DNA, sodass im Anschluss einzelsträngige DNA in Lösung vorliegt. Durch NaOH werden sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA denaturiert.

Beendet wurde die alkalische Lyse durch Zugabe von Neutralisationslösung. Nach der Neutralisation lagern sich die einzelsträngigen DNA-Fragmente unter Ausbildung neuer Wasserstoffbrückenbindungen wieder zu doppelsträngiger DNA zusammen. Bei den kurzen Plasmid-DNA-Ringen gelingt der Vorgang im Gegensatz zur genomischen DNA problemlos in den jeweils homologen Bereichen. Aufgrund der enormen Größe der genomischen DNA ist eine erneute korrekte Zusammenlagerung der beiden Einzelstränge der jeweils homologen Sequenzen in der kurzen Zeit nicht möglich, sodass diese stattdessen über hydrophobe Wechselwirkungen mit den denaturierten zellulären Proteinen interagieren und zusammen mit diesen als weißer Niederschlag ausfallen. Von den Bakterien freigesetzte Endotoxine wurden durch Zugabe des entsprechenden Endotoxin-Bindemittels aus der Lösung entfernt. Der weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert, sodass die genomische DNA und Proteine von der Plasmid-DNA getrennt wurden.

Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit Ethanol versetzt. Zur Reinigung der Plasmid-DNA folgten der Transfer der Lösung auf eine Reinigungssäule und drei Waschdurchgänge (1 x mit Waschlösung I und 2 x mit Waschlösung II). Die DNA bindet unter den gegebenen Pufferbedingungen

zunächst an die Säule. Die Waschschritte dienen der Entfernung von Salzresten, RNA, Proteinen und anderen Verunreinigungen von der Säule. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA in zwei Elutionsschritten mit jeweils 750 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die Aufbewahrung der extrahierten Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.5.2 Minipräparation

Für die Minipräparation wurde eine Bakterienkultur mit einem Volumen von 5 ml genutzt. Auch hier wurde pro Plasmid eine Kolonie der zuvor transformierten Bakterien gepickt und in 5 ml mit 3 µl/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) versetztes LB-Medium übertragen. Inkubiert wurde die Kultur über Nacht für 16 h bei 33 – 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttelinkubator. Die Plasmidextraktion erfolgte mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ nach dem Protokoll „Plasmid DNA purification using centrifuges“. Der Mechanismus entspricht dem einer Maxipräparation (2.2.1.5.1).

2.2.1.6 Bestimmung der OD₆₀₀

Um bei der Maxipräparation möglichst optimale Ergebnisse zu erhalten, wurde die Zelldichte der Bakterienkultur vor Beginn über eine Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) überprüft. Vom Hersteller empfohlen war eine OD₆₀₀ von 2 – 3, da eine höhere Bakterienmasse die Qualität der isolierten DNA reduzieren könnte. Zur Bestimmung der OD₆₀₀ wurden 500 µl der Bakterienkultur in eine Küvette überführt und die Dichte mit dem Biophotometer gemessen. Als Leerwert („Blank“) dienten 500 µl reines LB-Medium.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Durch Restriktionsenzyme kann DNA an spezifischen Sequenzen geschnitten werden. Ein Restriktionsverdau wurde im Rahmen dieser Arbeit zu verschiedenen Zwecken eingesetzt. Bei einer Klonierung wurden Vektor und Insert jeweils durch gezielte Fragmentierung der Plasmide mit kompatiblen Endonukleasen herausgeschnitten, um sie im Anschluss miteinander ligieren zu können. Auch zur Kontrolle des Klonierungserfolgs anhand der Charakterisierung der entstehenden spezifischen Fragmente wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Des Weiteren wurde das DNA-Template vor einer Transkription durch einen Restriktionsverdau mit einer Endonuklease linearisiert, deren Schnittstelle unmittelbar strangabwärts des T7-Terminators liegt.

Bei jedem Restriktionsverdau wurde 1 µl Enzym pro µg DNA und der jeweils kompatible Puffer nach Angaben des Herstellers NEB verwendet. Die Menge an eingesetzter DNA richtete sich nach dem Verwendungszweck. Bei einem Kontrollverdau

wurden stets 0,5 µg DNA eingesetzt, bei einer Klonierung hingegen bis zu 10 µg DNA. Die Inkubation bei einem Restriktionsverdau mit nur einer Endonuklease (Abk. „1x V“) erfolgte für 30 – 45 min bei 37 °C. Ein Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen parallel (Abk. „2x V“) wurde 1 – 1,5 h inkubiert, da die Pufferbedingungen dann oft einen Kompromiss für ein oder beide Enzyme darstellten.

2.2.2.2 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wurde im Anschluss an einen Restriktionsverdau im Rahmen einer Klonierung durchgeführt. Dabei werden die 5'-Phosphate des Vektors enzymatisch durch eine Phosphatase abgespalten. Durch die Dephosphorylierung des Vektors kann bei diesem keine intramolekulare Religation mehr erfolgen. Eine Ligation des Vektors ist dadurch nur noch mit dem Insert möglich, das nicht mit Phosphatase verdaut wird, um dessen 5'-Phosphate zu erhalten. Durch die Dephosphorylierung wird daher der „Hintergrund“ im Sinne der Vermehrung leerer Vektoren ohne Insert bei der nachfolgenden Transformation und der anschließenden Selektion von gewünschten Klonen minimiert. Von der Antarctic Phosphatase wurde 1 U/µg DNA eingesetzt und der gleichnamige Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C im Heizblock.

2.2.2.3 Ligation

Bei der Ligation werden der Vektor und das gewünschte Insert zu einem rekombinanten Plasmid miteinander verknüpft. Das Ausbilden einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphatrest der beiden DNA-Fragmente wird enzymatisch über die DNA-Ligase katalysiert. Für die Ligationsreaktion wurde stets ein Gesamtansatz von 20 µl mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer gewählt. Zur Kalkulation der benötigten Insertmenge bei unterschiedlichen molaren Verhältnissen von Insert und Vektor wurde der NEBio Calculator oder die folgende Formel verwendet:

$$Insert (ng) = \frac{X \times (Vektor [ng] \times Gr\ddot{o}\ddot{t}ze Insert [kb])}{Gr\ddot{o}\ddot{t}ze Vektor [kb]}$$

X richtet sich nach dem jeweils gewählten Verhältnis zwischen Insert und Vektor. Für die Ligationsreaktion wurde entweder die zweifache oder vierfache Menge an Insert eingesetzt. Aufgefüllt auf den Gesamtansatz von 20 µl wurde mit ddH₂O. Über Nacht erfolgte die Inkubation des Ligationsansatzes bei 16 °C.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese können Moleküle nach Ladung und Größe aufgetrennt werden. Nukleinsäuren wandern aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-

Rückgrats nach Anlegen einer Spannung zur Anode. Da kleinere Moleküle schneller als größere durch das Gel wandern, werden die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Über die Agarosekonzentration kann dabei die Geldichte und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren durch das Gel beeinflusst werden.

Zuerst wurden die Bestandteile der Gelelektrophorese-Apparatur mit ddH₂O abgespült und zusammengebaut. Danach wurde das Gel vorbereitet. Dafür wurden 50 ml 1 x TBE mit Agarose versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 1,2 % genutzt. Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente, desto höher wurde die Agarosekonzentration gewählt. Die Agaroselösung wurde nach kurzer Abkühlung in den Gelschlitten gegossen und nach Aushärten des Gels beladen. Bei Kontrollgelen wurden 0,1 – 0,5 µg DNA aufgetragen, bei Gelen zur Klonierung hingegen bis zu 10 µg, dann meist verteilt auf mehrere, durch Abkleben mit Tesafilm kombinierte, Taschen. Vor dem Beladen wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt. Funktionen des Ladepuffers sind die Stabilisierung des pH-Werts und die Erhöhung der Dichte der Proben, sodass diese in die Taschen absinken. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe, Bromphenolblau und Xylencyanol, ermöglichten zudem eine Abschätzung der Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde neben den Proben ein Marker mit DNA-Molekülen bekannter Größe aufgetragen. Die Gele wurden je nach Größe der aufgetragenen DNA-Fragmente unterschiedlich lange laufen gelassen. Eine Spannung von 120 Volt wurde angelegt.

2.2.2.5 Färben der Gele

Das Färben der Gele erfolgte je nach weiterer Verwendung mit Ethidiumbromid oder mit SYBR Gold. Gele, die nur zur Kontrolle eines Restriktionsverdaus oder einer Transkription dienten und danach verworfen wurden, wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden mit UV-Licht detektiert. Da bei der Exposition mit UV-Licht allerdings das Risiko einer DNA-Schädigung durch Induktion von Mutationen besteht, sollten Gele im Rahmen einer Klonierung keinem UV-Licht ausgesetzt werden. Solche Gele wurden daher stattdessen mit SYBR Gold gefärbt. SYBR Gold ist ein sehr sensibler Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von Nukleinsäuren. Das Fluoreszenzsignal, das bei Bindung an Nukleinsäuren erzeugt wird, kann im Licht eines Blaulicht-Illuminators erfasst und damit die Banden sichtbar gemacht werden.

2.2.2.5.1 Ethidiumbromid

Zum Färben wurde ein Ethidiumbromidbad genutzt, für das 400 ml 1 x TBE mit 80 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid versetzt wurden. Das Ethidiumbromidbad wurde

lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und mehrmals zum Färben der Gele verwendet. Direkt nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele für 15 – 30 min in das Ethidiumbromidbad gelegt und die Banden unter UV-Licht im Geldoc sichtbar gemacht.

2.2.2.5.2 SYBR Gold

Das Färben der Gele mit SYBR Gold erfolgte parallel zur Gelelektrophorese, weshalb das Gel aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs lichtgeschützt laufen gelassen wurde. Der Agaroselösung wurde bereits vor dem Gießen des Gels 0,1 µl/ml SYBR Gold zugefügt. Um den Farbstoff dabei nicht zu schädigen, musste die Agaroselösung vor der Zugabe auf eine lauwarme Temperatur abkühlen. Die Detektion der Banden konnte bereits während des Laufens des Gels mit einem Blaulicht-Illuminator erfolgen. Nach der Gelelektrophorese wurden die zur Klonierung benötigten Banden des Inserts bzw. des Vektors unter Zuhilfenahme des Blaulicht-Illuminators mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten.

2.2.2.6 Gelextraktion

Die aus dem Gel ausgeschnittene DNA musste vor der weiteren Verwendung aus der Agarose extrahiert und gereinigt werden. Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde das „GeneJET Gel Extraction Kit“ nach Herstellerangaben angewendet.

Um den Agaroseanteil von Anfang an so gering wie möglich zu halten, wurden die Banden sehr dicht an der DNA entlang aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittene Bande wurde in drei etwa gleich schwere Abschnitte zerteilt, die jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen wurden. Zu jedem Gelstück wurde das gleiche Volumen (1:1) an Bindungspuffer addiert und der Ansatz für 10 – 20 min bei 55 °C und unter leichtem Schütteln inkubiert, bis sich die Agarosemasse vollständig gelöst hatte. Im Anschluss wurde die Gelmasse nach kurzem Vortexen auf die Reinigungssäule überführt. Um die Säule nicht zu überladen, wurden schrittweise immer wieder 800 µl aufgeladen, für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. So wurde verfahren, bis die gesamte Gelmasse auf die Säulen transferiert wurde. Je nach Gewicht der Gelstücke wurde die Gelmasse auf mehrere Säulen aufgeteilt, um diese nicht mit Agarose zu verstopfen. Zur Reinigung der geladenen DNA erfolgten danach zwei Waschschrte mit Waschpuffer. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule gelöst und im Anschluss entweder direkt für eine Ligation (2.2.2.3) verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Sequenzierung

Zur Kontrolle des Klonierungserfolgs wurden die Proben zur Sanger Sequenzierung zu Microsynth Seqlab (Göttingen) geschickt. Den Firmenangaben entsprechend wurden jeweils 12 µl der Probe mit einer DNA-Konzentration von 40 – 100 ng/µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versendet. Bei beigemischten eigenen Primern wurden der Probe noch 3 µl 20 µM Primerlösung zugefügt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit der jeweiligen Referenzsequenz unter Verwendung der Programme „BioEdit“, „Reverse Complement“ und „Clustal Omega“.

2.2.2.8 In vitro-Transkription

Die Transkription dient der enzymatisch katalysierten DNA-abhängigen Synthese von RNA. Die T7-RNA-Polymerase katalysiert die Transkriptionsreaktion ausgehend von einem DNA-Template mit T7-Promotor als Startpunkt (Sequenz: TAATACGACTCACTATA, wobei das letzte A das Nukleotid direkt vor dem Transkriptionsstart ist). Die Promotorsequenz befindet sich bei allen verwendeten Plasmiden direkt vor dem Beginn des jeweiligen HCV-Genom-Ausschnitts. Die Effizienz der T7-RNA-Polymerase ist höher, wenn das erste transkribierte Nukleotid ein G ist.

Um ein definiertes 3'-Ende der RNA zu erhalten, liegt auf jedem Plasmid direkt hinter der HCV-3'UTR ein Hepatitis Delta Virus (HDV) Ribozym, das im fertigen RNA-Transkript direkt vor seiner eigenen Sequenz spaltet und damit ein korrektes 3'-Ende der davorliegenden HCV-RNA generiert. Damit während der laufenden Transkription ein Weiterlaufen der T7-RNA-Polymerase weit über das Ribozym hinaus verhindert wird, liegt hinter dem HDV-Ribozym ein T7-Terminator. Hinter diesem wiederum wurde das DNA-Template vor der Transkription mit einem Restriktionsenzym geschnitten, um Durchläufer-Transkripte so weit wie möglich zu vermeiden. Vor jeder Transkription wurden die Plasmide durch einen Restriktionsverdau linearisiert, mit Phenol-Chloroform aufgereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

Neben dem DNA-Template enthält jeder Transkriptionsansatz den entsprechenden Transkriptionspuffer, Ribonukleosidtriphosphate, $MgCl_2$ als Cofaktor der T7-RNA-Polymerase, DTT und RNase-Inhibitor zum Schutz der entstehenden RNA vor Abbau. Die $MgCl_2$ -Konzentration muss jeweils empirisch an die Nukleotidkonzentration angepasst werden, wenn die Nukleotide als freie Säuren und nicht als Magnesium-Komplexe vorliegen. Die genauen Konzentrationen der Reagenzien können der nachfolgenden Tabelle 2-15 entnommen werden.

Tabelle 2-15: Ansatz für die *in vitro*-Transkription.

	Einzusetzende Menge	Stammlösung	Endkonzentration
Gesamtvolumen	50 µl		
ddH ₂ O	X µl		
Transkriptionspuffer	5 µl	10 x	1 x
rNTPs	7 µl	25 mM	3500 µM
DTT	0,5 µl	1000 mM	10 mM
DNA-Template	X µl	X µg/µl	25 µg/ml
T7-RNA-Polymerase	1 µl	50 U/µl	1 U/µl
RNase Inhibitor	1 µl	50 U/µl	1 U/µl
MgCl ₂	10 µl	25 mM	5 mM

Die einzusetzende Menge an Template-DNA richtete sich jeweils nach der Konzentration der Probe. Durch Zugabe von ddH₂O wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Transkriptionsansatz aufgefüllt. Die Reagenzien wurden durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt und für 3,5 – 4 h bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Eine weitere Zugabe von 1 µl T7-RNA-Polymerase erfolgte nach 1,5 h. Anschließend wurden die Transkriptionsproben mit DNase verdaut (2.2.2.9), über eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.10) aufgereinigt und mit Ethanol präzipitiert (2.2.2.11). Die Qualität der RNA wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.4) überprüft.

2.2.2.9 DNase-Verdau

Bei einem DNase-Verdau wird die in einer Probe enthaltene DNA enzymatisch zu Mono- und Oligodesoxyribonukleotiden abgebaut, indem die Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatrest und der 3'-Hydroxygruppe zweier benachbarter Nukleotide hydrolytisch gespalten wird. Um die Template-DNA als Störfaktor für Folgereaktionen zu fragmentieren, wurde nach einer Transkription stets ein DNase-Verdau durchgeführt. Zur Reinigung der Proben schloss sich direkt an den DNase-Verdau eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.10) an.

2.2.2.9.1 DNase I

DNase I wird standardmäßig zum Abbau von DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen verwendet. Hierzu wurden den Transkriptionsproben 0,1 U/µl DNase I und der entsprechende Puffer zugegeben. Nach gründlichem Mischen durch Auf- und Abpipettieren erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C auf dem Heizblock.

2.2.2.9.2 TURBO-DNase

Da DNase I nur eine mäßige Affinität zu DNA hat und diese bei niedrigen Konzentrationen nur schlecht schneidet, wurde zur Beseitigung von Template-DNA überwiegend TURBO-DNase genutzt. Diese hat eine höhere Affinität für DNA und ist unempfindlicher gegenüber Salzen, was im Anschluss an eine Transkription wegen der

im Transkriptionspuffer enthaltenen Salze von Vorteil ist. Hierzu wurde dem Transkriptionsansatz 2,5 µl TURBO-DNase zugefügt und dieser nach gründlichem Mischen durch Auf- und Abpipettieren für 30 min bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert.

2.2.2.10 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen aus einer Nukleinsäurelösung. Im Anschluss an enzymatische Reaktionen wie einen Restriktionsverdau oder eine Transkription können darüber unerwünschte Proteine in der Nukleinsäurelösung denaturiert werden, lösen sich in der Phenolphase und werden so größtenteils beseitigt.

Die Proben wurden dazu zunächst mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 400 µl aufgefüllt und Phenol-Chloroform (1:1) zugegeben, was zur Phasenbildung führt. Um Nukleinsäurelösung und Phenol-Chloroform miteinander zu vermischen, wurde daher im Anschluss gründlich gevortext. Die Lösung wurde dann in „Phase Lock Heavy Tubes“ überführt und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dabei legt sich die in den „Phase Lock Heavy Tubes“ enthaltene Gelschicht zwischen die beiden Phasen und trennt diese vollständig voneinander ab. Während die untere, organische Phase die zu entfernenden Proteine enthält, befinden sich die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und nachfolgend daraus die Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

2.2.2.11 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation mit Ethanol wurde im Anschluss an eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und diente zum einen zur Konzentrierung der Nukleinsäuren und zum anderen zur Reinigung der Lösung von Phenol-Chloroform- und Salzresten. Die Fällung der Nukleinsäuren basiert auf der Verringerung ihrer Löslichkeit durch die Zugabe von hochprozentigem Alkohol und saurem Natriumacetat, dessen Natriumionen und Protonen die negativ geladenen Nukleinsäuren neutralisieren. Diese Ladungsneutralisierung erlaubt dann die Aggregation der Nukleinsäure-Moleküle bei niedrigerer Wasserkonzentration.

Zuerst wurde die Probe mit 40 µl saurem Natriumacetat (3 M Natriumacetat/2 M Essigsäure) und 1 ml 96 – 100 % Ethanol versetzt. Das Fällern der Nukleinsäuren erfolgte für mindestens 1 h oder über Nacht im Gefrierschrank bei -20 °C. Die gefällten Nukleinsäuren wurden danach für 20 min bei 4 °C und 16000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um verbliebene Verunreinigungen (insbesondere Salze) zu entfernen, erfolgte ein Waschdurchgang mit 700 µl 70 % Ethanol. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C und 16000 rpm wurde der Überstand wieder vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. Da Phenol-Chloroform- und Salzreste

größtenteils in Lösung verbleiben, konnten diese durch das Waschen mit Ethanol und Abnehmen des Überstands entfernt werden. Das Nukleinsäure-Pellet wurde zuletzt für 20 s bei offenem Deckel trocknen gelassen und in 20 – 40 µl ddH₂O durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig resuspendiert. Die Nukleinsäurekonzentration der Proben wurden mit Hilfe des Qubit-Fluorometers (2.2.2.12) bestimmt.

2.2.2.12 Qubit Assays

Qubit Assays dienen zur Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung. Dabei werden Farbstoffe verwendet, die spezifisch DNA oder RNA binden und bei der Bindung nach entsprechender Anregung stark fluoreszieren. Das Qubit-Fluorometer kalkuliert anhand der Stärke des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu eingelesenen Standards die Nukleinsäurekonzentration der Proben.

Zur Bestimmung der Konzentration an doppelsträngiger DNA wurden zunächst 198 µl dsDNA-BR-Puffer sowie 1 µl der Probe vorgelegt und zuletzt 1 µl des entsprechenden Farbstoffs zugegeben. Nach Farbstoffzugabe wurde der Ansatz kurz gevortext, 2 min inkubiert und im Anschluss die Messung mit dem Qubit-Fluorometer durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration folgte dem gleichen Schema, allerdings wurden hierbei entsprechend der RNA-BR-Puffer und der gleichnamige Farbstoff verwendet.

2.2.2.13 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist besondere Vorsicht geboten, da RNasen im Gegensatz zu anderen Enzymen durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert werden können. Glaswaren und Spatel wurden daher zum Inaktivieren von RNasen vor dem Gebrauch für 8 h bei 280 °C gebacken. Bei Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurde darauf geachtet, dass diese möglichst RNase-frei waren, und auch Lösungen wurden entsprechend RNase-frei angesetzt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter der sterilen Bank durchgeführt. Die Lüftung der Werkbank wurde mindestens 10 min vor Beginn der Arbeit eingeschaltet und die Arbeitsfläche durch UV-Licht desinfiziert. Vor und nach jeder Nutzung wurde die Arbeitsfläche mit 70 % Ethanol gereinigt. Auch alle Materialien, die in die Werkbank eingebracht wurden, wurden zuvor mit 70 % Ethanol abgewischt. Prinzipiell wurden nur sterile Arbeitsmaterialien verwendet und alle Lösungen vor dem Gebrauch autoklaviert.

2.2.3.2 Auftauen eukaryotischer Zellen

Zum Starten einer Zellkultur wurde ein Reaktionsgefäß mit Zellen, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt worden waren, aufgetaut. Die tauenden Zellen wurden vorsichtig in 5 ml vorgewärmtem DMEM mit 10 % FBS und Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Durch langsames Auf- und Abpipettieren wurde das Zellpellet gelöst und die Lösung anschließend zum Zentrifugieren in ein steriles Falcon-Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugationszeit von 5 min bei 900 rpm wurde der Überstand dekantiert und das Pellet sehr vorsichtig in 10 ml DMEM mit 10 % FBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllösung in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Wenn die lebensfähigen Zellen adhärent waren, erfolgte nach etwa 6 h ein Mediumwechsel zur Entfernung der Reste gestorbener Zellen und bei 90 %-iger Konfluenz ein Umsetzen in die nächstgrößere Zellkulturflasche. Daraufhin wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert (2.2.3.2).

2.2.3.3 Kultivierung und Splitten eukaryotischer Zellen

Die Huh-7.5 Zellen wurden bei 37 °C, hoher Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert und regelmäßig passagiert, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern. Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet, das mit FBS (10 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) versetzt wurde.

Beim Splitten wurde zunächst das alte Medium dekantiert und die Zellen mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurden diese mit 5 ml 1 x Trypsin/EDTA behandelt und einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Sobald die Zellen abgelöst waren, wurde die Spaltungsreaktion des Trypsins durch Zugabe von 5 ml DMEM mit 10 % FBS gestoppt (Serum enthält Serinprotease-Inhibitoren). Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen wieder vollständig in DMEM resuspendiert und je nach Zelldichte in Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:2 erneut ausgesät. Nach Zugabe von 25 ml frischem Nährmedium wurden die Zellen weiter im Brutschrank kultiviert.

2.2.3.4 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Am Tag vor einer Transfektion wurden die Zellen ausgesät und zuvor gezählt. Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauer improved Zellkammer und diente dazu, bei jedem Experiment eine definierte und damit jeweils vergleichbare Zahl an Zellen einzusetzen. Bei der Neubauer improved Zellkammer handelt es sich um eine Glasplatte, in deren Mitte sich ein Liniennetz zur Auszählung der Zellen befindet. Dieses Zählgitter besteht aus 3 x 3 Großquadraten, die jeweils eine Kantenlänge von 1 mm und entsprechend eine Fläche von 1 mm² aufweisen. Die Kammerhöhe nach Auflegen des

Deckglases entspricht genau 0,1 mm, sodass jedes Großquadrat ein Volumen von 0,1 mm³ hat.

Die Zellen wurden zunächst wie beim Splitten mit 1 x PBS gewaschen, mit 1 x Trypsin gelöst und in 10 %-igem DMEM gründlich resuspendiert (2.2.3.3). Von der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und unter das aufgelegte Deckgläschen in die Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den vier Großquadraten, die jeweils nochmal in 4 x 4 Kleinquadrate unterteilt sind, ausgezählt. Aus den Zählungen der Zellen in den vier Großquadraten wurde ein Mittelwert gebildet und dieser mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Der Multiplikationsfaktor ergibt sich aus dem definierten Volumen der Eckquadrate von 0,1 mm³. Die Berechnungsformel lautet entsprechend wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl der großen Eckquadrate} \times 10^4$$

2.2.3.5 Zellen aussäen

Im Anschluss an die Zählung mit der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen für die Transfektion in 12- oder 24-Well-Titrierplatten (engl. *well* = Mulde, Napf) ausgesät. Das Aussäen der Zellen erfolgte stets ca. 24 h vor der Lipofektion, um bis dahin eine 70 %-ige Konfluenz der Zellen zu erreichen. Bei 12-Well-Titrierplatten wurden 1 x 10⁵ Zellen/Well und bei 24-Well-Titrierplatten 0,5 x 10⁵ Zellen/Well ausgesät. Den Zellen wurde pro 12-Well 1 ml bzw. pro 24-Well 500 µl DMEM mit 10 % FBS zugegeben. Um die Zellen möglichst gleichmäßig in den Wells zu verteilen und damit ein ausgeglichenes Wachstum zu ermöglichen, wurden die Platten vorsichtig, aber gründlich geschwenkt. Bis zur Transfektion am Folgetag wurden die Platten im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.6 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Die Transfektion dient dem Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Dies kann über verschiedene Verfahren erreicht werden. In dieser Arbeit wurde stets die Methode der Lipofektion verwendet, bei der die Plasmid-DNA oder RNA mit Hilfe von Liposomen in die Zellen eingeschleust wird. Die Liposomen enthalten kationische Lipide in ihren Membranhüllen, die Komplexe mit den negativ geladenen Nukleinsäuren bilden können. Aufgrund ihrer positiven Ladung können die Liposomen auch in Wechselwirkung mit der negativ geladenen Plasmamembran eukaryotischer Zellen treten, sodass die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe mittels Endozytose in das Zytosol der Zellen aufgenommen werden.

Die Huh-7.5 Zellen wurden stets einen Tag vor der Transfektion ausgesät, damit die Transfektion selbst bei einer Zelldichte von ca. 70 % erfolgen konnte. Für jedes zu transfizierende Konstrukt wurde ein Mastermix aus DMEM (0 % FBS, antibiotikafrei),

Lipofectamine 2000 und RNA angesetzt. Dazu wurden zunächst DMEM (250 µl/12-Well bzw. 125 µl/24-Well) und Lipofectamine 2000 (3 µl Lipofectamine/µg RNA) zusammengegeben, für 5 s gevortext und für 5 min inkubiert. Danach wurde die in Wasser gelöste RNA (abhängig vom Konstrukt 0,1 – 0,3 pmol/12-Well bzw. 0,1 pmol/24-Well) zugegeben und kurz gevortext. Diese Mastermixe wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Nukleinsäure-Lipid-Komplexe vor Applikation auf die Zellen bilden konnten. Im Anschluss wurden die Ansätze mehrmals vorsichtig invertiert und dann tröpfchenweise am Rand des Wells zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden dann bis zu den jeweiligen Zeitpunkten der HiBiT-Messung ohne weiteren Mediumwechsel im Brutschrank inkubiert. Eine Negativkontrolle („Mock“) ohne Nukleinsäure wurde stets mitgeführt. Abgesehen von der fehlenden RNA-Zugabe wurde diese genauso wie die restlichen Proben behandelt. Zur Qualitätskontrolle wurde mit Duplikaten gearbeitet, dazu wurden pro Konstrukt immer zwei Wells mit derselben RNA transfiziert und im HiBiT-Assay gemessen.

2.2.3.7 HiBiT Assay

Die Messung der zellulären HiBiT-Expression wurde zur Quantifizierung der Translations- und indirekt auch der Replikationsleistung der verschiedenen Replikon-Systeme genutzt. Die Detektion von HiBiT ist eine sehr sensitive Methode zur Proteinmessung, die nur eine geringe Hintergrund-Lumineszenz aufweist. Das System basiert auf der Interaktion von HiBiT (11 AS) und LgBiT (156 AS), die gemeinsam die „NanoLuc“ Luciferase bilden. Nach Vereinigung der beiden Komponenten zur „NanoLuc“ Luciferase kann diese ihr Substrat Furimazin umsetzen, wobei ein Lumineszenzsignal entsteht, das am Luminometer gemessen werden kann.

Die HiBiT-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion gemessen (4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h). Der Mastermix aus Lysepuffer, LgBiT und Substrat wurde für jeden Zeitpunkt erst unmittelbar zuvor angesetzt. Dazu wurde zunächst der Lysepuffer mit 1 x PBS (1:1) verdünnt. 15 min vor dem jeweiligen Zeitpunkt wurden die Platten aus dem Inkubator geholt und kurz auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Im Anschluss wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Um möglichst wenige Zellen vom Well zu lösen und den Zellstress zu minimieren, wurden die Platten dabei schräg gehalten und vorsichtig 500 µl PBS auf den Unterrand der Wells gegeben. Danach wurden die Platten langsam geschwenkt und das PBS direkt wieder abgenommen. Nach dem Waschvorgang wurde der Mastermix zur HiBiT-Detektion durch Zugabe des HiBiT-Substrats (1:50) und LgBiT (1:100) vervollständigt und nach mehrmaligem Invertieren direkt auf die Zellen gegeben (130 µl/12-Well bzw. 70 µl/24-Well). Zur Lyse wurden die Platten je nach Zelldichte für

10 – 20 min lichtgeschützt auf dem Kippschüttler inkubiert. Daraufhin wurde jeweils das gesamte Lysat nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren und Abspülen der Wells in Tubes transferiert und die Lumineszenz einmalig im Luminometer gemessen.

2.2.3.8 WST-1 Assay

Der WST-1 Assay wurde zur Kalkulation der Zellproliferation und Viabilität der Zellen pro Well verwendet. Er basiert auf der enzymatischen Umsetzung von Tetrazoliumsalzen zu Formazan im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette von lebenden Zellen. Die Menge an gebildetem Formazan ist entsprechend (bei anzunehmender gleicher durchschnittlicher Zellgröße) direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen pro Well. Da die Zellen durch den WST-1 Assay nicht geschädigt werden, wird das Ergebnis der im Anschluss durchgeführten HiBiT-Messung nicht beeinflusst.

Der WST-1 Test wurde jeweils 45 min vor dem jeweiligen Zeitpunkt gestartet. Vorbereitend wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese vorsichtig mit 200 µl farblosem DMEM gewaschen. Die WST-1-Reagenz wurde in farblosem DMEM verdünnt (1:50) und 200 µl/Well tröpfchenweise zu den Zellen zugegeben. Um Zellstress durch Austrocknen zu reduzieren, wurden dabei immer nur jeweils 4 – 5 Wells in einem Zuge behandelt. Dadurch wurde das Zeitintervall, in dem die Zellen ohne Medium im Well vorlagen, möglichst kurz gehalten. Zur enzymatischen Umsetzung des WST-1-Reagenz folgte eine Inkubation der Platten für 30 min im Brutschrank. Während die Tetrazoliumsalze nur eine leichte rötliche Färbung haben, weist Formazan eine starke Rotfärbung auf. Die erfolgreiche Umsetzung durch die vitalen Zellen konnte daher nach der Inkubation bereits mit bloßem Auge durch einen Farbumschlag des Mediums von farblos zu gelb beobachtet werden. Je höher die Zelldichte, desto dunkler war die Gelbfärbung des Mediums. Zur exakten Quantifizierung der Zellzahl wurden 100 µl des Überstands/Well in eine 96-Well-Titrierplatte überführt und die Absorption bei 450 nm in einem Tecan Microplate Reader gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde 650 nm verwendet. Bis zur Messung wurden die Proben lichtgeschützt auf Eis gelagert.

2.2.4 Qualitätskontrolle

Um sicherzustellen, dass nur RNAs von vergleichbarer und guter Qualität transfiziert wurden, wurde die Intaktheit der transkribierten Nukleinsäuren nach der Aufreinigung mit Phenol-Chloroform vor jeder Transfektion mit Agarosegelen kontrolliert. Die Transfektion erfolgte stets in Duplikaten, um Pipettier- oder Messfehler detektieren zu können, und die Zuteilung der Platten zu den verschiedenen Zeitpunkten zufällig am Tag der Lipofektion. Zum Ausschluss, dass Messunterschiede zwischen den Konstrukten durch Unterschiede in der Zellzahl oder -vitalität der Wells statt durch die Replikons selbst

begründet waren, wurden stichprobenweise WST-1-Assays durchgeführt. Die Reihenfolge, in der die Waschvorgänge und die Lyse im Zuge des HiBiT-Assays durchgeführt wurden, wurde zwischen den Versuchsreihen variiert, um sicherzugehen, dass diese keinen Einfluss auf das Messergebnis nahm.

2.2.5 Statistische Methoden

2.2.5.1 Datenaufbereitung

Zur Datensammlung und -aufbereitung wurde Microsoft Excel 2019 verwendet. Aus den Messwerten der Duplikate wurde stets der Mittelwert gebildet und nur dieser für die weitere Auswertung verwendet. Auch wenn mit HiBiT ein sehr sensitives Detektionssystem genutzt wurde, entstand immer ein Hintergrundrauschen. Dieses wurde durch die mitgeführte Negativkontrolle („Mock“) für jeden Zeitpunkt erfasst und von den Messwerten für die Konstrukte subtrahiert. Da die Rohwerte wegen der biologischen Variabilität von Experiment zu Experiment oft stark schwankten und daher für die Interpretation der Ergebnisse nur eingeschränkt geeignet waren, wurden alle Messwerte eines Zeitverlaufs auf den Wert des Wildtypkonstrukts nach 4 h als Referenz bezogen („normalisiert“). Dazu wurden alle Messwerte durch den Referenzwert dividiert und so Verhältnisse gebildet (mit dem normalisierten Referenzwert = 1,0). Damit wurde stets die relative Stärke der Lumineszenz der Proben im Vergleich zum Referenzwert betrachtet. Der Wert des Wildtypkonstrukts nach 4 h wurde als Referenzwert gewählt, da er sich als Startwert gut zur Darstellung der Veränderungen im Zeitverlauf eignete. Durch die Normalisierung wurde eine bessere Vergleichbarkeit der Werte erzielt. Vor allem erlaubte diese Normalisierung, Werte von verschiedenen Experimenten miteinander zur Bildung von Mittelwerten und Standardabweichungen sowie zur weiteren statistischen Auswertung miteinander zu kombinieren.

2.2.5.2 Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit JASP (engl. *Jeffreys's Amazing Statistics Program*) (JASP Team 2024) und mit Beratung durch Dr. biol. hom. Anita Windhorst vom Institut der medizinischen Informatik der JLU Gießen. Die Eignung der in dieser Arbeit verwendeten statistischen Methoden für den jeweiligen Zweck und die Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse und ihrer Interpretation wurden im Rahmen der Beratung überprüft.

Zunächst wurde stets eine deskriptive Datenanalyse durchgeführt, bei der die Lage, die Streuung und die Verteilung der Werte betrachtet wurden. Bedingt durch den Zeitverlauf ergab sich in der Regel eine linksgipflige bzw. rechtsschiefe Verteilung. Es

handelte sich vermutlich um eine logarithmische Normalverteilung (kurz Log-Normalverteilung), daher wurden die aufbereiteten Werte durch Logarithmieren in eine Normalverteilung überführt (2.2.5.1). Um auch Nullwerte in die Auswertung einbeziehen zu können, wurden ggf. alle Werte vor dem Logarithmieren um +0,01 verschoben.

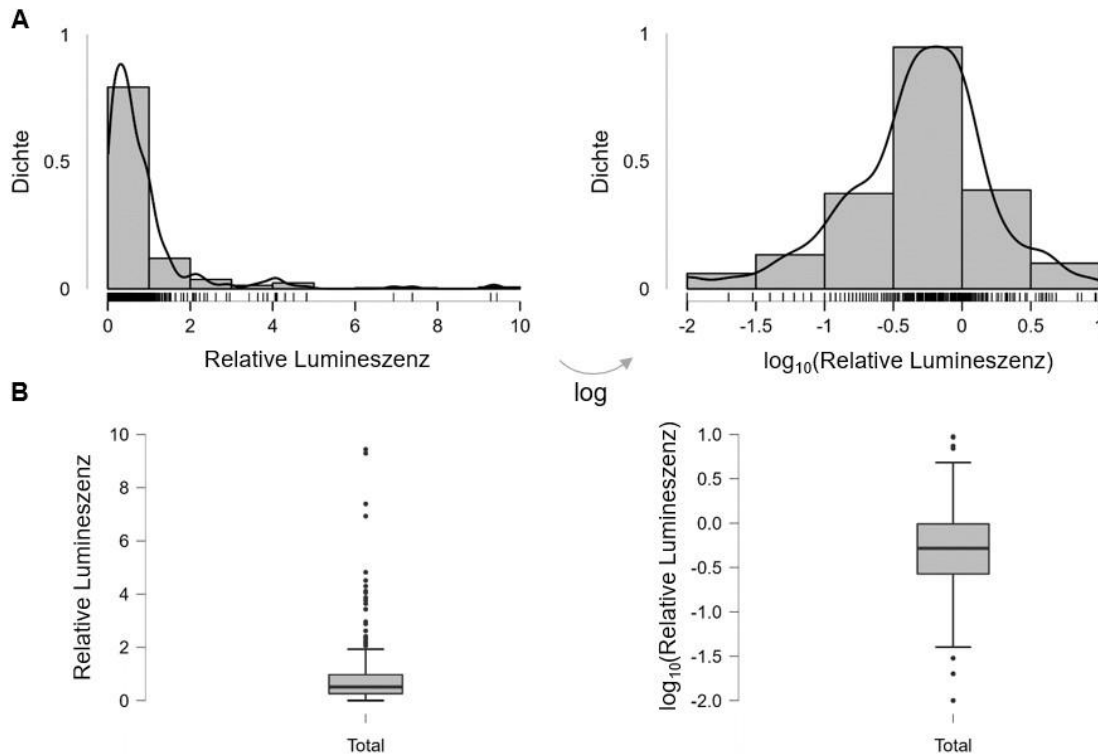


Abbildung 2-1: Verteilungsdiagramm vor und nach dem Logarithmieren der Messwerte. (A) Hier ist beispielhaft die Verteilung der Datensätze für das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt gezeigt. Durch die überwiegend frühen Zeitpunkte sowie die Konstrukte mit inaktiver Polymerase ergab sich eine linksgipflige Verteilung mit einer Häufung von Werten im niedrigen Bereich (links). Durch Logarithmieren der Messwerte konnte die linksgipflige Verteilung in eine Normalverteilung überführt werden (rechts), sodass für die weitere Auswertung die logarithmierten Werte genutzt wurden. (B) stellt die beiden Datensätze im Vergleich als Boxplots dar. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet. Abbildung erstellt mit JASP.

Die weitere Analyse erfolgte mit einer 2- oder 3-faktoriellen Varianzanalyse (engl. *Analysis of variance*, kurz ANOVA), wobei das logarithmierte relative Lumineszenzsignal (Abk. $\log_{10}(\text{Relative Lumineszenz})$) als Zielvariable bzw. abhängige Variable und die Aktivität der Polymerase, die NS5B-Mutation und der Zeitpunkt als modulierende Faktoren eingingen. Je nach Merkmalsausprägung wurden verschiedene Faktorstufen unterschieden. Der Faktor Polymerase („Pol“) hat die Stufen aktiv („+“) und inaktiv („-“), der Faktor NS5B-Mutation die Stufen nicht mutiert („rare“), still mutiert („com“) und mit Aminosäureaustausch mutiert („AA“) und der Faktor Zeitpunkt die Stufen „4 h“, „8 h“, „24 h“, „48 h“, „72 h“ und „96 h“. Die ANOVA testet, ob die Varianz der Zielvariable durch die Merkmalsausprägung eines oder mehrerer Einflussfaktoren erklärt werden kann. Im Vergleich zum t-Test ist die ANOVA auch für die Analyse von mehr als zwei unabhängigen Gruppen geeignet. Berücksichtigt man alle Merkmalsausprägungen der

drei Faktoren, ergeben sich je nach Versuchsreihe bis zu 30 Subgruppen (z. B. „+ rare 24“), die mit Hilfe der ANOVA miteinander verglichen werden konnten. Um Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren zu detektieren und einzelne Subgruppen paarweise miteinander zu vergleichen, wurden Post-hoc-Tests durchgeführt.

Zur Durchführung einer ANOVA sollten Varianzhomogenität und eine Normalverteilung der Residuen vorliegen. Die Normalverteilung der Residuen wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test und einem Q-Q-Diagramm überprüft. Zur Testung auf Varianzhomogenität wurde der Levene-Test eingesetzt, wobei ein signifikantes Testergebnis auf Verletzung des Kriteriums hinweist. Durch das Logarithmieren der Messwerte konnte i. d. R. eine Normalverteilung der Residuen erzielt und die Varianzunterschiede zwischen den Subgruppen verringert werden (11.3).

Der Zeitverlauf, die unterschiedliche Aktivität der Polymerase, die biologische Variabilität der Zellen sowie der RNAs und die infolge der Normalisierung fehlende Streuung der Werte des Wildtypkonstrukts bei 4 h führten allerdings zu Einschränkungen der Varianzhomogenität. Bei den Unterschieden durch die Faktoren Zeitpunkt und Polymerase handelte es sich jedoch um erwünschte Effekte, die Teil des Ergebnisses sind und dort näher diskutiert werden. Betrachtete man den Faktor NS5B-Mutation isoliert, war die Streuung der Werte innerhalb der Subgruppen i. d. R. konsistent und weitestgehend homogen (Abbildung 2-2).

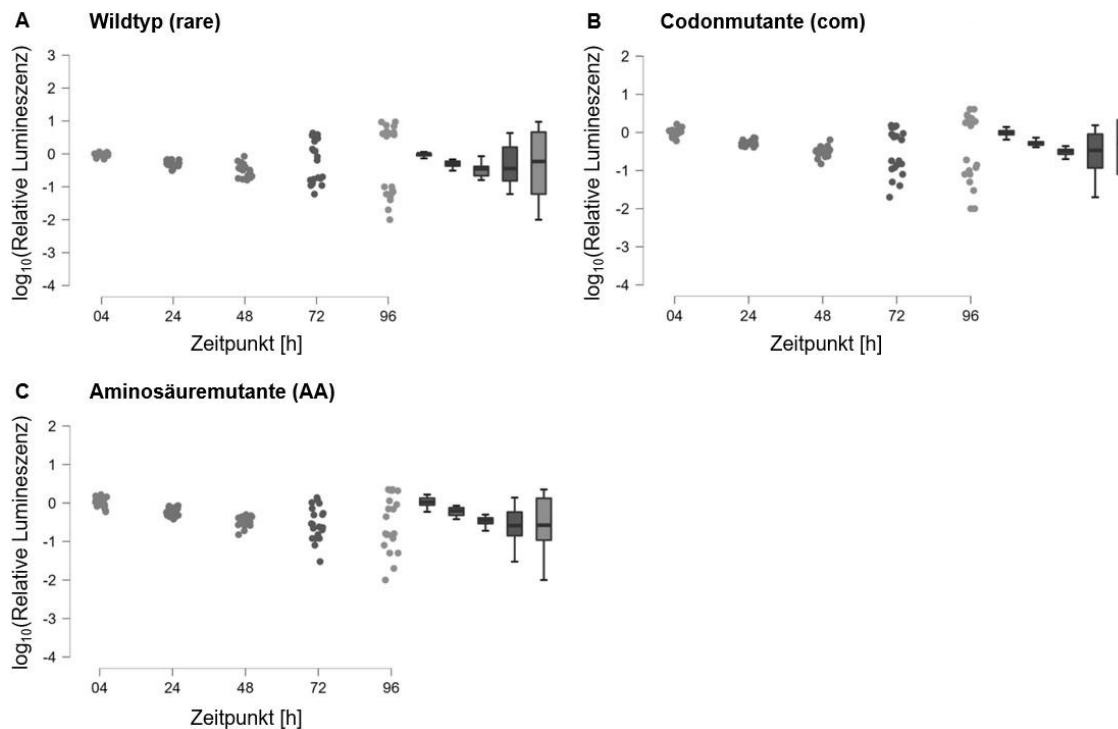


Abbildung 2-2: Regenwolke-Diagramm zur Darstellung der Streuung. Beispielhaft dargestellt ist hier die Streuung der logarithmierten relativen Lumineszenz für das Konstrukt SLI-III-EMCV-HiB, aufgeteilt nach dem Faktor Zeitpunkt. Die separaten Plots entsprechen der Merkmalsausprägung der NS5B-Mutation. In (A) ist die Faktorstufe „rare“, in (B) „com“ und in (C) „AA“ dargestellt. Die Streuung der Werte ist zu den frühen Zeitpunkten (4 – 48 h) sehr gering und Varianzhomogenität gegeben. Erst zu den späteren Zeitpunkten zeigt sich eine erhöhte Variabilität. Diese ist aber über alle Merkmalsausprägungen des Faktors NS5B-Mutation hinweg konsistent. Sowohl bei 72 h als auch bei 96 h sind zwei Punktwolken zu erkennen, die durch die Aktivität der Polymerase als aktiv („+“) oder inaktiv („-“) zu erklären sind. Abbildung erstellt mit JASP.

Auch wenn die ANOVA bei gleichen Stichprobengrößen als recht robust gegenüber Voraussetzungsverletzungen gilt, kann es durch das multiple Testen (d. h. ein Wert wird für mehrere Vergleiche verwendet) bei inhomogenen Varianzen zu Verzerrungen des Signifikanzniveaus im Post-hoc-Test kommen (Lee und Lee 2018). Eine Homogenitätskorrektur nach Welch ist für die 3-faktorielle ANOVA allerdings nicht verfügbar. Ohne Korrektur kann sich bei Verletzung des Kriteriums der Varianzhomogenität das Risiko erhöhen, fälschlicherweise Gruppenunterschiede anzunehmen und die Nullhypothese zu verwerfen („alpha-Fehler“) (Lee und Lee 2018). Um diesem Fehler entgegenzuwirken, wurde in den Post-hoc-Tests die konservative Bonferroni-Korrektur verwendet und dadurch strengere Vorgaben an das Signifikanzniveau gestellt (Lee und Lee 2018). Das Signifikanzniveau wurde für alle Vergleiche wie folgt festgelegt: $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ und $p < 0,001^{***}$.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines Design der Konstrukte

Zunächst wurde ein einheitliches Mutations- und Detektionskonzept entwickelt, das allen Replikons, die im Laufe der Arbeit entworfen wurden, zugrunde liegt. Zur Testung der Hypothese, dass die konservierten seltenen (d. h. ineffizienten) Codons in der NS5B-Region funktionell relevant für die Translation und/oder Replikation des HCV seien, wurde ein Konstrukt erstellt, das sich nur durch vier stille Mutationen von der Wildtypsequenz unterscheidet („Codonmutante“) (Abbildung 3-1).

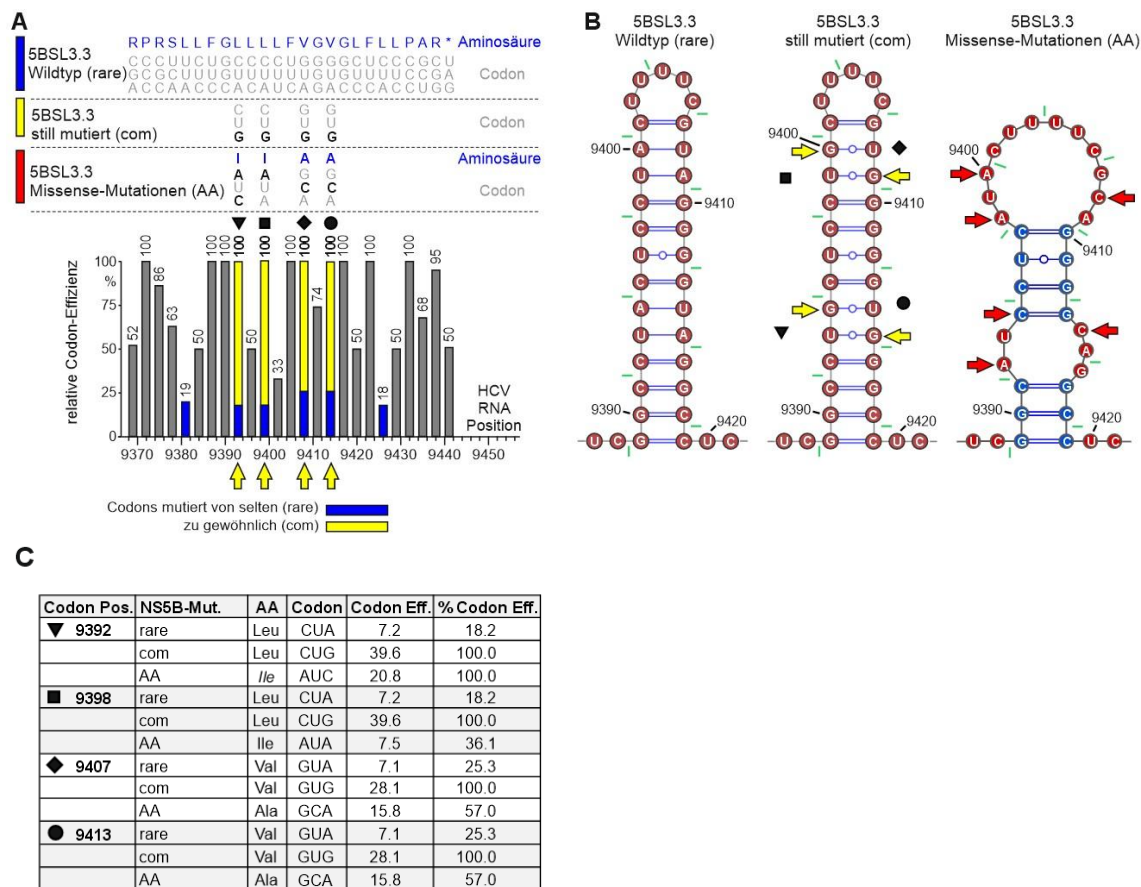


Abbildung 3-1: Mutation der Wildtypsequenz. (A) Ausschnitt der C-terminalen NS5B codierenden Region des Wildtyps und der Mutanten. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Wildtyps (Einbuchstabencode; blau) mit den unter den HCV-Isolaten gängigen, korrespondierenden Codons. Darunter sind die Punktmutationen der ineffizienten (schwarze Symbole bzw. gelbe Pfeile) zu effizienten Codons (gelb) gezeigt und die damit einhergehende Steigerung der relativen Codoneffizienz (Säulendiagramm). Die Effizienz der Codons ist der Datenbank für Codonverwendung für *Homo sapiens* entnommen (Nakamura et al. 2000). Unterhalb sind die Missense-Mutationen und die daraus folgenden Änderungen der Aminosäuresequenz dargestellt (rot). (B) zeigt die Veränderung der Sekundärstruktur von 5BSL3.3 durch Mutation der ineffizienten zu effizienten Codons (Mitte) bzw. der Missense-Mutationen (rechts) im Vergleich zum Wildtyp (links). (C) stellt die vorgenommenen Mutationen und die Auswirkungen auf die Effizienz (Abk. „Eff.“) der einzelnen Codons im Detail dar. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

Aufbauend auf den Ribosome Profiling Ergebnissen von G. Gerresheim wurden hierfür die zwei ineffizienten (seltenen, engl. *rare*) Leucincodons (Leu) an Position 9392

und 9398 sowie die zwei ineffizienten Valincodons (Val) an Position 9407 und 9413 des Jc1-Genoms zu häufigen (engl. *common*; Abk. „com“), also effizienten Triplets mutiert (Abbildung 3-1A). Das seltene Leucincodon CUA wurde gegen das effiziente Leucincodon CUG und das seltene Valincodon GUA gegen das effiziente Valincodon GUG ausgetauscht. Die relative Codoneffizienz wurde dadurch von 18 % (Leu) bzw. 25 % (Val) auf 100 % gesteigert (Abbildung 3-1C). Die Effizienzsteigerung resultierte jeweils aus dem Austausch der ineffizient decodierenden Wobble-Base Adenosin durch die effizient decodierende nicht-Wobble-Base Guanodin. Um die Verhältnisse so natürlich wie möglich zu halten, wurden – abgesehen von Position 9413 – ausschließlich effiziente Triplets verwendet, die auch in natürlichen HCV-Isolaten vorkommen. Die Aminosäuresequenz und damit die Struktur des resultierenden Proteins blieben durch die stillen Mutationen unverändert, ebenso die Sekundärstruktur der zugrundeliegenden RNA (Abbildung 3-1A, B: mittlere Struktur).

Als Kontrolle diente ein Konstrukt, bei dem sowohl die Aminosäuresequenz als auch die Sekundärstruktur von 5BSL3.3 verändert wurden (Abbildung 3-1A, B: rechte Struktur). Dazu wurden in der Wildtypsequenz an denselben Positionen Missense-Mutationen (engl. *missense* = Fehlsinn) statt stillen Mutationen eingeführt („Aminosäuremutante“; Abk. „AA“). Da Mutationen in funktionell relevanten Regionen wie der NS5B codierenden Region möglicherweise letal wirken (Lohmann 2013), wurden nur diskrete Veränderungen vorgenommen. Die beiden Leucincodons wurden zu Isoleucincodons und die beiden Valincodons zu Alanincodons mutiert (Abbildung 3-1C). So fand eine Mutation zu anderen, aber trotzdem ähnlichen Aminosäuren mit hydrophoben Resten statt.

Zur Messung der Translations- und Replikationsleistung wurde HiBiT (Abk. „HiB“; Aminosäuresequenz: VSGWRLFLIS) in alle Replikons eingebaut. Die HiBiT-Insertion erfolgte je nach Replikon an unterschiedlichen Positionen des Genoms, allerdings stets strangabwärts der IRES, die auch die Translation der viralen Proteine antrieb. Dadurch wurde HiBiT in derselben Menge wie die viralen Proteine in der Zelle produziert und eignete sich so zur Erfassung der Translation der transfizierten RNAs. Da bei den replikationsfähigen Replikon-RNAs nach ihrer Replikation über Minusstränge zu Nachkommen-Plussträngen letztere auch wieder mit der gleichen Effizienz pro RNA translatiert werden, sind die Ergebnisse des HiBiT-Assays damit indirekt auch ein Maß für die Replikation der RNAs.

3.2 Etablierung eines geeigneten Replikonsystems

Um die Effekte der Mutationen in der NS5B-Region testen zu können, musste ein geeignetes Replikonsystem mit ausreichend starker Translations- und

Replikationsfähigkeit sowie eine geeignete HiBiT-Insertionsstelle experimentell etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Replikons kloniert, im HiBiT-Assay getestet und ausgehend vom Ergebnis gegebenenfalls weiterentwickelt. Alle Klonierungen erfolgten nach dem Baukastensystem, ausgehend von Plasmiden für das Wildtypkonstrukt als "Vektor" bzw. Rückgrat (engl. *Backbone*) und Plasmiden mit der mutierten NS5B-Region und/oder HiBiT als Einfügungen (engl. *Inserts*). Die konstruktsspezifischen Unterschiede werden jeweils im Abschnitt „spezielle Klonierungsschritte“ erläutert und die Ergebnisse dargestellt.

Allgemein wurden die Plasmide zunächst zur Vermehrung durch eine schnelle Transformation in *E. coli* eingebracht (2.2.1.4.2) und daraus anschließend durch eine Minipräparation in ausreichender Menge isoliert (2.2.1.5.2). Nach der Konzentrationsbestimmung mithilfe des Qubit-Fluorometers (2.2.2.12) erfolgten ein Restriktionsverdau von 10 µg DNA zur Fragmentierung der Plasmide und nachfolgend nur für das Backbone eine Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmid-DNA (2.2.2.1 – 2.2.2.2). Die Ansätze wurden anschließend durch eine SYBR Gold Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.2.5.2), sodass Backbone- und Insert-DNA durch das Ausschneiden der jeweiligen Bande isoliert werden konnten. Nach der Gelaufreinigung (2.2.2.6) und erneuter Konzentrationsbestimmung mittels Qubit wurden Backbone und Insert über Nacht ligiert (2.2.2.3). Zur Optimierung der Ligation wurden verschiedene Verhältnisse von Vektor zu Insert getestet. Die besten Ergebnisse wurden für Ligationsansätze mit einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:2 erzielt. Im Anschluss an die Ligation war die Durchführung einer Standardtransformation erforderlich, um die neu ligierten Plasmide zur Vermehrung effizient in *E. coli* einzubringen (2.2.1.4.1). Die Plasmide wurden danach wieder durch eine Minipräparation extrahiert, die DNA-Konzentration mittels Qubit bestimmt und der Klonierungserfolg durch Sanger Sequenzierung (2.2.2.7) überprüft. Zur Gewinnung von größeren Mengen der Plasmid-DNA erfolgte bei fehlerfreier Klonierung eine schnelle Transformation in *E. coli* mit anschließender Maxipräparation zur Plasmidextraktion (2.2.1.5.1) und Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure-Lösung per Qubit.

In Vorbereitung auf die Transkription wurden die isolierten Plasmide nachfolgend durch einen Restriktionsverdau unmittelbar strangabwärts des T7-Terminators linearisiert, mit Phenol-Chloroform gereinigt und mit Ethanol präzipitiert (2.2.2.10 – 2.2.2.11). Nach der Konzentrationsbestimmung mittels Qubit wurden die DNA-Konstrukte durch die *in vitro*-Transkription in RNAs umgeschrieben (2.2.2.8). Zur Entfernung der DNA-, Salz- und Proteinreste schlossen sich ein DNase-Verdau (2.2.2.9), eine erneute Phenol-Chloroform-Aufreinigung und eine Präzipitation mit Ethanol an. Bei positiver Integritätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden

die RNA-Konstrukte nachfolgend in Huh-7.5 Hepatomzellen transfiziert (2.2.3.6). Zur Testung der Translations- und Replikationsleistung wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten lysiert und die Lumineszenz der „NanoLuc“ Luciferase im HiBiT-Assay gemessen (2.2.3.7).

3.2.1 Minimales HCV-Konstrukt (pHCV-HiB-NS5B-26AS)

Mit dem Ziel, isoliert den Einfluss der ineffizienten Codons auf die Translation testen zu können, wurde zunächst ein stark reduziertes Konstrukt (pHCV-HiB-NS5B-26AS) entworfen, das lediglich die beiden viralen Genomenden (HCV 5'UTR, 3'UTR) und 26 Aminosäuren der terminalen NS5B codierenden Region enthielt (Abbildung 3-2).

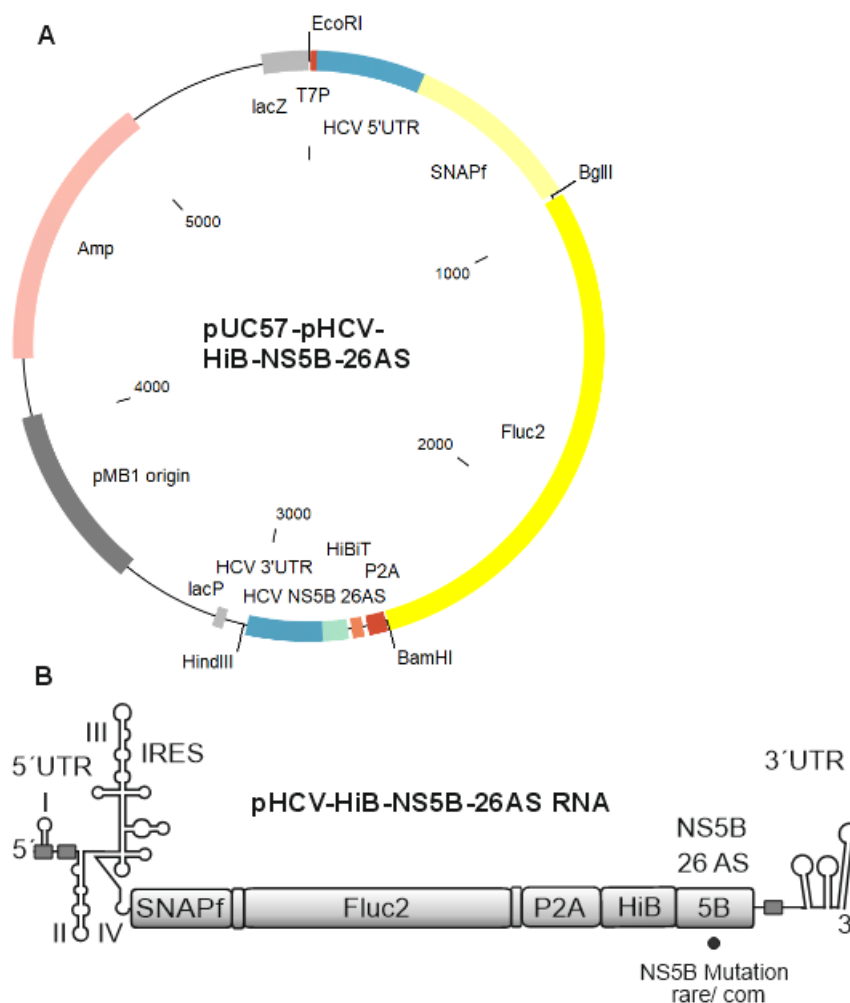


Abbildung 3-2:
Aufbau des Konstrukts pHCV-HiB-NS5B-26AS. (A) zeigt die Karte des finalen Plasmids pUC57-pHCV-HiB-NS5B-26AS, das nur die beiden viralen Genomenden (HCV 5' bzw. 3'UTR, blau) und 26 Aminosäuren der NS5B codierenden Region (HCV NS5B 26AS, türkis) enthält. Die seltenen Codons sind in dem 26 Aminosäuren umfassenden Ausschnitt der NS5B codierenden Region enthalten (türkis). Das Plasmid wurde in zwei Ausführungen kloniert: Beim Wildtyp wurden die seltenen Codons nicht verändert (rare), während sie beim Mutanten still zu effizienten, gebräuchlichen Codons mutiert wurden (com; Punkt). Zur Detektion der Translationsleistung wurde die HiBiT-Sequenz in beiden Versionen direkt

strangaufwärts der HCV-AS eingebaut (HiBiT, orange). Die Schnittstellen der für die Klonierung relevanten Restriktionsenzyme sind in schwarz dargestellt. Die einzelnen Elemente der Plasmidkarte sind detailliert im Anhang gezeigt (Tabelle 11-1). Erstellt wurde die Plasmidkarte mit dem Programm „Clone Manager 11“. Durch *in vitro*-Transkription mit dem T7-Promotor als Startpunkt (T7P, rot) und der Schnittstelle von *HindIII* als Endpunkt entsteht das in (B) dargestellte RNA-Konstrukt. Die typischen Schleifenelemente der nicht-translatierten Regionen sind eingezeichnet und die Bindungsstellen der microRNA-122 mit Boxen markiert. Die Translation des ORFs wird durch die HCV-IRES angetrieben.

Durch das Fehlen der proteincodierenden Regionen für NS3 – NS5A und des Großteils der NS5B codierenden Region war das Konstrukt nicht replikationsfähig und

eignete sich ausschließlich zur Testung von Auswirkungen auf die Translation. Es ist also streng genommen kein "Replikon"-System.

Zur sensitiven Messung der Translation wurde die elf Aminosäuren lange HiBiT-Peptid-Sequenz strangaufwärts der 26 HCV-AS mit Glycin-Serin-Linkern zu beiden Seiten eingebaut. Zwischen dem seltenen Valincodon im Zentrum des zweiten Peaks der Ribosome Profiling Reads (Abbildung 1-4A) und der Insertionsstelle der HiBiT-Peptid-Sequenz liegen 20 AS. Ausgehend davon, dass der ribosomale Exittunnel 30 – 40 AS bedeckt (Liutkute et al. 2020), müsste das HiBiT-Peptid bei einem Pausieren des Ribosoms auf dem seltenen Valin-Codon noch vollständig ungefaltet im ribosomalen Austrittstunnel liegen. Da im ungefalteten Zustand keine HiBiT-Detektion möglich sein sollte, könnte ein Pausieren der Ribosomen so über mehrere Translationsrunden zu einer verminderten HiBiT-Expression führen. Zur Provokation dieses Effekts wurde der Ausschnitt der NS5B codierenden Region auf 26 AS limitiert. Da die Proteinmarkierung durch das HiBiT-Tag (engl. *tag* = Etikett) in der Arbeitsgruppe noch nicht etabliert war, enthält das Konstrukt mit den codierenden Sequenzen für das SNAP-Protein (SNAPf) und die Firefly Luciferase 2 (Fluc2) noch zwei alternative Detektionssysteme als Backup. Die Translation der Tagging-Proteine und der Luciferase wird genauso wie die Translation der HCV-AS von der HCV-IRES angetrieben. Die Sequenz strangabwärts der Fluc2 codiert für das P2A-Peptid (P2A), das zwei Proteine eines ORFs cotranslational trennen kann. Hier diente es zur Spaltung zwischen den durch HiBiT-getaggen 26 HCV-AS und den im selben Leseraster davor liegenden anderen beiden Detektionsproteinen. Das reduzierte Konstrukt wurde in der Version Wildtyp (pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare) und Codonmutante (pHCV-HiB-NS5B-26AS-com) kloniert (3.1).

3.2.1.1 Spezielle Klonierungsschritte

Zum Einbringen der beschriebenen stillen Mutationen in den Ausschnitt der NS5B codierenden Region wurden das Backbone-Plasmid (pUC57-pHCV-SNAPf-Fluc2) und die Insert-Plasmide (pUC57-pP2A-HiB-NS5B-26AS-rare/-com) mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* fragmentiert und Vektor und Insert nach Gelaufreinigung über Nacht ligiert. Zur Erfolgskontrolle wurden die entstandenen Plasmide (pUC57-pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare/-com) mit den genannten Restriktionsenzymen verdaut und die Insert-/Backbone-Banden auf einem Agarosegel abgeglichen (Abbildung 3-3A).

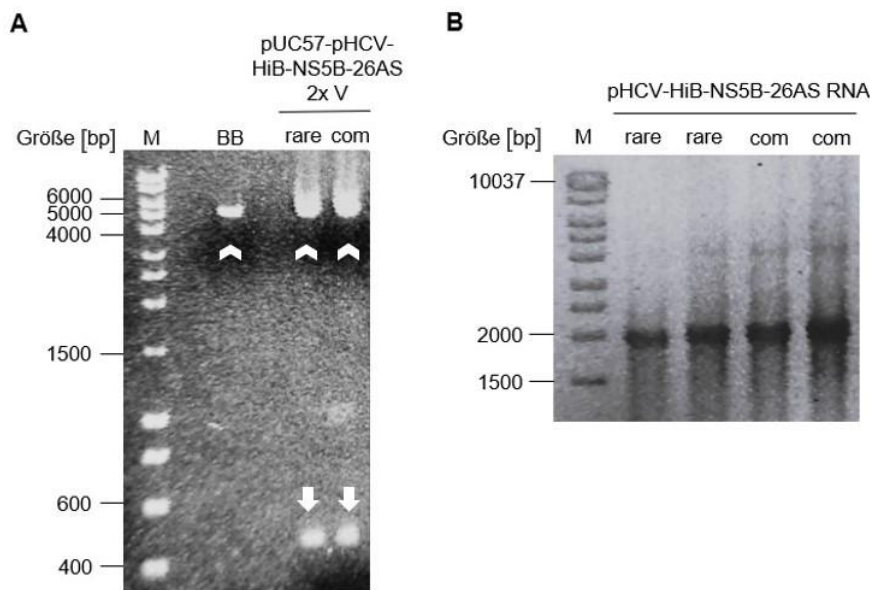


Abbildung 3-3: Weg der Klonierung des Konstrukts pHCV-HiB-NS5B-26AS in Gelbildern. (A) entspricht dem 1,2 %-igen Kontrollgel nach der Ligation der finalen Plasmide (pUC57-pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare/-com). Um sicherzustellen, dass die Ligation erfolgreich war, wurden die Plasmide mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut (2x V) und die entstehenden Backbone- und Insert-Banden abgeglichen. Die Backbone-Banden liefen auf derselben Höhe wie die Kontrollbande (BB, Pfeilspitzen) und die Insert-Banden (ca. 470 bp, Pfeile) auf der korrekten Höhe (Insert-Kontrollbande nicht dargestellt). (B) zeigt ein 0,8 %-iges Agarosegel zur Kontrolle der RNA-Konstrukte nach *in vitro*-Transkription. Oberhalb der deutlichen RNA-Banden (auf Höhe von ca. 2000 bp des DNA-Markers) sind in allen Ansätzen noch schwache Banden durch Reste der Template-DNA zu sehen. Als Marker (M) wurde auf allen Gelen HyperLadder I verwendet.

Vor *in vitro*-Transkription wurden die Plasmide mit *Hind*III linearisiert, um mit der HCV 3'UTR ein definiertes Ende der RNA-Transkripte (pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare/-com) zu erhalten. Die Integrität aller RNA-Transkripte wurde vor der Transfektion mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 3-3B).

3.2.1.2 HiBiT-Assay

Für die Transfektion in Huh-7.5 Hepatomzellen wurden 0,3 pmol RNA/12-Well eingesetzt. 4 h, 8 h und 24 h nach der Lipofektion erfolgten HiBiT-Assays, um die Proteinexpression zu dem gegebenen Zeitpunkt über das Lumineszenzsignal zu erfassen. Die Testung erfolgte hier ausschließlich zu frühen Zeitpunkten, da die Konstrukte (pHCV-HiB-NS5B-26AS-rare/-com) nicht replikationsfähig waren. In dem Design wurde der Versuch insgesamt 3 x mit RNAs von unterschiedlichen *in vitro*-Transkriptionen durchgeführt (n = 3).

In Abbildung 3-4 sind die relativen Lumineszenzsignale für die beiden Konstrukte und die mitgeführte Negativkontrolle („Mock“, graue Säulen) im Zeitverlauf dargestellt. Der Messwert des Wildtypkonstrukts bei 4 h wurde als Referenzwert auf eins gesetzt („Normalisierung“) und weist daher keine Streuung auf (blaue Säule bei 4 h). Alle anderen Messwerte – inklusive der Mock-Werte – sind dazu ins Verhältnis gesetzt.

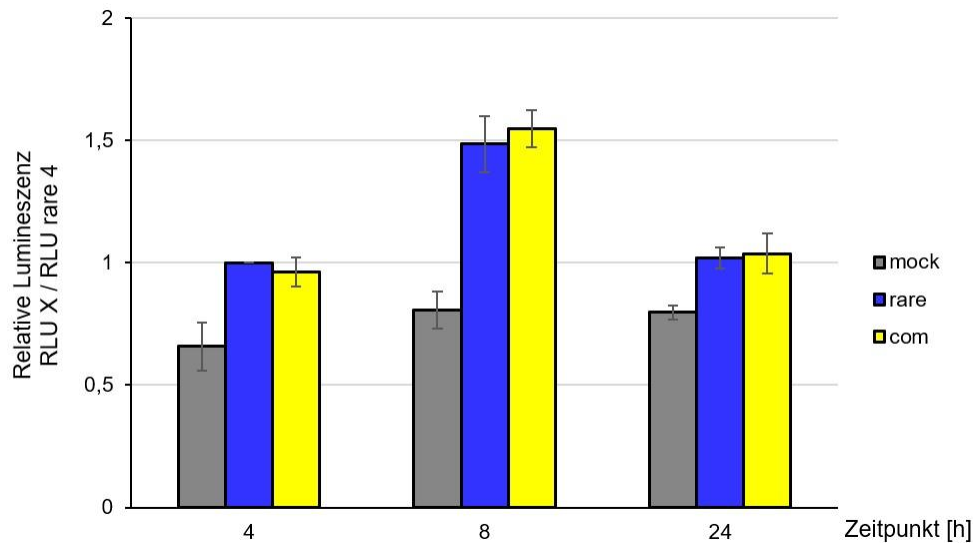


Abbildung 3-4: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit pHCV-NS5B-26AS-rare/com. Grafisch dargestellt sind die Lumineszenzsignale für das Wildtypkonstrukt („rare“ = ineffizient, blaue Säulen), die Codonmutante („com“ = effizient, gelbe Säulen) sowie die mitgeführte Negativkontrolle ohne transkribierte RNA (Mock, graue Säulen) im Zeitverlauf. Alle Werte sind auf das Wildtypkonstrukt zum Zeitpunkt 4 h („rare 4“) normalisiert. Für jeden Zeitpunkt ist die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Anzahl unabhängiger Versuche betrug 3 (n = 3).

Durch eine zunehmende HiBiT-Expression, d. h. zunehmende Translation der RNAs, nahm das Lumineszenzsignal vom 4 h- auf den 8 h-Zeitpunkt zunächst bei beiden Konstrukten durchschnittlich um das 0,5-fache zu (blaue/gelbe Säulen bei 8 h). Danach sank es auf den 24 h-Zeitpunkt hin nahezu auf Hintergrundniveau ab (Säulen bei 24 h). Zwischen dem Wildtypkonstrukt und der Codonmutante war zu keinem Zeitpunkt ein wesentlicher Unterschied in der HiBiT-Expression zu erkennen. In dem Konstrukt gab es somit keinen Hinweis darauf, dass die Mutation der seltenen zu häufigen Codons die Translationseffizienz der RNAs beeinflusst. Allerdings konnte in den HiBiT-Assays bei Betrachtung der Rohdaten für beide Konstrukte nur ein schwaches Lumineszenzsignal („rare/com“ durchschnittlich 1094 RLU bei 4 h, 1692 RLU bei 8 h) bei verhältnismäßig hohem Hintergrund (Mock durchschnittlich 729 RLU bei 4 h, 897 RLU bei 8 h) gemessen werden.

Fazit: HiBiT-Assays konnten erfolgreich durchgeführt werden und wurden daher auch bei den Folgekonstrukten verwendet. Zwischen dem Wildtypkonstrukt und der Codonmutante zeigte sich über den gesamten Zeitverlauf kein wesentlicher Unterschied in der HiBiT-Expression und insgesamt nur ein sehr geringes Lumineszenzsignal in Relation zum Hintergrund. Auswirkungen auf die Replikation konnten nicht getestet werden.

3.2.2 Subgenomische Replikons des Hepatitis C Virus

Mit der Vermutung, dass die geringe HiBiT-Expression durch das minimalistische Konstruktdesign bedingt war, und dem Anspruch, potenzielle Auswirkungen auf die Replikation zu erfassen, erfolgte der Wechsel in das bereits etablierte subgenomische HCV-Replikon-System von L. Shalamova. Im Gegensatz zum ersten Konstrukt enthalten die subgenomischen Replikons alle Sequenzen für RNA-Strukturelemente und Proteine, die für die intrazelluläre Replikation der Replikon-RNA essentiell sind. Insbesondere für die Konstrukte SLI-III und 5'UTR-Core konnte in den Experimenten von L. Shalamova bereits eine deutliche Plus- und Minusstrangsynthese sowie die Produktion von viralen Proteinen beobachtet werden, weshalb diese beiden für die nachfolgenden Versuche verwendet und entsprechend modifiziert wurden (1.3.3).

Abgesehen von charakteristischen Unterschieden am 5'-Ende folgen die Replikons einem gemeinsamen Grundaufbau. Der ORF enthält alle für die intrazelluläre Replikation der Replikon-RNA essentiellen NS3 – NS5B codierenden Regionen des JFH1-Isolats. Strangaufwärts des ORFs ist die EMCV-IRES eingebaut, die die Translation der nicht-strukturellen Proteine unabhängig von der HCV-IRES antreibt. So bleibt die Translation der essentiellen Proteine auch bei der Einführung von Mutationen, die den Initiationsmechanismus über die HCV-IRES stören könnten, gewährleistet. Unmittelbar strangabwärts der HCV 3'UTR liegt das selbstschneidende HDV-Ribozym und der T7-Terminator, der eine über das Ribozym hinausgehende Transkription durch die T7-Polymerase verhindern soll.

Durch das Einführen der in 3.1 beschriebenen Mutationen in der NS5B codierenden Region entstanden neben dem Wildtypkonstrukt („rare“) die Codonmutante („com“) und die Aminosäuremutante („AA“). Um Rückschlüsse auf die Replikation ziehen zu können, wurden alle Konstrukte jeweils in einer replikationsfähigen (GDD, Pol +) und einer als Negativkontrolle dienenden, replikationsdefizienten Variante (GND, Pol -) kloniert (1.3.3). Der Einbau der HiBiT-Sequenz erfolgte an unterschiedlichen Positionen und wird im jeweiligen Abschnitt erläutert.

3.2.3 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt

Zunächst wurde mit dem 5'UTR-Core-Konstrukt gearbeitet. Es enthält als einziges Replikon die gesamte HCV 5'UTR, inklusive des in SL IV lokalisierten AUG-Startcodons, und kann so eine funktionelle Translation über die HCV-IRES initiieren. Hinter der 5'UTR liegt die codierende Region für das Core-Protein, dessen Translation über die HCV-IRES angetrieben wird. Die Translation der nicht-strukturellen Proteine NS3 – NS5B wird, wie zuvor beschrieben, durch die EMCV-IRES initiiert (Abbildung 3-5).



Die HiBiT-Insertion erfolgte mit Glycin-Serin-Linkern (GGGSGG) zu beiden Seiten zwischen dem nicht-konservierten Arginincodon 543 und Leucincodon 544 in die Sequenz TPLPEAR-LLDLSS (NS5B AS 537 – 549). Die Insertionsstelle befindet sich in der C-terminalen NS5B codierenden Region, ca. 20 Aminosäuren strangaufwärts des Membranankers der Polymerase, in einem sehr kurzen weniger stark konservierten Abschnitt einer auf der Oberfläche von NS5B liegenden α -Helix (Mosley et al. 2012). Dies ließ hoffen, dass die Aktivität der NS5B-Replikase durch die Insertion nicht vollständig inaktiviert wird. So sollte die NS5B-Replikase selbst durch das HiBiT-Tag markiert werden, allerdings mit dem Risiko, die Polymerase durch die Insertion doch zu

schädigen. Der restliche Aufbau entspricht dem gemeinsamen Grundaufbau aller subgenomischen Replikons von L. Shalamova (3.2.2).

3.2.3.1 Spezielle Klonierungsschritte

Als Ausgangsplasmid diente das 5'UTR-Core-Konstrukt von L. Shalamova in der replikationsfähigen bzw. -defizienten Variante (pUC18-5'UTR-Core-GDD/GND). Zur Modifikation der NS5B codierenden Region wurden drei Plasmide erstellt, die sich in der Ausprägung der NS5B-Mutation unterschieden (pUC57-NS5B-HiB-rare/-com/-AA-3'UTR-HDV-T7T). In den Ausschnitt der NS5B codierenden Region wurde die HiBiT-Peptid-Sequenz eingebaut und die seltenen Codons entweder unverändert belassen („rare“), still mutiert („com“) oder durch Missense-Mutationen („AA“) verändert. Die Mutationen wurden über die bestehenden Restriktionsstellen *EcoRV* und *EcoRI* eingefügt, sodass alle Plasmide die dazwischenliegende, modifizierte DNA-Sequenz enthalten. Für die Klonierung wurden die Plasmide in *E. coli* vermehrt, durch eine Minipräparation wieder extrahiert und daraufhin mit *EcoRV* und *EcoRI* fragmentiert. Mittels SYBR Gold Agarose-Gelelektrophorese wurden die beiden Backbones sowie die drei Inserts gewonnen und nach der Aufreinigung in allen Kombinationen ligiert. So entstanden insgesamt sechs Plasmide (pUC18-5'UTR-Core-GDD/-GND-NS5B-HiB-rare/-com/-AA) (Abbildung 3-6A).

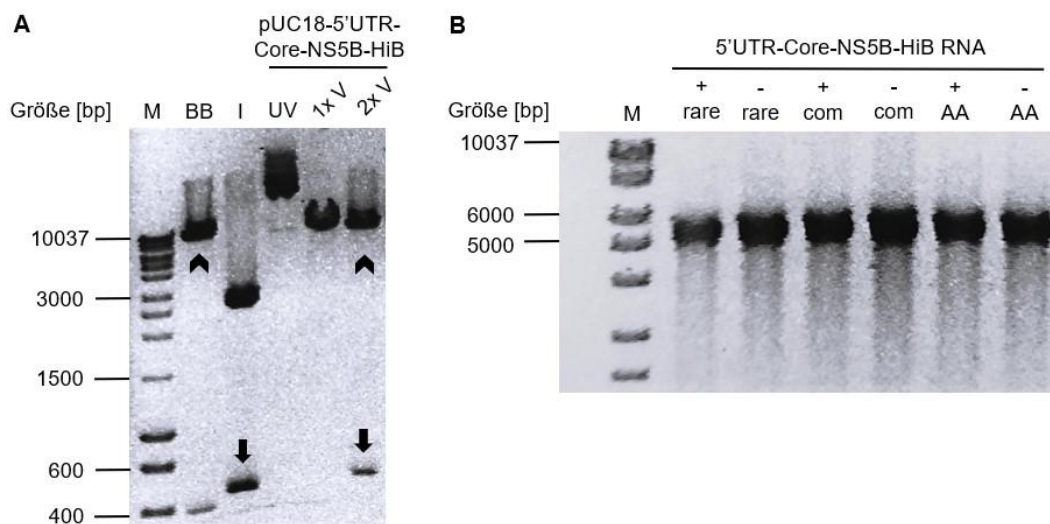


Abbildung 3-6: Weg der Klonierung des 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukts in Gelbildern. (A) zeigt ein 1,2 %-iges Kontrollgel nach der Ligation der finalen Plasmide (pUC18-5'UTR-Core-GDD/-GND-NS5B-HiB). Die Aktivität der NS5B-Polymerase der Konstrukte ist je nach Mutation vereinfacht als intakt (+) oder defekt (-) dargestellt. Zur Kontrolle des Klonierungserfolgs wurden das Backbone-Plasmid (BB, ca. 9660 bp, Pfeilspitzen) und das Insert-Plasmid (I, ca. 650 bp, Pfeile) doppelt mit *EcoRV* und *EcoRI* verdaut und die Banden mit denen der ligierten Plasmide nach Doppelverdau (2x V) verglichen. Die ligierten Plasmide sind darüber hinaus linearisiert (1x V) mit *EcoRI* und unverdaut (UV) gezeigt. (B) zeigt ein 0,8 %-iges Agarosegel zur Integritätskontrolle aller RNA-Konstrukte nach *in vitro*-Transkription vor der Transfektion. Als Marker (M) wurde auf allen Gelen HyperLadder I verwendet.

Abbildung 3-6A zeigt die ligierten Plasmide zum einen nach Doppelverdau mit *EcoRV* und *EcoRI* (2x V) zum Abgleich der Insert-Banden (Pfeile) sowie Backbone-Banden (Pfeilspitzen) und zum anderen linearisiert mit *EcoRI* (1x V) vor der *in vitro*-Transkription. Die Integrität aller RNA-Transkripte wurde vor der Transfektion mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 3-6B).

3.2.3.2 HiBiT-Assay

Die Menge der transfizierten RNA wurde im Vergleich zum ersten Konstrukt von 0,3 auf 0,1 pmol RNA/12-Well reduziert, da unter dem Einsatz von 0,3 pmol RNA/Well bei der mikroskopischen Kontrolle der Platten vermehrt tote Zellen nach der Transfektion beobachtet wurden. Experimentell zeigte sich darunter weniger Zelltod bei ausreichend hohem Lumineszenzsignal, sodass die Konzentration für die nachfolgenden Transfektionen beibehalten wurde. Um potenzielle Auswirkungen auf die Replikation detektieren zu können, wurde der Zeitverlauf um den 48 h-Zeitpunkt erweitert. HiBiT-Assays erfolgten somit 4 h, 8 h, 24 h und 48 h nach der Transfektion. Insgesamt wurde der Versuch je nach Mutante 6 x („rare/com“) bzw. 4 x („AA“) mit RNAs von unabhängigen *in vitro*-Transkriptionen durchgeführt (n = 4 bzw. 6).

Die relativen Lumineszenzsignale über den Zeitverlauf sind für alle Konstrukte sowie die Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) in Abbildung 3-7 dargestellt. Alle Messwerte wurden auf das Wildtypkonstrukt bei 4 h nach Transfektion normalisiert, weshalb dieses zu dem Zeitpunkt keine Streuung aufweist (kräftig blaue Säule bei 4 h, kein Fehlerbalken).

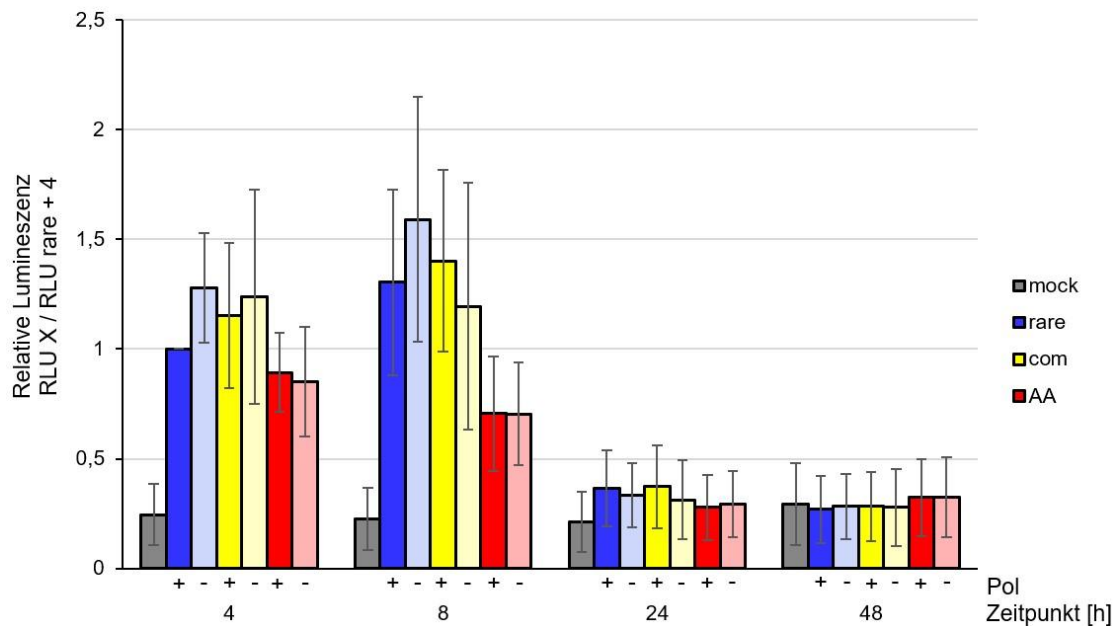


Abbildung 3-7: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit 5'UTR-Core-NS5B-HiB. Grafisch dargestellt sind die Lumineszenzsignale für das Wildtypkonstrukt („rare“ = ineffizient, blaue Säulen), die Codonmutante („com“ = effizient, gelbe Säulen), die Aminosäuremutante („AA“, rote Säulen) und die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) zu den einzelnen Messzeitpunkten. Die replikationsfähigen Konstrukte (farblich kräftige Säulen) sind durch ein (+) und die replikationsdefizienten (farblich blasse Säulen) durch ein (-) gekennzeichnet. Alle Werte sind auf das Wildtypkonstrukt zum Zeitpunkt 4 h („rare + 4“) normalisiert. Für jeden Zeitpunkt ist die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Anzahl unabhängiger Versuche betrug je nach Mutante 4 („AA“) bzw. 6 („rare/com“) (n = 4 bzw. 6).

Während das Lumineszenzsignal für das Wildtypkonstrukt und die Codonmutante durch eine gering zunehmende HiBiT-Expression vom 4 h-Zeitpunkt auf den 8 h-Zeitpunkt zunächst geringfügig anstieg (blaue/gelbe Säulen bei 8 h), nahm es für die Aminosäuremutante bereits zum 8 h-Zeitpunkt leicht ab (rote Säulen bei 8 h). Wohl infolge einer zunehmenden Degradierung der eingebrachten RNAs und Proteine war ab dem 24 h-Zeitpunkt sowohl für die replikationsfähigen (Pol +, farblich kräftige Säulen) als auch für die replikationsdefizienten Konstrukte (Pol -, blasse Säulen) gleichermaßen eine deutliche Abnahme des Lumineszenzsignals zu beobachten. Zum 48 h-Zeitpunkt hin sank die HiBiT-Expression in beiden Gruppen weiter auf Hintergrundniveau (graue Säule bei 48 h) ab, statt wie erwartet nach Replikation in der Gruppe der replikationsfähigen RNAs erneut anzusteigen. Im Vergleich zum zuvor getesteten minimalen Konstrukt (pHCV-HiB-NS5B-26AS) konnte hier mit Blick auf die Rohdaten insgesamt ein deutlich stärkeres Lumineszenzsignal („rare Pol +/-“ durchschnittlich 4082 RLU bei 4 h, 4963 RLU bei 8 h) bei niedrigerem Hintergrund (Mock durchschnittlich 672 RLU bei 4 h, 514 RLU bei 8 h) gemessen werden.

Zur statistischen Auswertung wurden die Rohdaten wie in 2.2.5 beschrieben aufbereitet, analysiert, aufgrund der Log-Normalverteilung transformiert und anschließend eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Polymerase (Pol +/-), NS5B-

Mutation (rare/com/AA) und Zeitpunkt (4 h/8 h/24 h/48 h) durchgeführt. Die deskriptive Statistik ist aus Übersichtsgründen im Anhang dargestellt (11.3.1). In der ANOVA ergab sich ein signifikanter Unterschied des relativen Lumineszenzsignals zu den verschiedenen Zeitpunkten (Faktor Zeitpunkt, $F = 214,687$, $p < 0,001$) und in Abhängigkeit von der Ausprägung der NS5B-Mutation (Faktor NS5B-Mutation, $F = 11,481$, $p < 0,001$) (Tabelle 3-1). Zwischen den RNAs mit aktiver und inaktiver Polymerase konnte kein Unterschied detektiert werden (Faktor Polymerase, $F = 0,160$, $p = 0,976$) (Tabelle 3-1), d. h. es konnte keine Replikation erfasst werden.

Tabelle 3-1: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit 5'UTR-Core-NS5B-HiB. Dargestellt sind die Ergebnisse der ANOVA mit den drei Faktoren Zeitpunkt, NS5B-Mutation und Polymerase. Die Einzelfaktoranalyse ist jeweils über die Stufen der anderen beiden Faktoren gemittelt. Relevante Interaktionen können durch die Analyse von Faktorkombinationen (*) erfasst werden. Der F-Wert setzt die Varianz zwischen den Gruppen ins Verhältnis zu der Varianz innerhalb der Gruppen.

Einflussfaktoren	Freiheitsgrade	Schätzwert (F)	p
Zeitpunkt	3	214,687	< 0,001
NS5B-Mutation	2	11,481	< 0,001
Polymerase (Pol)	1	0,160	0,976
Zeitpunkt * NS5B-Mutation	6	0,736	0,621
Zeitpunkt * Pol	3	0,128	0,943
NS5B-Mutation * Pol	2	0,246	0,782
Zeitpunkt * NS5B-Mutation * Pol	6	0,217	0,971

Die Post-hoc-Vergleiche von den Subgruppen mit unterschiedlicher NS5B-Mutation zeigten – gemittelt über alle Zeitpunkte und ungeachtet der Ausprägung der Polymerase – einen signifikanten Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen der Aminosäuremutante und dem Wildtypkonstrukt ($t = -4,410$, $p_{\text{Bonf}} < 0,001$) sowie der Codonmutante ($t = -4,145$, $p_{\text{Bonf}} < 0,001$) (Tabelle 3-2). Das Wildtypkonstrukt und die Codonmutante unterschieden sich in der HiBiT-Expression nicht voneinander ($p_{\text{Bonf}} = 1$) (Tabelle 3-2). Abbildung 3-8 stellt beispielhaft die Trendkurven für die „GND“-Konstrukte (Pol -) über den Zeitverlauf dar.

Tabelle 3-2: Standard-Post-hoc-Test für den Faktor NS5B-Mutation. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied der Aminosäuremutante („AA“) gegenüber dem Wildtypkonstrukt („rare“) und der Codonmutante („com“) ($p < 0,001^{***}$).

Mutante	Vergleichsgruppe	Mittelwert-differenz	95 % KI		t	p _{Bonf}
			Untere	Obere		
AA	com	-0,319	-0,501	-0,136	-4,145	< 0,001
AA	rare	-0,339	-0,522	-0,156	-4,410	< 0,001
com	rare	-0,020	-0,184	0,143	-0,297	1,0

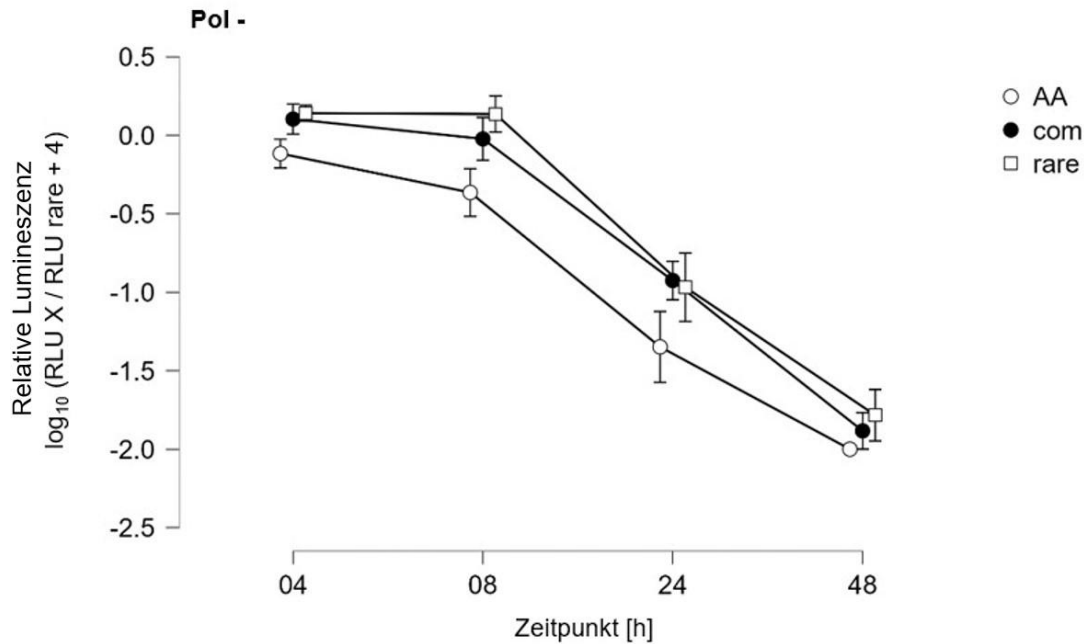


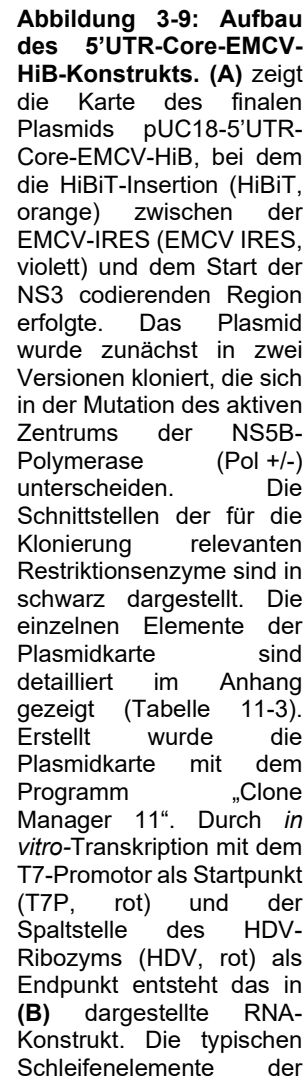
Abbildung 3-8: Deskriptive Abbildung für den Faktor NS5B-Mutation im 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt. Die Ausprägung der NS5B-Mutation ist durch separate Linien dargestellt: Wildtypkonstrukt („rare“, weiße Quadrate), Codonmutante („com“, schwarze Punkte), Aminosäuremutante („AA“, weiße Punkte). Für jeden Zeitpunkt ist der Standardfehler (= Standardabweichung im Verhältnis zur Stichprobenanzahl) als Fehlerbalken eingezeichnet.

Einschränkend müssen allerdings die unterschiedlich große Stichprobenanzahl („rare/com“ $n = 6$ vs. „AA“ $n = 4$) und die fehlende Streuung der Aminosäuremutante bei 48 h (abzüglich Mock nach Datenaufbereitung) beachtet werden, die zur Überschätzung des Signifikanzniveaus führen können (Tabelle 11-6).

Fazit: In den HiBiT-Assays konnte im Vergleich zum ersten Konstrukt ein deutlich stärkeres Lumineszenzsignal detektiert werden. Gemittelt über alle Zeitpunkte war für die Aminosäuremutante eine signifikant geringere HiBiT-Expression zu beobachten, das Wildtypkonstrukt und die Codonmutante hingegen unterschieden sich nicht voneinander. Zwischen den „GDD“- und „GND“-Konstrukten ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede in der HiBiT-Expression, das heißt, die NS5B-Replikase scheint in diesen Konstrukten durch die Insertion des HiBiT-Tags defekt. Auswirkungen auf die Replikation konnten also nicht getestet werden.

3.2.4 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt

Mit der Hypothese, dass die HiBiT-Insertion in der NS5B codierenden Region zu einer Beeinträchtigung der NS5B-Polymerase führte, wurde die HiBiT-Sequenz hier stattdessen unmittelbar strangabwärts des Startcodons der EMCV-IRES eingebaut



Die NS5B-Polymerase wurde so zwar nicht direkt mit dem HiBiT-Peptid markiert ("getaggt"), dafür sollte die Replikation durch die Insertion außerhalb der für die essentiellen Proteine codierenden Regionen aber auch nicht beeinträchtigt werden. Da die Translation des HiBiT-Peptids genau wie die der nicht-strukturellen Proteine durch die EMCV-IRES angetrieben wird, wird es in äquivalenter Menge produziert. Es eignet sich somit, um Aussagen zur Translations- und indirekt auch der Replikationsleistung der Replikons zu treffen, da in den Zellen neu entstandene Plusstränge wieder translatiert werden und ihre Anwesenheit dadurch indirekt gemessen wird. Auf diese Art der indirekten Messung der Abundanz der Replikons über den Umweg ihrer Translation musste hier zurückgegriffen werden, weil zu diesem Zeitpunkt aus technischen Gründen

noch kein Protokoll zur sensitiven und spezifischen Detektion der neu synthetisierten RNA (der Viren oder Replikons) in der Arbeitsgruppe Niepmann existierte. Abgesehen von der HiBiT-Insertionsstelle entspricht der Aufbau dem des 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukts (3.2.3). Das Konstrukt wurde allerdings nur in zwei Versionen (Pol +/-) kloniert, um zunächst isoliert die Replikationsfähigkeit zu testen. Die seltenen Codons in der NS5B codierenden Region wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt modifiziert.

3.2.4.1 Spezielle Klonierungsschritte

Als Ausgangsplasmid diente wieder das 5'UTR-Core-Konstrukt von L. Shalamova in der replikationsfähigen bzw. replikationsdefizienten Variante (pUC18-5'UTR-Core-GDD/-GND). Die Insertion der HiBiT-Peptid-Sequenz erfolgte über die bestehenden Restriktionsstellen *KpnI* und *NotI*. Entsprechend enthielt das Insert-Plasmid die beiden Restriktionsstellen, einen Ausschnitt der C-terminalen EMCV-IRES, die HiBiT-Peptid-Sequenz und einen Glycin-Serin-Linker zur Verknüpfung mit der NS3-codierenden Region (pUC57-EMCV-IRES-HiB-Gly). Für die Klonierung wurden die Plasmide in *E. coli* vermehrt und nach der Isolierung mittels Minipräparation in einem Restriktionsverdau mit *KpnI* und *NotI* fragmentiert. Über eine SYBR Gold Agarose-Gelelektrophorese wurden Backbone- und Insert-DNA gewonnen und nach der Aufreinigung in beiden Kombinationen ligiert. Für die anschließende *in vitro*-Transkription wurden die entstandenen Plasmide (pUC18-5'UTR-Core-GDD/-GND-EMCV-HiB-rare) mit *EcoRI* linearisiert.

3.2.4.2 HiBiT-Assay

Die Transfektion erfolgte mit 0,1 pmol RNA/24-Well. Der Zeitverlauf wurde um einen weiteren späteren Zeitpunkt ergänzt, sodass HiBiT-Assays 4 h, 8 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Lipofektion erfolgten. Der Versuch wurde so insgesamt 4 x mit RNAs von unabhängigen *in vitro*-Transkriptionen durchgeführt (n = 4), wobei der 72 h-Zeitpunkt erst im Verlauf hinzugenommen wurde (n = 2).

In Abbildung 3-10 sind die relativen Lumineszenzsignale für die Replikons sowie die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Alle Messwerte wurden auf das Wildtypkonstrukt bei 4 h nach Transfektion normalisiert, sodass dieses zum 4 h-Zeitpunkt keine Streuung aufweist (kräftig blaue Säule bei 4 h, kein Fehlerbalken).

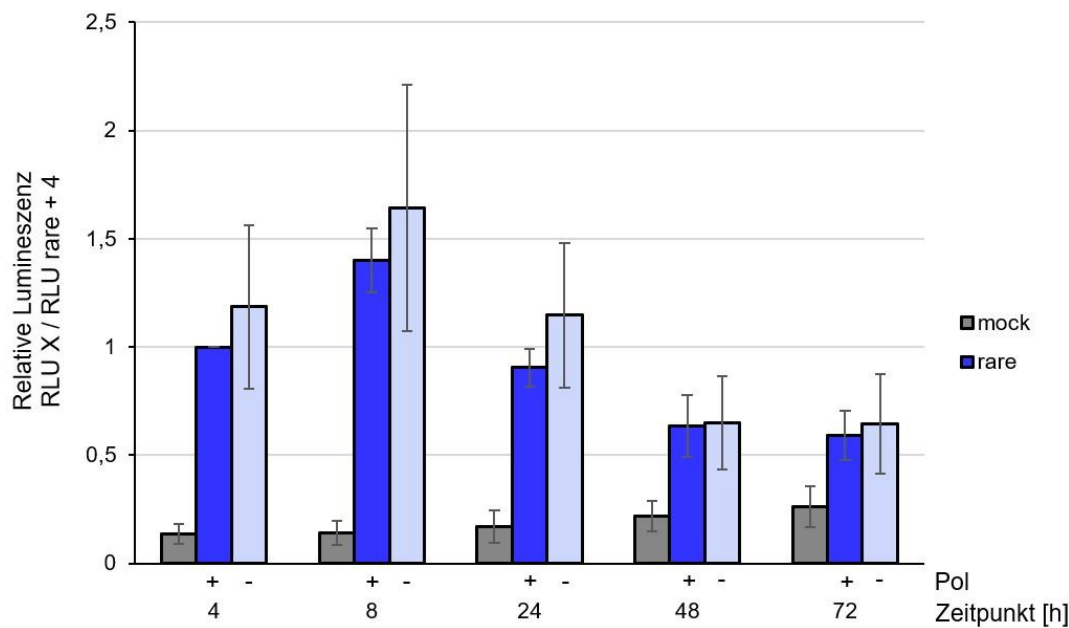


Abbildung 3-10: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit 5'UTR-Core-EMCV-HiB. Grafisch dargestellt sind die Lumineszenzsignale für das Wildtypkonstrukt („rare“ = ineffizient, blaue Säulen) und die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) im Zeitverlauf. Die replikationsfähigen Konstrukte (farblich kräftige Säulen) sind durch ein (+) und die replikationsdefizienten (farblich blasse Säulen) durch ein (-) gekennzeichnet. Alle Werte sind auf das Wildtypkonstrukt zum Zeitpunkt 4 h nach Transfektion („rare + 4“) normalisiert. Für jeden Zeitpunkt ist die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eingezeichnet. Bis 48 h nach der Transfektion wurde der Versuch 4 x, bis zum 72 h-Zeitpunkt 2 x durchgeführt (n = 4 bzw. 2).

Wie bei den zuvor getesteten Replikons zeigte sich durch eine zunehmende HiBiT-Expression, d. h. zunehmende Translation, zunächst ein Anstieg des Lumineszenzsignals vom 4 h- auf den 8 h-Zeitpunkt (blaue Säulen bei 8 h), gefolgt von einer langsamen Signalabnahme bis zum 72 h-Zeitpunkt (blaue Säulen bei 48 h, 72 h). Während das Lumineszenzsignal beim Vorgängerkonstrukt (5'-UTR-Core-NS5B-HiB) 48 h nach der Transfektion bereits auf Hintergrundniveau gesunken war (Abbildung 3-7), lag es hier zu dem Zeitpunkt noch deutlich darüber (Abbildung 3-10). Abzüglich des Hintergrunds betrug es 48 h nach der Transfektion im Durchschnitt noch ca. 48 % des Referenzwerts (Rohwert „rare +“ durchschnittlich 4080 RLU bei 4 h, 2540 RLU bei 48 h vs. Mock durchschnittlich 527 RLU bei 4 h, 844 RLU bei 48 h). Dennoch war zu den späten Zeitpunkten (48 h, 72 h) kein Anstieg des Lumineszenzsignals in der Gruppe der replikationsfähigen Konstrukte (Pol +, kräftige Säulen) im Vergleich zu den replikationsdefizienten (Pol -, blasse Säulen) zu beobachten.

Die aufbereiteten, aufgrund der Log-Normalverteilung transformierten Daten wurden mit einer 2-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Polymerase (Pol +/-) und Zeitpunkt (4 h/8 h/24 h/48 h/72 h) ausgewertet (2.2.5). Die deskriptive Statistik ist aus Übersichtsgründen im Anhang gezeigt (11.3.2). Die ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied der HiBiT-Expression zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (Faktor

Zeitpunkt, $F = 22,712$, $p < 0,001$) (Tabelle 3-3). Zwischen den Gruppen Pol +/- zeigte sich weder gemittelt über alle Zeitpunkte (Faktor Polymerase, $F = 1,690$, $p = 0,205$) noch in Abhängigkeit des Zeitpunkts (Faktoren Polymerase * Zeitpunkt, $F = 0,163$, $p = 0,955$) (Tabelle 3-3, Abbildung 3-11) ein signifikanter Unterschied, d. h. es konnte keine Replikation detektiert werden.

Tabelle 3-3: 2-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit 5'UTR-Core-EMCV-HiB. Dargestellt sind die Ergebnisse der ANOVA mit den zwei Faktoren Polymerase und Zeitpunkt. Die Einzelfaktoranalyse ist jeweils über die Stufen des anderen Faktors gemittelt. Relevante Interaktionen können durch die Analyse von Faktorkombinationen (*) erfasst werden. Der F-Wert setzt die Varianz zwischen den Gruppen ins Verhältnis zu der Varianz innerhalb der Gruppen.

Einflussfaktoren	Freiheitsgrade	Schätzwert (F)	p
Zeitpunkt	4	22,712	< 0.001
Polymerase (Pol)	1	1,690	0,205
Zeitpunkt * Pol	4	0,163	0,955

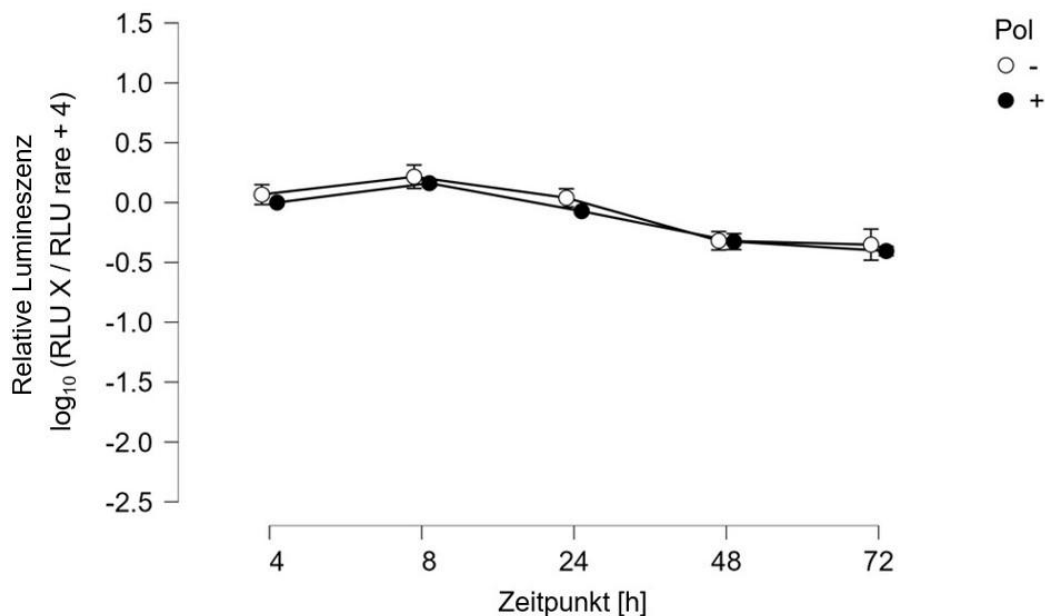


Abbildung 3-11: Deskriptive Abbildung für den Faktor NS5B-Mutation im 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt. Die Ausprägung der Polymerase (Pol +/-) ist durch separate Linien für die Konstrukte mit (Pol -, weiße Punkte) und ohne Polymerasedefekt (Pol +, schwarze Punkte) dargestellt. Für jeden Zeitpunkt ist der Standardfehler (= Standardabweichung im Verhältnis zur Stichprobenanzahl) als Fehlerbalken eingezeichnet.

Fazit: In den HiBiT-Assays zeigte sich zu den späteren Zeitpunkten (48 h, 72 h) zwar ein gegenüber dem Hintergrund noch deutlich abgrenzbares Lumineszenzsignal, aber kein Unterschied zwischen den replikationsfähigen und -defizienten Varianten. Das Konstrukt eignete sich somit ebenfalls nicht zur Testung von Auswirkungen auf die Replikation.

3.2.5 SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt

Das SLI-III-Konstrukt enthält nicht die gesamte HCV-5'UTR, sondern nur deren Schleifenelemente I-III (Abbildung 3-12). Es ermöglicht zwar die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit und des Initiationsfaktors eIF3, kann aber mangels des in SL IV gelegenen Startcodons keine funktionelle Translation über die HCV-IRES initiieren.

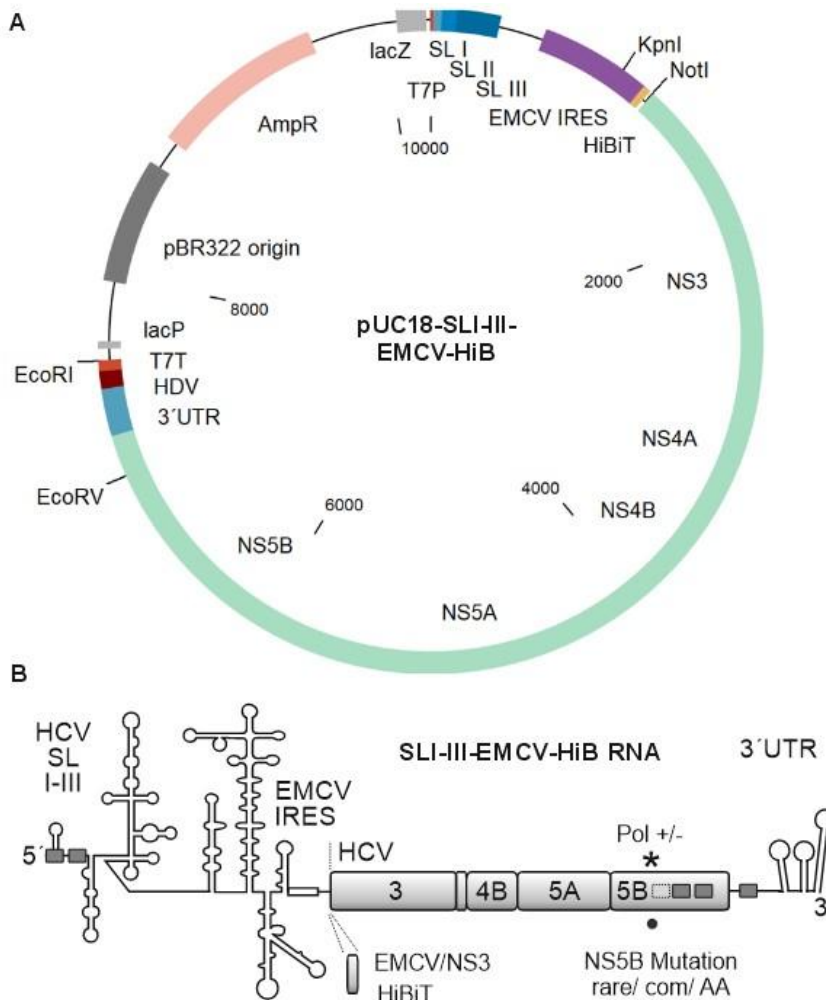


Abbildung 3-12:
Aufbau des SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukts.

(A) zeigt die Karte des finalen Plasmids pUC18-SLI-III-EMCV-HiB, das die Schleifenelemente I-III der HCV-5'UTR enthält. Die HiBiT-Insertion erfolgte zwischen der EMCV-IRES und dem Start der NS3 codierenden Region (HiBiT, orange). Das Plasmid wurde in sechs Versionen kloniert, die sich in der Mutation der seltenen Codons (rare/com/AA) und des aktiven Zentrums der NS5B-Polymerase (Pol +/-) in der NS5B codierenden Region unterscheiden. Die Schnittstellen der für die Klonierung relevanten

Restriktionsenzyme sind in schwarz dargestellt. Die einzelnen Elemente der Plasmidkarte sind detailliert im Anhang gezeigt (Tabelle 11-4). Erstellt wurde die Plasmidkarte mit dem Programm „Clone Manager 11“. Durch *in vitro*-Transkription mit dem T7-Promotor als

Startpunkt (T7P, rot) und der Spaltstelle des HDV-Ribozyms (HDV, rot) als Endpunkt entsteht das in (B) dargestellte RNA-Konstrukt. Die typischen Schleifenelemente der nicht-translatierten Regionen sind eingezeichnet und die Bindungsstellen der microRNA-122 mit Boxen markiert. Die Translation des HiBiT-Proteins sowie der nicht-strukturellen Proteine wird von der EMCV-IRES initiiert. Die in der NS5B codierenden Region eingeführten Mutationen der seltenen Codons (rare/com/AA) sind durch einen Punkt und die der Polymerase durch einen Stern (Pol +/-) gekennzeichnet. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

Die Translation der nicht-strukturellen Proteine und des HiBiT-Proteins wird über die EMCV-IRES angetrieben. Das HiBiT-Tag wurde dazu wie beim Vorgängerkonstrukt direkt strangabwärts der EMCV-IRES eingebaut (Abbildung 3-12) und über einen Glycin-Serin-Linker (GGSGGG) mit der NS3 codierenden Region (Start mit AAPITAYA)

verknüpft. Der restliche Aufbau entspricht dem aller subgenomischen Replikons von L. Shalamova (3.2.2).

3.2.5.1 Spezielle Klonierungsschritte

Als Ausgangsplasmid wurde das SLI-III-Konstrukt von L. Shalamova in der replikationsfähigen bzw. -defizienten Variante verwendet (pUC18-SLI-III-GDD/-GND). Die Einführung der Mutationen in der NS5B codierenden Regionen erfolgte über die Restriktionsstellen *EcoRV* und *EcoRI*. Dazu wurden zwei Plasmide erstellt, die den Ausschnitt der NS5B codierenden Region mit den modifizierten seltenen Codons (com/AA), die HCV-3'UTR, das HDV Ribozym und den T7-Terminator enthielten (pUC57-NS5B-com/-AA-3'UTR-HDV-T7T). Insert- und Backbone-DNA wurden nach der Fragmentierung der Plasmide mit *EcoRV* und *EcoRI* mittels SYBR Gold Agarose-Gelelektrophorese gewonnen und in allen Kombinationen ligiert (pUC18-SLI-III-GDD/-GND-rare/-com/-AA). In die gewonnenen Plasmide wurde nachfolgend wie beim Vorgängerkonstrukt über die Restriktionsstellen *KpnI* und *NotI* die HiBiT-Peptid-Sequenz eingebaut (3.2.4.1), sodass die sechs finalen Plasmide (pUC18-SLI-III-GDD/-GND-EMCV-HiB-rare/-com/-AA) entstanden (Abbildung 3-13A).

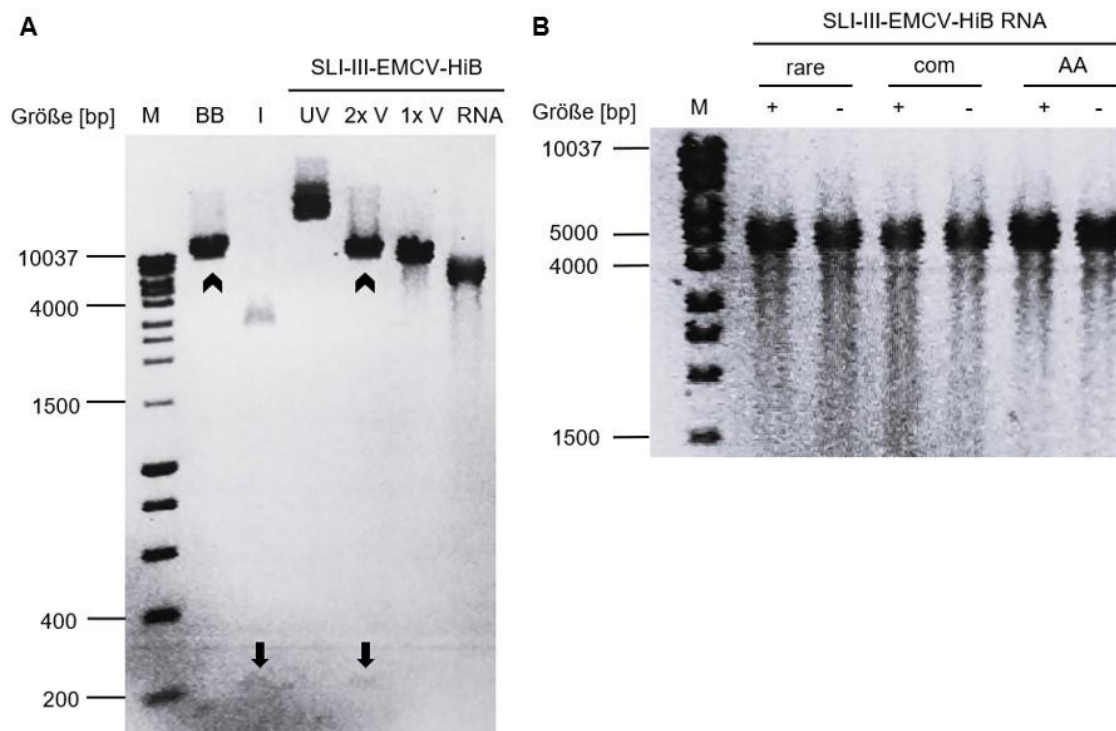


Abbildung 3-13: Weg der Klonierung des SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukts in Gelbildern. In (A) ist das finale Plasmid (SLI-III-EMCV-HiB) unverdaut (UV), mit *KpnI* und *NotI* doppelt verdaut (2x V) und mit *EcoRI* linearisiert (1x V) gezeigt. Backbone-DNA (BB, ca. 10050 bp) und Insert-DNA (I, ca. 200 bp) sind markiert (Backbone – Pfeilspitzen, Insert – Pfeile) und die entsprechenden Plasmide zum Abgleich der Banden links vom Marker mit *KpnI* und *NotI* fragmentiert aufgetragen. (B) zeigt ein 0,8 %-iges Agarosegel zur Integritätskontrolle aller RNA-Konstrukte vor der Transfektion. Als Marker (M) wurde HyperLadder I verwendet. Die Aktivität der NS5B-Polymerase ist als intakt (+) oder defekt (-) gekennzeichnet.

Abbildung 3-13A zeigt diese zum einen nach Doppelverdau (2x V) mit *KpnI* und *NotI* zum Abgleich der Insert-Banden (Pfeile) sowie Backbone-Banden (Pfeilspitzen) und zum anderen linearisiert mit *EcoRI* (1x V) vor der *in vitro*-Transkription. Die Integrität aller RNA-Transkripte wurde vor der jeder Transfektion mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 3-13B).

3.2.5.2 HiBiT-Assay

Zur Testung der Replikationsfähigkeit wurde zunächst nur das Wildtypkonstrukt mit und ohne Polymerasedefekt (Pol +/-) kloniert und im HiBiT-Assay getestet. Dazu wurden wie beim Vorgängerkonstrukt 0,1 pmol RNA/24-Well bei der Transfektion eingesetzt und bis zum 72 h-Zeitpunkt HiBiT-Assays durchgeführt.

Abbildung 3-14 zeigt die relativen Lumineszenzsignale für die Replikons (blaue Säulen) sowie die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säule) im Zeitverlauf. Alle Messwerte wurden auf das Wildtypkonstrukt bei 4 h nach Transfektion normalisiert, sodass dieses zum 4 h-Zeitpunkt keine Streuung aufweist (kräftig blaue Säule bei 4 h, kein Fehlerbalken).

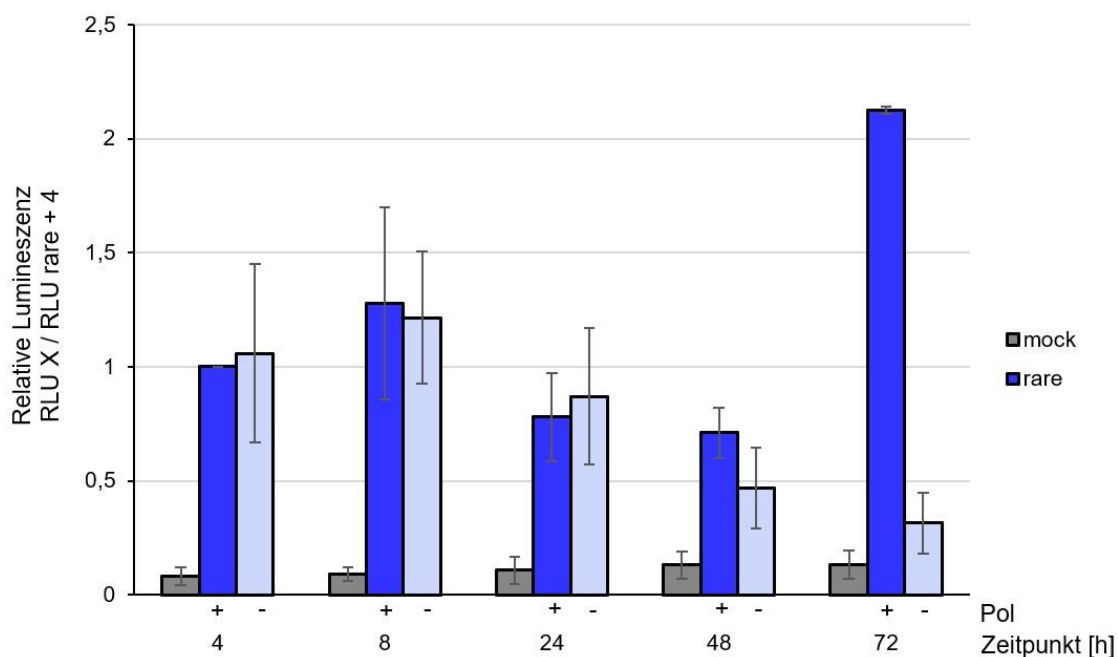


Abbildung 3-14: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit SLI-III-EMCV-HiB. Grafisch dargestellt sind die relativen Lumineszenzsignale für das Wildtypkonstrukt („rare“ = ineffizient, blaue Säulen) und die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) im Zeitverlauf. Die replikationsfähigen Konstrukte (farblich kräftige Säulen) sind durch ein (+) und die replikationsdefizienten (farblich blasse Säulen) durch ein (-) gekennzeichnet. Alle Werte sind auf das Wildtypkonstrukt zum Zeitpunkt 4 h nach Transfektion („rare + 4“) normalisiert. Für jeden Zeitpunkt ist die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Anzahl unabhängiger Versuche betrug 2 (n = 2).

Wie in den vorherigen Konstrukten zeigte sich durch eine zunehmende HiBiT-Expression, d. h. zunehmende Translation, zunächst in beiden Varianten gleichermaßen ein Anstieg des Lumineszenzsignals vom 4 h- auf den 8 h-Zeitpunkt (blaue Säulen bei

8 h) und darauffolgend ein Signalabfall zum 24 h-Zeitpunkt hin. Bei Betrachtung der Rohwerte konnte hier im Vergleich zum 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt zu den frühen Zeitpunkten ein knapp doppelt so hohes Lumineszenzsignal detektiert werden („rare +“ durchschnittlich 7874 RLU bei 4 h, 9276 RLU bei 8 h). Zum 24 h-Zeitpunkt nahm das Lumineszenzsignal in beiden Gruppen gleichermaßen ab. Ab dem 48 h-Zeitpunkt war für das Replikon mit intakter Polymerase (Pol +) bereits ein etwas (nicht signifikant) stärkeres Lumineszenzsignal als für das Konstrukt mit defizienter Polymerase (Pol -) zu erkennen (blaue Säulen bei 48 h). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen verstärkte sich zum 72 h-Zeitpunkt hin deutlich. Während das Lumineszenzsignal in der Gruppe Pol - wohl durch eine zunehmende Degradierung der RNAs weiter sank (blassblaue Säule bei 72 h, Rohwert „rare -“ durchschnittlich 2233 RLU), stieg das Signal in der Gruppe Pol + deutlich über den Referenzwert hinaus an (kräftig blaue Säule bei 72 h, Rohwert „rare +“ durchschnittlich 16.757 RLU).

Da sich die beiden Gruppen zu den frühen Zeitpunkten (4 h – 24 h) in der HiBiT-Expression und damit in der Translationseffizienz nicht unterschieden und das Signal 72 h nach der Transfektion sogar über den Referenzwert hinaus anstieg, waren die Gruppenunterschiede zum 72 h-Zeitpunkt nur durch eine gesteigerte HiBiT-Expression nach erfolgter RNA-Amplifikation zu erklären. Genau gesagt wurden also die transfizierten Plusstränge zunächst in Minusstränge und davon dann in viele Nachkommen-Plusstränge repliziert, die dann wiederum translatiert wurden. Das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt eignete sich somit zur indirekten Erfassung der Replikation im HiBiT-Assay.

Fazit: 72 h nach der Transfektion zeigte sich bereits nach zwei Versuchen ein wesentlicher Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den replikationsfähigen und -defizienten RNAs. Das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt eignete sich demnach zur indirekten Detektion der Replikation in den HiBiT-Assays, sodass dort nachfolgend die Mutationen der NS5B codierenden Region eingeführt wurden.

3.3 Stille Mutation der seltenen Codons beeinflusst die Replikation

Um den Einfluss der seltenen Codons auf die Replikation testen zu können, wurden nachfolgend die entsprechenden Mutationen (3.1) in das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt eingeführt (3.2.5). Wie bei den Vorgängerkonstrukten etabliert, erfolgte die Transfektion in Huh-7.5 Hepatomzellen mit 0,1 pmol RNA/24-Well. Da sich in den Vorversuchen erst zum 72 h-Zeitpunkt ein wesentlicher Unterschied zwischen der replikationsfähigen und -defizienten Variante im HiBiT-Assay gezeigt hatte (3.2.5.2), wurde der Zeitverlauf um noch einen späteren Zeitpunkt (96 h nach Transfektion) erweitert. Der 8 h-Zeitpunkt hingegen wurde aus dem Zeitverlauf herausgenommen, da sich zu diesen frühen Zeitpunkten in keinem der Vorgängerkonstrukte ein Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen dem Wildtypkonstrukt und der Codonmutante gezeigt hatte. Der 4 h-Zeitpunkt wurde als Referenzwert für die Normalisierung beibehalten. Das Lumineszenzsignal wurde demnach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach der Lipofektion im HiBiT-Assay erfasst. In dem Design erfolgte der Versuch insgesamt 10 x mit RNAs von unabhängigen *in vitro*-Transkriptionen (n = 10).

Abbildung 3-15 stellt die relativen Lumineszenzsignale für die Replikons (farbige Säulen) sowie die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) zu den verschiedenen Messzeitpunkten dar. Alle Werte wurden auf das Wildtypkonstrukt bei 4 h nach Transfektion normalisiert, weshalb dieses zum 4 h-Zeitpunkt keine Streuung aufweist (kräftig blaue Säule bei 4 h, kein Fehlerbalken).

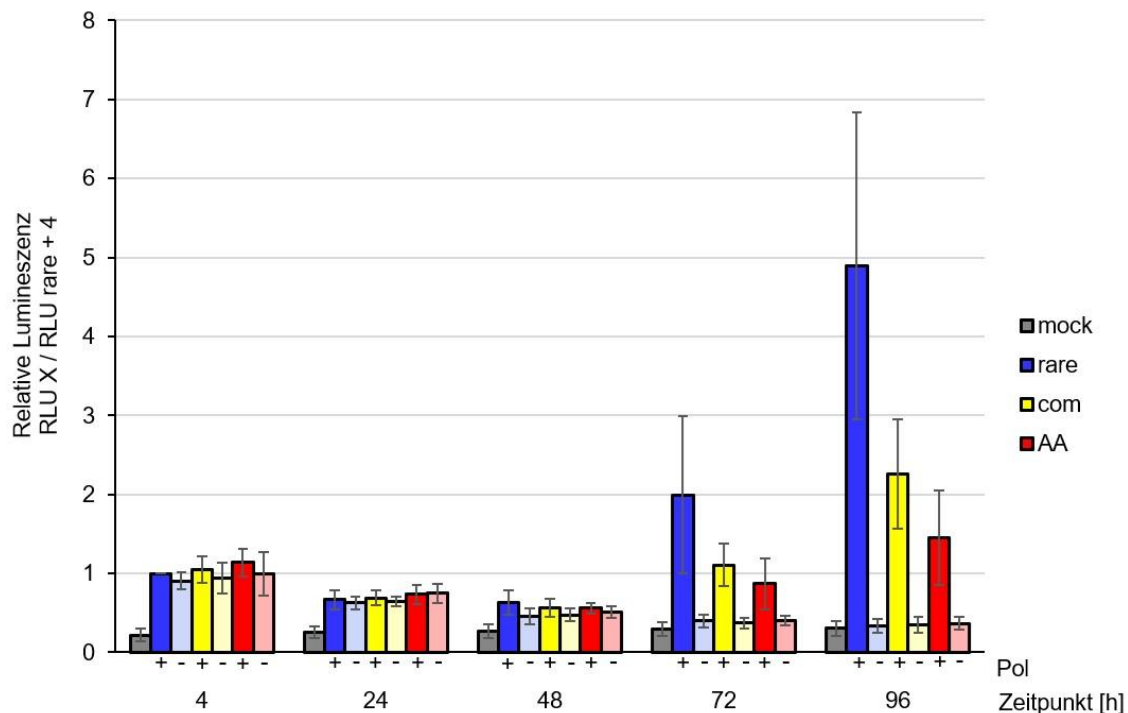


Abbildung 3-15: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit SLI-III-EMCV-HiB. Grafisch dargestellt sind die relativen Lumineszenzsignale für das Wildtypkonstrukt („rare“ = ineffizient, blaue Säulen), die Codonmutante („com“ = effizient, gelbe Säulen), die Aminosäuremutante („AA“, rote Säulen) und die mitgeführte Negativkontrolle (Mock, graue Säulen) zu den einzelnen Messzeitpunkten. Die replikationsfähigen Konstrukte (farblich kräftige Säulen) sind durch ein (+) und die replikationsdefizienten (farblich blasse Säulen) durch ein (-) gekennzeichnet. Alle Werte sind auf das Wildtypkonstrukt zum Zeitpunkt 4 h („rare + 4“) normalisiert. Für jeden Zeitpunkt ist die Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Anzahl unabhängiger Versuche betrug 10 (n = 10).

Betrachtet man den Zeitverlauf, zeigten alle RNAs – unabhängig von der NS5B-Mutation – nach der Transfektion zunächst eine ähnliche HiBiT-Expression, d. h. sie wurden gleichermaßen translatiert. Weder beim 4 h- noch beim 24 h-Zeitpunkt waren Unterschiede in der HiBiT-Expression zu erkennen (farbige Säulen bei 4 h, 24 h). Die sinkende HiBiT-Expression vom 4 h- auf den 48 h-Zeitpunkt ist wohl auf die fortschreitende Degradation der in die Zellen eingebrachten Plusstränge zurückzuführen. Während das Lumineszenzsignal bei den replikationsdefizienten Konstrukten vom 48 h-Zeitpunkt auf den 72 h-Zeitpunkt weiter abnahm (blasse Säulen bei 72), stieg es bei den replikationsfähigen RNAs, vermutlich durch die Translation der neu generierten Plusstränge, wieder an und nahm bis zum 96 h-Zeitpunkt deutlich zu (kräftig farbige Säulen bei 72 h, 96 h). Zwischen den replikationsfähigen Konstrukten zeigte sich nun ein Unterschied in der Höhe des Lumineszenzsignals in Abhängigkeit von der Ausprägung der NS5B-Mutation. Während das Signal des Wildtypkonstrukts nahezu exponentiell zunahm (kräftig blaue Säulen bei 72 h, 96 h), stieg das Signal der Codon- und Aminosäuremutante langsamer an und blieb auf einem geringeren Niveau (kräftig gelbe/rote Säulen bei 72 h, 96 h).

Um sicherzustellen, dass die detektierten Unterschiede des Lumineszenzsignals in den HiBiT-Assays nicht auf Unterschiede in der Zellzahl oder -vitalität der Wells zurückzuführen waren, wurden stichprobenweise WST-1 Tests durchgeführt (2.2.3.8). In den Assays zeigte sich für alle Wells eine ähnliche Formazan-Absorption und damit eine vergleichbare Anzahl vitaler Zellen zu einem definierten Zeitpunkt (Abbildung 3-16).

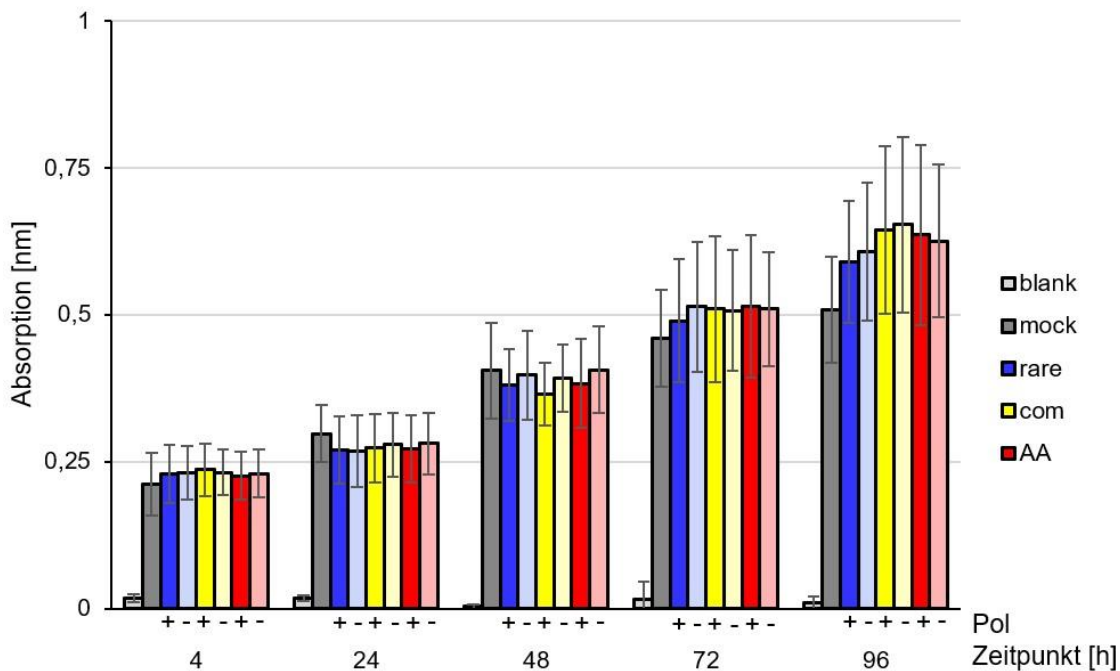


Abbildung 3-16: Durchschnittliche Formazan-Absorption in WST-1-Assays zur Detektion der Zellvitalität. Gezeigt ist die im WST-1 Assay gemessene durchschnittliche Formazan-Absorption, die direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen pro Well ist. Die transfizierten Replikons sind farblich abgegrenzt (Wildtypkonstrukt – „rare“, blaue Säulen, Codonmutante – „com“, gelbe Säulen, Aminosäuremutante – „AA“, rote Säulen). Die replikationsfähigen Konstrukte (farblich kräftige Säulen) sind durch ein (+) und die replikationsdefizienten (farblich blasse Säulen) durch ein (-) gekennzeichnet. Die mitgeführte Negativkontrolle bei der Transfektion (Mock – dunkelgraue Säulen) und die Leermessung am Luminometer (Blank – hellgraue Säulen) sind für jeden Zeitpunkt dargestellt. Die Standardabweichung (SD) ist als Fehlerbalken eingezeichnet. Die WST-1-Assays wurden bei 4 unabhängigen Versuchsreihen mitgeführt (n = 4).

Im Zeitverlauf war ein ähnlicher Anstieg der Formazan-Absorption, d. h. der Zellzahl, zu beobachten (Abbildung 3-16). Hohe Lumineszenzwerte im HiBiT-Assay korrelierten weder mit einer erhöhten noch erniedrigten Zellzahl in den entsprechenden Wells. Zwischen der Höhe der Lumineszenzwerte im HiBiT-Assay und der Zellzahl lässt sich kein Zusammenhang erkennen (Abbildung 3-15 vs. Abbildung 3-16).

Zur statistischen Auswertung wurden die Rohdaten wie in 2.2.5 beschrieben aufbereitet, analysiert, aufgrund der Log-Normalverteilung transformiert und anschließend eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Polymerase (Pol +/-), NS5B-Mutation (rare/com/AA) und Zeitpunkt (4 h/24 h/48 h/72 h/96 h) durchgeführt. Die deskriptive Statistik ist aus Übersichtsgründen im Anhang dargestellt (11.3.3). Die ANOVA zeigte für alle drei Einzelfaktoren einen signifikanten Einfluss auf die HiBiT-

Expression (Faktor Zeitpunkt, $F = 60,777$, $p < 0,001$; Faktor Polymerase, $F = 640,990$, $p < 0,001$; Faktor NS5B-Mutation, $F = 3,977$, $p = 0,02$) (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB. Dargestellt sind die Ergebnisse der ANOVA mit den drei Faktoren Zeitpunkt, NS5B-Mutation und Polymerase. Die Einzelfaktoranalyse ist jeweils über die Stufen der anderen beiden Faktoren gemittelt. Relevante Interaktionen können durch die Analyse von Faktorkombinationen (*) erfasst werden. Der F-Wert setzt die Varianz zwischen den Gruppen ins Verhältnis zu der Varianz innerhalb der Gruppen.

Einflussfaktoren	Freiheitsgrade	Schätzwert (F)	p
Zeitpunkt	4	60,777	< 0,001
NS5B-Mutation	2	3,977	0,020
Polymerase (Pol)	1	640,990	< 0,001
Zeitpunkt * NS5B-Mutation	8	3,508	< 0,001
Zeitpunkt * Pol	4	191,100	< 0,001
NS5B-Mutation * Pol	2	13,273	< 0,001
Zeitpunkt * NS5B-Mutation * Pol	8	3,729	< 0,001

Zwischen den Gruppen waren darüber hinaus in allen Kombinationen ausgeprägte Interaktionen zu erkennen ($p = 0,001$), die darauf hindeuten, dass sich die Faktoren gegenseitig bedingen (Tabelle 3-4). Um die Wechselwirkungen und Gruppenunterschiede genauer zu analysieren, wurden Post-hoc-Tests durchgeführt.

Zunächst wurde die Interaktion der Faktoren Polymerase und Zeitpunkt, gemittelt über die unterschiedliche Ausprägung der NS5B-Mutation, betrachtet. Hier zeigte sich bereits zum 48 h-Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den replikationsfähigen und -defizienten Konstrukten ($t = -3,58$, $p_{\text{Bonf}} = 0,018^*$), der sich zum 72 h-Zeitpunkt ($t = -18,87$) und zum 96 h-Zeitpunkt ($t = -32,15$) noch verstärkte (jeweils $p_{\text{Bonf}} < 0,001^{***}$). Zu den früheren Zeitpunkten unterschieden sich die Gruppen nicht voneinander (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Standard-Post-hoc-Test für die Interaktion Zeitpunkt * Polymerase. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den replikationsfähigen und -defizienten Konstrukten 48 h, 72 h und 96 h nach der Transfektion ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Subgruppe	Vergleichsgruppe	Mittelwert-differenz	95 % KI		t	p _{Bonf}
			Untere	Obere		
Pol - 4	Pol + 4	-0,074	-0,237	0,089	-1,45	1,0
Pol - 24	Pol + 24	-0,028	-0,191	0,135	-0,55	1,0
Pol - 48	Pol + 48	-0,183	-0,346	-0,020	-3,58	0,018
Pol - 72	Pol + 72	-0,964	-1,127	-0,801	-18,87	< 0,001
Pol - 96	Pol + 96	-1,643	-1,806	-1,480	-32,15	< 0,001

Bezog man den Faktor NS5B-Mutation noch zusätzlich ein, zeigte sich 72 h ($t = -5,175$) und 96 h ($t = -7,137$) nach der Lipofektion ein signifikanter Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen dem replikationsfähigen Wildtypkonstrukt und der replikationsfähigen Aminosäuremutante (jeweils $p_{\text{Bonf}} < 0,001^{***}$). Zum 96 h-Zeitpunkt

unterschied sich das Lumineszenzsignal des Wildtypkonstrukts auch signifikant von dem der Codonmutante mit aktiver NS5B-Polymerase ($t = -4,027$, $p_{\text{Bonf}} = 0,032^*$) (Abbildung 3-17, Tabelle 11-9). 72 h nach der Transfektion war allerdings noch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden zu beobachten ($p_{\text{Bonf}} = 1$).

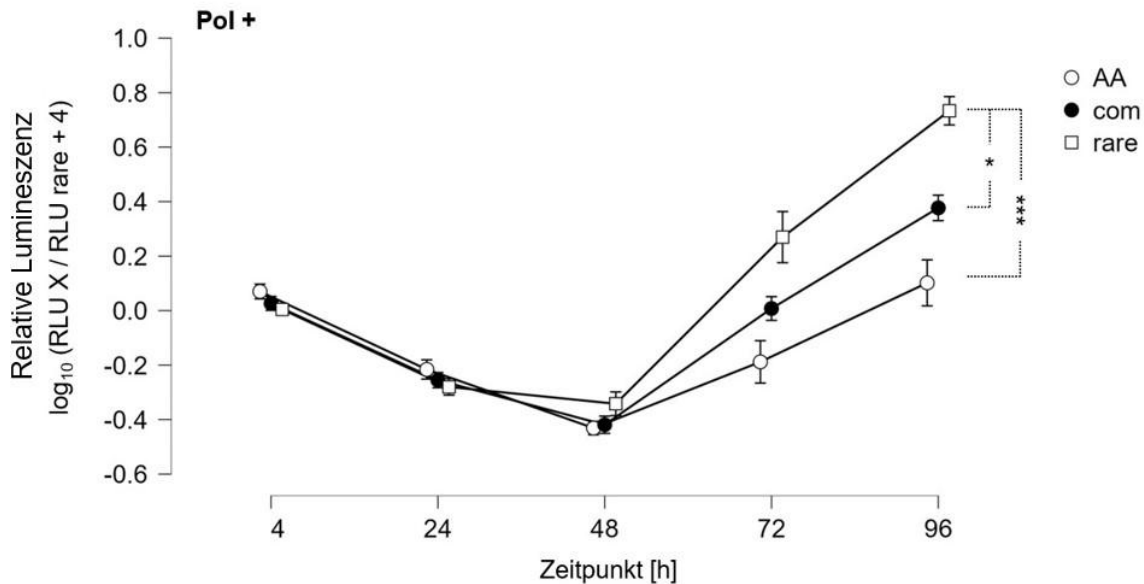


Abbildung 3-17: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB für die Varianten mit aktiver Polymerase. Gezeigt ist die Veränderung der logarithmierten relativen Lumineszenzsignale im Zeitverlauf mit separaten Linien für die Ausprägung der NS5B-Mutation (Wildtyp – „rare“, weiße Quadrate, Codonmutante – „com“, schwarze Punkte, Aminosäuremutante – „AA“, weiße Punkte) für die replikationsfähigen RNAs (Pol +). Für jeden Zeitpunkt ist der Standardfehler (= Standardabweichung im Verhältnis zur Stichprobenanzahl) als Fehlerbalken eingezeichnet. Die Signifikanzen sind mit Sternchen veranschaulicht ($p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$).

Die Codonmutante und die Aminosäuremutante mit aktiver NS5B-Polymerase unterschieden sich weder zum 72 h-Zeitpunkt ($p_{\text{Bonf}} = 1$) noch zum 96 h-Zeitpunkt ($p_{\text{Bonf}} = 0,901$) wesentlich voneinander. Zwischen den replikationsdefizienten Konstrukten zeigte sich, unabhängig von der Ausprägung der NS5B-Mutation, auch zu den späten Zeitpunkten kein Unterschied in der HiBiT-Expression (bei allen Vergleichen $p_{\text{Bonf}} = 1$) (Abbildung 3-18, Tabelle 11-9).

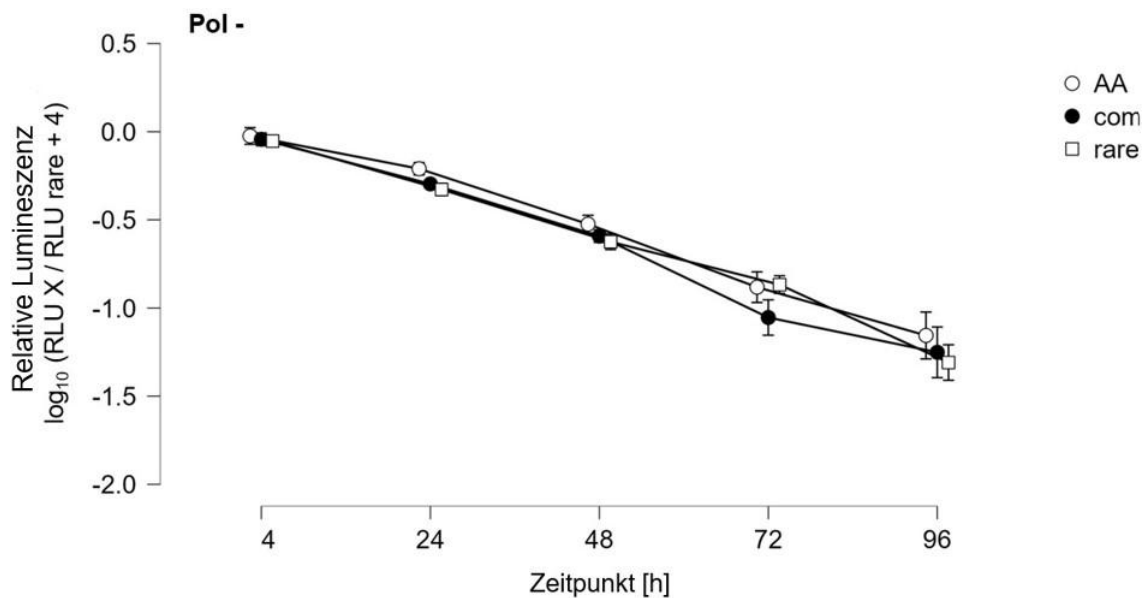


Abbildung 3-18: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB für die Varianten mit inaktiver Polymerase. Dargestellt ist die Veränderung der logarithmierten relativen Lumineszenzsignale im Zeitverlauf mit separaten Linien für die Ausprägung der NS5B-Mutation (Wildtyp – „rare“, weiße Quadrate, Codonmutante – „com“, schwarze Punkte, Aminosäuremutante – „AA“, weiße Punkte) für die replikationsdefizienten RNAs (Pol -). Für jeden Zeitpunkt ist der Standardfehler (= Standardabweichung im Verhältnis zur Stichprobenanzahl) als Fehlerbalken eingezeichnet.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen mit den vorherigen Konstrukten waren zu den frühen Zeitpunkten (4 h – 48 h) keine signifikanten Unterschiede im Lumineszenzsignal zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher NS5B-Mutation (jeweils $p_{\text{Bonf}} = 1$) zu erkennen. Da die HiBiT-Expression und damit die Translation der Codon- und Aminosäuremutante zu den frühen Zeitpunkten nicht geringer als die des Wildtypkonstrukts mit aktiver NS5B-Polymerase war, sind diese Unterschiede zu den späten Zeitpunkten als Ausdruck eines negativen Einflusses auf die Replikationseffizienz zu werten. Alle Werte der Post-hoc-Vergleiche (Zeitpunkt * NS5B-Mutation * Polymerase) sind aus Übersichtsgründen detailliert im Anhang aufgeführt (Tabelle 11-9).

Fazit: Zu den späten Zeitpunkten (72 h, 96 h) zeigte sich abhängig von der NS5B-Mutation ein signifikanter Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den replikationsfähigen Konstrukten. Die HiBiT-Expression des Wildtypkonstrukts war dabei signifikant höher als die der Aminosäure- und der Codonmutante. Das bedeutet, dass die Mutation der im Wildtyp vorhandenen ineffizienten Codons am Ende der NS5B-codierenden Region hin zu effizienten Codons zu einer Beeinträchtigung der Replikation der Replikon-RNAs führt.

4 Diskussion

Viren sind nicht eigenständig lebensfähig und damit auf eine effiziente Translation und Replikation des eigenen Genoms im Wirtsorganismus angewiesen. Über den genauen Ablauf der Translation und Replikation des HCV sowie den Wechsel zwischen beiden ist bis heute wenig bekannt, sodass die weitere Aufschlüsselung des viralen Replikationszyklus noch immer ein wichtiges Forschungsthema darstellt.

Ribosome Pausing wurde bereits bei anderen humanpathogenen Viren wie dem Cytomegalievirus (CMV) als Mechanismus zur Regulation der Translation beobachtet (Cao und Geballe 1996). Die Verzögerung der Ribosomen kann entstehenden Peptiden Zeit zur cotranslationalen Faltung und Interaktion mit zellulären oder viralen Bindungspartnern geben (Collart und Weiss 2020). Ursächlich können prominente RNA-Sekundärstrukturen, die Anhäufung von ineffizienten Codons in bestimmten Abschnitten des Genoms oder pausierende Peptidsequenzen des entstehenden Proteins sein (Collart und Weiss 2020; Sabi und Tuller 2017; Yu et al. 2015).

In vorausgegangenen Studien wurden bereits statistisch relevante Cluster von seltenen (d. h. ineffizienten) Codons im Genom des HCV (Core, NS2, NS3, NS4B, NS5A, NS5B) und Indizien für Ribosome Pausing in der C-terminalen NS5B codierenden Region nahe des Stoppcodons entdeckt (Fattahi et al. 2014; Gerresheim et al. 2020). Die Analyse des HCV-Genoms legte nahe, dass das Pausieren der Ribosomen auf die strangaufwärts des Stoppcodons gelegenen konservierten, ineffizienten Codons zurückzuführen sein könnte (Gerresheim et al. 2020).

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die ineffizienten Codons relevant für das Ribosome Pausing in der NS5B-Region sind und ob dieses eine funktionelle Bedeutung für die Translation oder Replikation des HCV-Genoms hat. Der Fokus lag dabei zunächst auf der Etablierung eines Replikonsystems, das sich dazu eignete, die Auswirkungen der Mutation der seltenen Codons in der NS5B-Region sowohl auf die Translation als auch auf die Replikation zu testen.

4.1 Entwicklung eines geeigneten Replikonsystems

Es wurde mit verschiedenen subgenomischen RNAs gearbeitet, die jeweils nur einen Ausschnitt der relevanten proteincodierenden Regionen und Strukturelemente enthielten. Experimente mit dem *full-length* Virus erfolgten nicht. Die Ergebnisse der HiBiT-Assays mit den unterschiedlichen Konstrukten werden im Folgenden im Detail diskutiert und ausgehend davon die Weiterentwicklung des Replikonsystems sowie des Versuchsablaufs erläutert.

4.1.1 pHCV-HiB-NS5B-26AS-Konstrukt

Das erste Konstrukt (pHCV-HiB-NS5B-26AS) enthielt die beiden viralen Genomenden (HCV 3'UTR, 5'UTR) und einen Ausschnitt von lediglich 26 AS der terminalen NS5B codierenden Region, der wiederum die ineffizienten Codons beinhaltete. So sollte zunächst getestet werden, ob die Sequenz mit den seltenen Codons isoliert zu einer detektierbaren Entschleunigung der Translation führt. Ausgehend von dem Gedanken, dass effiziente Codons schneller decodiert werden als ineffiziente (Yu et al. 2015), wurde für die Codonmutante eine im Vergleich zum Wildtypkonstrukt stärkere HiBiT-Expression in den Assays erwartet. Nach Transfektion der RNAs in Huh-7.5 Hepatomzellen zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den beiden Varianten (Abbildung 3-4) und somit kein Hinweis auf einen Effekt der seltenen Codons.

Zu allen Messzeitpunkten konnte nur ein schwaches Lumineszenzsignal (durchschnittlich 1094 RLU bei 4 h, 1692 RLU bei 8 h), knapp über dem Niveau der Negativkontrolle (durchschnittlich 729 RLU bei 4 h, 897 RLU bei 8 h), erfasst werden (3.2.1.2). HiBiT-Assays gelten allerdings als sehr sensitive Methode zur Proteinmarkierung und wurden von anderen Forschungsgruppen bereits erfolgreich zur Quantifizierung des Eintritts und der Freisetzung von Virionen bei Flaviviren genutzt (Sasaki et al. 2018). Die geringe HiBiT-Expression schien vor dem Hintergrund am ehesten durch eine sehr geringe Translation des Konstrukts bedingt zu sein, was die Detektion von Ribosome Pausing möglicherweise nicht erlaubte. Vorausgegangene Studien zu Ribosome Stalling (engl. *stall* = Hinhalten) beim Cytomegalievirus deuten darauf hin, dass die Nachweisbarkeit des inhibitorischen Effekts von der Translationskapazität des verwendeten Systems abhängt (Cao und Geballe 1996). In einem System mit starker Translationskapazität ließen sich Auswirkungen des Ribosome Stallings deutlich detektieren, wohl da es nach mehreren Translationsrunden zu einem Aufstau von Ribosomen vor dem blockierenden Ribosom mit Potenzierung des Effekts kam (Cao und Geballe 1996). In Systemen mit geringer Translationskapazität war die Detektion von Ribosome Stalling hingegen nur eingeschränkt möglich (Cao und Geballe 1996).

Mögliche Gründe für die geringe Translationskapazität des Konstrukts können nur spekuliert werden. Die HCV-IRES wird im Vergleich zu anderen IRES-Elementen *in vitro* als recht schwach angesehen. *In vivo* gilt sie allerdings, insbesondere in menschlichen Leberzelllinien, als sehr effizient (Borman et al. 1995; Borman et al. 1997). Subgenomische monocistronische Replikons, bei denen die Translation ausschließlich durch die HCV-IRES angetrieben wird, sind zudem schon lange erfolgreich etabliert (Blight et al. 2003; Blight und Norgard 2006). Neben den beiden UTRs enthalten diese

aber klassischerweise auch die codierenden Regionen für das Core-Protein sowie NS2 – NS5B (Blight und Norgard 2006; Blight et al. 2003).

Aus der minimalen Gestaltung resultierte hier allerdings ein sehr artifizielles Konstrukt, das im Vergleich zu den etablierten Replikons nur wenige Wechselwirkungen zuließ. Für die Stimulation der Translation des HCV sind jedoch Interaktionen mit zahlreichen viralen und zellulären Proteinen sowie RNA-Strukturelementen erforderlich (Romero-López und Berzal-Herranz 2020). Das minimale Konstrukt erlaubte zwar eine Stimulation der Translation durch die integrierte 3'UTR, aber die Bindung der miRNA-122 und die Interaktion mit *cis*-regulatorischen Elementen der NS5B-Region waren nur unzureichend möglich. In dem Ausschnitt der 26 AS der NS5B-Region war lediglich die RNA-Domäne 5BSL3.3 erhalten. Die Elemente 5BSL3.1 und 5BSL3.2 sowie die miRNA-122-Bindungsstellen in der Region fehlten vollständig, was die Translation folglich beeinträchtigt haben könnte.

Ebenso – und dies ist womöglich die wichtigste Überlegung – lässt sich die Relevanz der ineffizienten Codons für die cotranslationale Faltung von NS5B vielleicht nur im Kontext des komplett translatierten NS5B-Proteins feststellen. So z. B. wenn der schon aus dem Ribosom ausgetretene und fertig gefaltete enzymatisch aktive Core der Replikase effizienter in *cis* an das 3'-Ende der HCV RNA binden kann, sofern ineffiziente Codons am C-Terminus das Protein noch länger am beziehungsweise im Ribosom festhalten.

Um die ausgeführten Limitationen zu überwinden und den Fokus auf die Analyse der funktionellen Relevanz der seltenen Codons zu richten, erfolgte der Wechsel in die subgenomischen Replikons von L. Shalamova, für die bereits eine ausgeprägte Translations- und Replikationsfähigkeit in Huh-7.5 Hepatomzellen gezeigt werden konnte (Shalamova 2019).

4.1.2 5'UTR-Core-Konstrukt

Im Folgenden wurde mit dem 5'UTR-Core-Konstrukt von L. Shalamova gearbeitet, das im Vergleich zum minimalen Konstrukt neben den beiden viralen Genomenden auch die vollständigen codierenden Regionen für das Core-Protein und für NS3 – NS5B enthielt. Das Konstrukt design orientierte sich an etablierten subgenomischen, bicistronischen HCV-Replikons, bei denen die Translation der nicht-strukturellen viralen Proteine unter Kontrolle der EMCV-IRES steht (Blight und Norgard 2006).

Da sich Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den replikationsfähigen und -defizienten Replikons in vorausgegangen Western Blot-Analysen frühestens 24 h nach der Transfektion in Huh 7.5-Zellen gezeigt hatten (Shalamova 2019), wurde der Zeitverlauf für die HiBiT-Assays hier zunächst um den 48 h-Zeitpunkt (3.2.3.2) und im

Verlauf zusätzlich um den 72 h-Zeitpunkt erweitert (3.2.4.2). Die Bedingungen der Transfektion wurden durch die Reduktion der Menge der transfizierten RNA von 0,3 auf 0,1 pmol RNA/12-Well optimiert, nachdem unter dem Einsatz von 0,3 pmol RNA/12-Well ein vermehrtes Zellsterben beobachtet wurde. Ursächlich konnte zum einen die hohe RNA-Menge sein, deren Detektion durch das angeborene Immunsystem vermehrt zu Apoptose führen kann, und zum anderen der damit einhergehende Einsatz einer hohen Lipidmenge (3 µl Lipofectamine/µg RNA), die ebenfalls eine toxische Wirkung auf die Zellen haben kann (Wang et al. 2018). Beide Faktoren konnten durch den Einsatz von 0,1 pmol RNA/Well erfolgreich reduziert werden.

In den HiBiT-Assays mit dem 5'UTR-Core-Konstrukt konnte zu den frühen Zeitpunkten eine ca. vierfach höhere HiBiT-Expression, d. h. Translation als im Vorgängerkonstrukt gemessen werden. Während die Translation im minimalen Konstrukt von der HCV-IRES reguliert wurde, wurde die Translation der viralen Proteine NS3 – NS5B hier von der EMCV-IRES angetrieben. In Vergleichsstudien zeigte sich die EMCV-IRES in mehreren Zelllinien und besonders unter *in vitro*-Bedingungen stärker in der Translationsinitiation als die HCV-IRES (Borman et al. 1995; Borman et al. 1997; Paulous et al. 2003). Maßgeblich hängt die Effizienz beider IRES-Elemente allerdings von der verwendeten Zelllinie und den zellulären Bedingungen ab (Borman et al. 1997; Paulous et al. 2003). Vergleichsexperimente hinsichtlich der Translationseffizienz in Huh-7.5 Hepatomzellen im Speziellen liegen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht vor.

Neben der Translationsinitiation durch die EMCV-IRES ist das natürlichere Konstruktdesign, das zahlreiche Wechselwirkungen mit zellulären und viralen Faktoren zuließ, als Ursache für die deutlich höhere HiBiT-Expression zu bedenken.

4.1.2.1 Einfluss von Mutationen in der NS5B-Region auf die Translation

Trotz höherer Translationsaktivität war zwischen dem Wildtypkonstrukt und der Codonmutante im 5'UTR-Core-Konstrukt zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der HiBiT-Expression zu beobachten (Abbildung 3-7, Abbildung 3-11). Die Mutation der seltenen Codons zu häufigen Triplets schien somit auch in einem natürlicheren Konstrukt keinen Einfluss auf die Translationseffizienz zu haben.

Für die Aminosäuremutante zeigte sich im 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt bei Berücksichtigung des gesamten Zeitverlaufs eine signifikant geringere HiBiT-Expression im Vergleich zu den anderen beiden Varianten (Abbildung 3-11). Die eingeführten Missense-Mutationen führten zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des 5BSL3.3 (Abbildung 3-1). Diese Domäne zählt zu den *cis*-regulatorischen Elementen der NS5B codierenden Region und ist hochkonserviert. Vorangegangene Studien zeigten, dass insbesondere die zentral und zum 3'-Ende gelegenen Nukleotide des 5BSL3.3 für die

Rekrutierung der 40S UE und damit für die Regulation der Translation von Bedeutung sind (Romero-López et al. 2018).

Da sich die HiBiT-Expression der Aminosäuremutante im späteren SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt zu den früheren Zeitpunkten (4 h – 48 h) nicht signifikant von der anderen beiden Varianten unterschied (Abbildung 3-14), muss hier aber von einem Zusammenspiel mit weiteren Faktoren ausgegangen werden. Die HiBiT-Insertion erfolgte im 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt in der Domäne 5BSL3.1, die genauso wie 5BSL3.3 in Verdacht steht, eine regulatorische Funktion in der HCV-Translation innezuhaben und für die Interaktion mit der 40S UE relevant zu sein (Romero-López et al. 2018). Gegebenenfalls führte so die kombinierte Veränderung beider Domänen zu einer Beeinträchtigung der Translationseffizienz der Aminosäuremutante.

Überdies sind auch eine verminderte Stabilität und folglich schnellere Degradation der transfizierten RNA und/oder der gebildeten Proteine als Ursache für die geringere Proteinexpression zu bedenken.

4.1.2.2 Keine Detektion von Replikation und Troubleshooting

In keiner Variante des 5'UTR-Core-Konstrukts (NS5B-HiB, EMCV-HiB) konnte zwischen den replikationsfähigen und -defizienten RNAs ein signifikanter Unterschied in der HiBiT-Expression detektiert werden (Abbildung 3-7, Abbildung 3-10). Stattdessen zeigte sich auch für die RNAs mit nicht-mutierter Polymerase ab dem 24 h-Zeitpunkt eine kontinuierliche Abnahme des Lumineszenzsignals (Abbildung 3-7, Abbildung 3-10), die am ehesten durch eine fortschreitende Degradation der eingebrachten Plusstränge bei ausbleibender Replikation bedingt war (Shalamova 2019).

In den Western Blots von L. Shalamova konnte für die replikationsfähige Variante ab dem 24 h-Zeitpunkt hingegen eine gegenüber der replikationsdefizienten Kontrolle stärkere Expression des NS3-Proteins beobachtet werden (Shalamova 2019). Da sich das hier getestete Wildtypkonstrukt ausschließlich durch die HiBiT-Insertion von dem ursprünglichen unterschied, wurde diese im Zuge des Troubleshootings zunächst kritisch reevaluiert.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Luciferase-Proteinen, wie der aus 550 AS bestehenden Firefly Luciferase 2 (Fluc2), umfasst die HiBiT-Peptid-Sequenz lediglich 11 AS. Durch diese geringe Größe wurde vermutet, die Aktivität getaggtter Proteine allenfalls wenig zu beeinträchtigen (Sasaki et al. 2018), wobei im hochkonservierten HCV-Genom die Insertionsstelle als entscheidend anzusehen ist.

Die HiBiT-Peptid-Sequenz wurde im 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt knapp 20 AS strangaufwärts des hydrophoben C-terminalen Membranankers der NS5B-Polymerase zwischen dem nicht-konservierten Arginincodon 543 und Leucincodon 544

in die Sequenz TPLPEAR-LLDLSS (NS5B AS 537 – 549) eingebaut (Mosley et al. 2012; Fricke et al. 2015). Durch die Insertion außerhalb des aktiven Zentrums der NS5B-Polymerase sollte deren Aktivität erhalten werden. Insertionen in der NS5B codierenden Region sind allerdings auch außerhalb des aktiven Zentrums oft kritisch und können zu einer Einschränkung der Replikation führen (Arumugaswami et al. 2008), wovon auch hier auszugehen war.

Genauere Nachforschungen ergaben, dass durch funktionelles Profiling des HCV-Genoms bereits gezeigt werden konnte, dass Insertionen von lediglich 15 Nukleotiden in die oben genannte Sequenz nicht toleriert wurden und übereinstimmend mit den Ergebnissen in den vorliegenden HiBiT-Assays letal für die NS5B-Replikase waren (Arumugaswami et al. 2008). Hydrophobe Sequenzen sind für die Ausbildung von stabilen Tertiärstrukturen relevant (Wruck et al. 2017; Sen und Voorheis 2014), sodass diese Sequenz eine funktionelle Bedeutung für die Faltung der Replikase haben und selbst die Insertion des aus wenigen AS bestehenden HiBiT-Peptids die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur stören könnte.

Um weder die Translation (4.1.2.1) noch die Replikation negativ zu beeinflussen, erfolgte die HiBiT-Insertion nachfolgend außerhalb der NS5B-Region. Die HiBiT-Peptid-Sequenz wurde stattdessen unmittelbar strangabwärts des Stoppcodons der EMCV-IRES eingefügt und über einen Glycin-Serin-Anker mit der NS3 codierenden Region verbunden (5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt, Abbildung 3-9). Strangaufwärts der NS3 codierenden Region konnten durch andere Arbeitsgruppen bereits wesentlich größere Reportergene (z. B. Renilla-Luciferase), gefolgt von einer Ubiquitin-Spaltungsstelle, erfolgreich in subgenomische HCV-Replikons eingefügt werden (Reiss et al. 2011).

Nach dem Wechsel der HiBiT-Insertionsstelle fiel interessanterweise eine wesentlich langsamere Abnahme der HiBiT-Expression, d. h. Degradation der transfizierten RNAs oder Proteine, auf (vgl. Abbildung 3-7, Abbildung 3-11). 72 h nach der Transfektion konnte im 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt noch eine funktionelle Translation beobachtet werden (Abbildung 3-11), während die Proteinexpression im 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt zum 48 h-Zeitpunkt bereits auf Hintergrundniveau abgesunken war (Abbildung 3-7). In Anbetracht der kurzen Halbwertszeit (HWZ) des HiBiT-Proteins von lediglich ca. 3 h (Herstellerangaben Promega) und des fehlenden Unterschieds in der HiBiT-Expression zu den frühen Zeitpunkten (4 h, 8 h), waren die Signalunterschiede zu den späteren Zeitpunkten (24 h, 48 h) am ehesten auf Stabilitätsunterschiede der transfizierten RNAs und nicht der gebildeten Proteine zurückzuführen. Um genauere Aussagen zu treffen, wäre hier allerdings weiterführend eine direkte Messung der Plusstrangabundanz durch RT-qPCR (engl. *reverse*

transcription quantitative polymerase chain reaction = quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) nötig.

Weshalb kein Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den Konstrukten mit und ohne Polymerasemutation detektiert werden konnte, bleibt offen. Angesichts der erfolgreichen Insertion von Luciferase-Reportergenens strangaufwärts der NS3 codierenden Region in den zuvor aufgeführten Studien, schien es allerdings unwahrscheinlich, dass die HiBiT-Insertion an dieser Position die Replikation beeinträchtigte. Sie wurde daher nachfolgend erneut im SLI-III-Konstrukt getestet.

4.1.3 Detektion von Replikation im SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt

Das SLI-III-Konstrukt beinhaltet im Vergleich zum 5'UTR-Core-Konstrukt nicht die gesamte 5'UTR, sondern nur die Schleifenelemente I-III. Da das SLI-III-Konstrukt in der RT-qPCR die stärkste Zunahme der Minus- und Plusstrangabundanz unter allen von L. Shalamova untersuchten Konstrukten gezeigt hatte (Shalamova 2019), wurde es für die erneute Testung der HiBiT-Insertion unmittelbar strangaufwärts von NS3 verwendet.

In den HiBiT-Assays konnte 48 h nach der Transfektion in Huh-7.5 Hepatomzellen für die RNAs mit intakter NS5B-Polymerase ein dezent (nicht wesentlich) stärkeres Lumineszenzsignal als für die replikationsdefizienten Kontrollen (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15) beobachtet werden. Bis zum 96 h-Zeitpunkt stieg die HiBiT-Expression des Wildtypkonstrukts deutlich über den 4 h-Referenzwert hinaus an, während das Signal der replikationsdefizienten Konstrukte zunehmend auf Hintergrundniveau sank (Abbildung 3-15). Es konnte somit von einer funktionalen Replikation der transfizierten RNAs ausgegangen werden, die von der HiBiT-Insertion strangaufwärts von NS3 unbeeinträchtigt blieb.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen in den dargestellten HiBiT-Assays zeigte sich auch in den Western Blot-Analysen von L. Shalamova frühestens 36 h nach der Transfektion ein Unterschied in der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Polymerasemutation. Während in den Western Blot-Analysen mit steigendem Zeitpunkt jedoch stets stärkere Banden für NS3 beobachtet wurden (Shalamova 2019), konnte die Dynamik der Translation und Replikation in den HiBiT-Assays differenzierter dargestellt werden. Dies ist vermutlich zum einen auf den sensitiveren, quantitativen Proteinnachweis durch Luciferase-Assays (Lohcharoenkal et al. 2014) und zum anderen auf die unterschiedlichen Halbwertszeiten der jeweils detektierten Proteine zurückzuführen. Die Halbwertszeit des viralen NS3-Proteins ist mit 14,5 h (Pietschmann et al. 2001) im Gegensatz zum HiBiT-Protein mit lediglich 3 h (Herstellerangaben Promega) sehr lang, wodurch es zu stärkeren Überlagerungen zwischen den

Zeitpunkten und infolgedessen zu Unterschieden in der Proteindetektion zwischen den beiden Methoden kommen kann.

Die zeitliche Dynamik der HiBiT-Expression ähnelte mit geringer Latenz der Veränderung der Plusstrangabundanz in den vorausgegangenen RT-qPCR-Experimenten (Shalamova 2019). So wie sich in der RT-qPCR zunächst ein Abfall der Plusstrangabundanz bis 16 h nach der Transfektion infolge der Degradation der eingebrachten Plusstränge zeigte (Shalamova 2019), konnte eine Abnahme der HiBiT-Expression in den Luciferase-Assays ab dem 24 h-Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15). Die Plusstrangabundanz stieg in der RT-qPCR bereits 24 h nach der Transfektion erneut an (Shalamova 2019), die HiBiT-Expression hingegen erst zum 48 h-Zeitpunkt (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15). 72 h und 96 h nach der Transfektion nahm die HiBiT-Expression der Konstrukte mit aktiver Polymerase noch weiter zu (Abbildung 3-15), obwohl die Plusstrang-Abundanz zum 96 h-Zeitpunkt in der RT-qPCR schon wieder abnahm (Shalamova 2019).

Während die Menge der Minus- und Plusstränge in der RT-qPCR direkt gemessen wurde, konnte die Replikation im HiBiT-Assay nur indirekt durch eine erhöhte HiBiT-Expression im Vergleich zur replikationsdefizienten Kontrolle erfasst werden. Die im Zuge der Replikation neu gebildeten Plusstränge mussten somit erst wieder translatiert werden, um sie über eine erhöhte HiBiT-Expression detektieren zu können. Durch diesen „Umweg“ ergab sich vermutlich die zuvor ausgeführte zeitliche Latenz. Um definitive Aussagen treffen zu können, wären weiterführend RT-qPCR-Experimente mit den mutierten Konstrukten wünschenswert.

Zur Untersuchung potenzieller Auswirkungen auf die Replikation wurden die Mutationen in der NS5B-Region letztlich in das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt eingefügt.

4.2 Seltene Codons in der NS5B-Region sind funktionell relevant für die Replikation

Bis 24 h nach der Transfektion in Huh-7.5 Hepatomzellen zeigte sich auch im SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt kein Unterschied in der HiBiT-Expression zwischen den Mutanten, d. h. unabhängig von der Polymerase- und NS5B-Mutation (Abbildung 3-15). Entsprechend der Ergebnisse mit den vorherigen Konstrukten (pHCV-HiB-NS5B-26AS, 5'UTR-Core-NS5B-HiB) konnte zu diesen Zeitpunkten somit kein Einfluss der stillen Mutation der seltenen Codons zu effizienten Triplets in der NS5B codierenden Region auf die Translation der RNAs detektiert werden.

Zu den späten Zeitpunkten (72 h, 96 h) ergaben sich jedoch in Abhängigkeit von der Polymerase- und NS5B-Mutation signifikante Unterschiede in der HiBiT-Expression (Abbildung 3-15). Die HiBiT-Expression des Wildtypkonstrukts mit intakter Polymerase stieg nahezu exponentiell an, wohingegen die HiBiT-Expression von den Polymerase-defekten Konstrukten fortschreitend bis auf Hintergrundniveau abnahm. Das bedeutet, dass dieses Replikonsystem eine funktionelle intrazelluläre Replikation der Replikon-RNA erlaubte. In diesem System wiederum konnte eine signifikant geringere Zunahme des Lumineszenzsignals für die Codonmutante und die Aminosäuremutante beobachtet werden (Abbildung 3-15). Da sich die Unterschiede in der HiBiT-Expression ausschließlich zu den späten Zeitpunkten (72 h, 96 h) in den replikationsfähigen Konstrukten (Pol +) zeigten, ist davon auszugehen, dass die Mutation der ineffizienten Codons der HCV-Replikation schadet. Alternativ wären Auswirkungen auf die Translationseffizienz oder auf die Stabilität der RNAs, die sich erst durch RNA-Amplifikation detektierbar potenzierten, denkbar. Dies erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich, da sich die HiBiT-Expression der NS5B-Mutanten sowohl zu den frühen Zeitpunkten (4 h, 24 h) als auch zwischen den replikationsdefizienten Konstrukten zu den späteren Zeitpunkten nicht nennenswert unterscheidet (Abbildung 3-15). Wesentliche Unterschiede in der Zellzahl als Störfaktor konnten durch WST-1-Tests ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 3-16).

Die Codonmutante und das Wildtypkonstrukt unterschieden sich ausschließlich in den stillen Mutationen der seltenen Codons in der NS5B codierenden Region nahe des Stoppcodons. Der Genomanalyse von 102 repräsentativen HCV-Isolaten zufolge sind die im Rahmen der Arbeit mutierten ineffizienten Codons an den jeweiligen Positionen hochkonserviert, was einen Selektionsvorteil dieser Isolate nahelegt. Die in den Mutanten erzeugten effizienten Codons kommen unter natürlichen HCV-Isolaten lediglich vereinzelt anstelle der ineffizienten vor (Abbildung 1-4D). Codierend für Leucin findet sich an Position 9392 bzw. 9398 in 96 bzw. 101 aus 102 HCV-Isolaten das

ineffiziente Triplet „CUA“, nur in fünf bzw. einem Isolat das effiziente Codon „CUG“ (Abbildung 1-4D). Das seltene Valincodon „GUA“ ist an Position 9407 in 88 und an Position 3025 sogar in 101 HCV-Isolaten enthalten (Abbildung 1-4D) und damit ebenfalls hochkonserviert. Der Austausch dieser ineffizienten Codons gegen effiziente Triplets ging im Gegensatz zu den Missense-Mutationen des Kontrollkonstrukts weder mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz noch mit einer Veränderung der RNA-Sekundärstruktur des 5BSL3.3 einher (Abbildung 3-1B). Die beobachtete, signifikant geringere HiBiT-Expression der Codonmutante kann somit isoliert auf die Mutation der ineffizienten zu effizienten Codons zurückgeführt werden. Für verschiedene Organismen konnte bereits gezeigt werden, dass die stille Mutation von einem oder mehreren ineffizienten Codons die Aktivität des durch die jeweilige Sequenz codierten Proteins einschränken kann (Komar et al. 1999; Kimchi-Sarfaty et al. 2007; Yu et al. 2015). Dass die seltenen Codons unter den HCV-Isolaten überdies hochkonserviert sind, unterstützt die Annahme, dass sie für die Funktion der entstehenden NS5B-Polymerase und darüber für eine effiziente Replikation des HCV von Bedeutung sind.

Die einleitend dargestellten Ribosome Profiling-Ergebnisse von G. Gerresheim ließen bereits vermuten, dass die seltenen Codons zu einem Pausieren der Ribosomen strangaufwärts des Stoppcodons des ORFs führen (1.4.1). Eben diese Verzögerung der Termination der Translation könnte für die Aktivität der NS5B-Polymerase funktionell relevant sein. Entfällt die Entschleunigung der Translation hingegen durch die Mutation der seltenen zu häufigen Triplets, könnten cotranslationale Abläufe gestört werden und die Replikationseffizienz infolgedessen – wie in den vorliegenden HiBiT-Assays – sinken. Die gezielte Verteilung von ineffizienten Codons im Genom gilt als ein Mechanismus, um die Translationsrate innerhalb eines ORFs zu variieren und darüber cotranslationale Prozesse wie die korrekte Faltung oder Translokation des entstehenden Peptids an Membranen zu koordinieren (Zhang und Ignatova 2011; Quax et al. 2015). Zur sensitiven Detektion von solchen Fluktuationen der Translationsgeschwindigkeit eignet sich Ribosome-Profiling (Ingolia et al. 2009). Bislang wurde lediglich das Ribo-Seq-Profil des nicht-mutierten HCV-Genoms des Jc1-Isolats von G. Gerresheim analysiert (1.4.1). Weiterführend wären auch Ribosome Profiling-Experimente mit der entsprechenden Codonmutante interessant, um die Ribo-Seq-Profile hinsichtlich der Ribosomenfußabdrücke zu vergleichen.

In welcher Weise die Entschleunigung der Translation durch die konservierten, ineffizienten Codons bedeutend für eine effiziente HCV-Replikation sein könnte, kann anhand der bisherigen Kenntnisse zur Struktur und Funktion der NS5B-Polymerase nur spekuliert werden. Die NS5B-Polymerase besteht aus einer katalytischen Domäne (ca. 530 AS), einer verbindenden Linker-Sequenz (ca. 40 AS) und einem C-terminalen

Membrananker (21 AS) (Lohmann 2013; Harrus et al. 2010). Die im Ribo-Seq-Profil entdeckten zwei großen Peaks am Ende der NS5B codierenden Region deuten darauf hin, dass die Ribosomen hier bei der Termination der Translation verzögert werden, sodass ein Teil des NS5B-Peptids im ribosomalen Exittunnel stecken bleibt. Ausgehend davon, dass der ribosomale Exittunnel 30 – 40 AS bedeckt (Liutkute et al. 2020; Blobel und Sabatini 1970), müssten dadurch bei dem Peak am Stoppcodon die C-terminalen 30 – 40 AS der Polymerase ungefaltet im Austrittstunnel verbleiben. Der davorliegende größte Teil des Enzyms mit der katalytischen Domäne hingegen könnte sich vollständig falten. Auch das Ribosom des aufwärts gelegenen Peaks mit dem seltenen Valincodon im Zentrum könnte bereits eine fertig gefaltete aktive katalytische Domäne der Replikase tragen. Zwischen dem seltenen Valincodon und dem Stoppcodon liegen ca. elf Aminosäuren, sodass sich lediglich die C-terminalen 41 – 51 AS nicht falten dürften. Davon wäre zwar ein Teil des Linkers betroffen, der für die Initiation der Replikation von Bedeutung ist (Harrus et al. 2010), die katalytische Domäne selbst hingegen nicht (Mosley et al. 2012).

An beiden Ribosomen könnte die katalytische Domäne der Polymerase somit schon vollständig cotranslational gefaltet vorliegen, ohne von einer Entschleunigung der Termination der Translation zu profitieren. Die C-terminalen 21 AS, die für den hydrophoben Membrananker der NS5B-Polymerase codieren, müssten andererseits auch bei dem Peak am Stoppcodon noch vollständig vom ribosomalen Exittunnel bedeckt sein, sodass eine funktionelle Relevanz des Ribosome Pausings zwecks Membranverankerung unwahrscheinlich erscheint. Durch Ribosome Profiling-Analysen von Transmembranproteinen konnte bereits gezeigt werden, dass Cluster von seltenen Codons in der Regel ca. 35 – 40 AS strangabwärts von Signalsequenzen des Signalerkennungspartikels zu finden sind (Pechmann et al. 2014). Studien, die sich mit der Membranassoziation von NS5B auseinandersetzen, deuten überdies darauf hin, dass die Membranverankerung der Polymerase posttranslational geschieht (Schmidt-Mende et al. 2001).

Angesichts der Lokalisation der seltenen Codons am C-terminalen Ende der NS5B codierenden Region und des Peaks am Stoppcodon ist zu überlegen, dass das Hinauszögern der Termination der Translation für einen effizienten Wechsel zur Replikation relevant sein könnte. Die Entschleunigung der Synthese und Faltung zweier NS5B-Moleküle kurz vor und auf dem Stoppcodon könnte das Verweilen der beiden weitgehend fertig gefalteten NS5B-Polymerasen auf der HCV-RNA erlauben und ihnen dadurch Zeit geben, bereits cotranslational (möglicherweise als NS5B-Dimer) ihr Template für die Minusstrangsynthese, das 3'-Ende des Plusstrangs, in *cis* zu finden (Gerresheim et al. 2020).

Die RNA-Bindung durch die NS5B-Polymerase wurde in vorangegangenen Studien *in vitro* als langsamer und ineffizienter Prozess beschrieben (Lohmann 2013; Liu et al. 2006). Die NS5B-Polymerase initiiert die Replikation i. d. R. *de novo*, obwohl die Bedingungen dafür suboptimal sind. Während das 3'-Ende des Minusstrangs ein Schleifenelement mit einzelsträngigem Überhang aufweist und sich damit gut zur *de novo* Initiation eignet, stellt das in einem doppelsträngigen Stamm gebundene 3'-Ende des Plusstrangs kein ideales Template dar (Lohmann 2013). Nach der Bindung ihres RNA-Templates und der entsprechenden Nukleotide initiiert die NS5B-Polymerase die Replikation *de novo* durch die Synthese eines Dinukleotidprimers. Dieser Initiationskomplex ist allerdings sehr instabil und kann leicht dissoziieren (Lohmann 2013). Diese suboptimalen Initiationsbedingungen unterstützen die These, dass die Polymerase Zeit und Hilfe brauchen könnte, um ihr Plusstrang-Template zu binden und die Minusstrangsynthese *in vivo* effizient zu initiieren.

Durch das Verweilen der Ribosomen nahe des Stoppcodons der NS5B codierenden Region und das Feststecken des C-terminalen Membranankers im ribosomalen Austrittstunnel würde die Polymerase in der Nähe des 3'-Endes des Plusstrangs und damit auf ihrem eigenen Template festgehalten werden. Die Nähe des aktiven Zentrums der Polymerase und des 3'-Endes des Plusstranggenoms könnte durch die „kissing loop“-Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL 2 der 3'-X-Region sowie durch die Flexibilität des einzelsträngigen p(U/C)-Trakts noch unterstützt werden. Sowohl die „kissing loop“-Interaktion als auch eine gewisse Mindestlänge des p(U/C)-Trakts gelten als essentiell für die Replikation des HCV (Friebe et al. 2005; You und Rice 2008). Der 5BSL3.2 (CRE) bindet darüber hinaus auch die NS5B-Polymerase (Lee et al. 2004). Dadurch könnte ein Dimer von NS5B auf der HCV-RNA so stabilisiert werden, dass ein Monomer durch Bindung an das CRE zusätzlich – beziehungsweise auch nach Termination der Translation der NS5B-Moleküle – an die RNA gebunden wird, während das zweite Monomer ausreichend Zeit erhält, um das 3'-Ende der RNA zu finden und dort die Minusstrang-Synthese zu initiieren (Gerresheim et al. 2020). Hierrüber könnte der NS5B-Polymerase das Auffinden ihres Templates und der Start der Minusstrang-Synthese erleichtert werden und die fälschliche Bindung von ähnlichen, zellulären RNAs mit der Folge von aberranter RNA-Synthese vermieden werden. Hinweise für eine Interaktion von mehreren NS5B-Monomeren und eine funktionelle Oligomerisierung liegen bereits vor, eine Dimerisierung konnte experimentell allerdings noch nicht explizit belegt werden (Wang et al. 2002; Clemente-Casares et al. 2011).

Abbildung 4-1 zeigt ein Modell zur Visualisierung, wie Ribosome Pausing am C-terminalen Ende der NS5B codierenden Region dazu beitragen könnte, dass die naszierende NS5B-Polymerase bereits cotranslational zu ihrem Plusstrang-Template in

cis geleitet wird (Gerresheim et al. 2020). Es ist allerdings zu beachten, dass es sich bei dem Modell lediglich um eine theoretische Überlegung handelt und die experimentelle Untersuchung der genauen Abläufe noch aussteht.

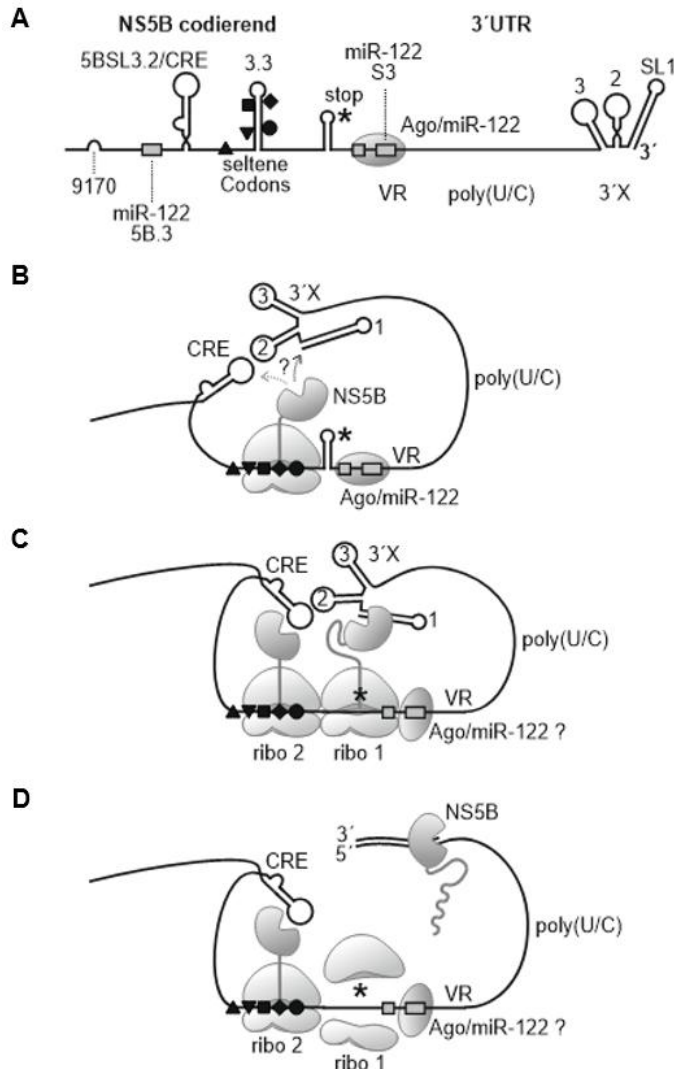


Abbildung 4-1: Modell zur Darstellung der funktionellen Bedeutung des Ribosome Pausing in der NS5B codierenden Region für die HCV Replikation. (A) zeigt den Ausschnitt der NS5B codierenden Region nahe des Stoppcodons und die HCV-3'UTR. Die relevanten Sekundärstrukturen 5BSL3.2 (CRE) und 5BSL3.3 sowie SL 1 – 3 der HCV-3'UTR sind eingezeichnet. (B) Das auf dem seltenen Valincodon pausierende Ribosom trägt die bereits fertig gefaltete katalytische Domäne der NS5B-Polymerase, die durch ihre Bindung an das CRE (5BSL3.2) und durch die „kissing loop“ Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL 2 des 3'X-Schwanzes (3'X) in räumliche Nähe zum SL 1 der 3'X-Region gebracht wird. Es ist sowohl eine Interaktion mit dem CRE als auch eine direkte Bindung des Templates denkbar („?“). (C) Eventuell schon vor, auf jeden Fall aber nach der Termination der Translation kann die NS5B-Polymerase an ihrem gebundenen RNA-Template die Replikation initiieren und danach dann mit der Elongation fortfahren (D), während die Translation am nächsten Ribosom durch die seltenen Codons verzögert wird. Denkbar ist auch, dass ein NS5B-Dimer nicht nur während der Initiation, sondern auch bei der Elongation der RNA-Minusstrang-Synthese erhalten bleibt. Die seltenen Codons sind wie in den vorigen Abbildungen als schwarze Symbole dargestellt. Das Stoppcodon ist durch einen Stern und die Bindungsstellen der microRNA-122 als Boxen gekennzeichnet. Verändert nach Gerresheim und Hess (Gerresheim et al. 2020) (Abdruck mit Genehmigung von M. Niepmann).

Abgesehen von den seltenen Codons finden sich in der NS5B-Region des Plusstrangs noch die starken Sekundärstrukturen des 5BSL3.1, 5BSL3.2 und 5BSL3.3, die von den Ribosomen durchbrochen werden müssen (Abbildung 4-1A). Es liegen allerdings keine experimentellen Ergebnisse vor, die implizieren, dass die Ribosomen durch deren Passage schon verlangsamt werden (1.4.1). Wenn dem so wäre, müsste im Ribosome Profiling ein Ribosomen-Peak direkt vor einer sehr stabilen doppelsträngigen RNA-Sekundärstruktur zu sehen sein – das ist aber nicht der Fall. Dem in Abbildung 4-1 dargestellten Modell zufolge könnte das führende Ribosom dagegen nach dem Überwinden des 5BSL3.3 durch die seltenen Leucincodons gebremst werden, bis es auf dem seltenen Valincodon schließlich pausiert (Abbildung 4-1B). Die

katalytische Domäne müsste derweil schon den ribosomalen Austrittstunnel verlassen haben, sodass das pausierende Ribosom ein naszierendes NS5B-Peptid mit weitgehend fertig gefaltetem aktiven Zentrum tragen müsste. Das Pausieren des Ribosoms wiederum gäbe dem aktiven Zentrum der Polymerase dann Zeit, sein Plusstrang-Template in *cis* (SL 1 der 3'X-Region) zu finden (Abbildung 4-1B). NS5B könnte dabei zunächst mit dem CRE interagieren oder durch die Flexibilität des p(U/C) direkt sein Template binden (Abbildung 4-1B). Durch das Feststecken des C-Terminus der Polymerase im ribosomalen Austrittstunnel einerseits sowie die „kissing loop“-Interaktion zwischen 5BSL3.2 und SL 2 des 3'X-Schwanzes andererseits wird die räumliche Nähe zwischen dem aktiven Zentrum der Polymerase und SL 1 der 3'X-Region gefördert (Abbildung 4-1C). Am Stoppcodon würde das Ribosom erneut verzögert werden, sodass der NS5B-Replikase ausreichend Zeit bleibt, ihr RNA-Template im aktiven Zentrum zu positionieren (Abbildung 4-1C) und nach Termination der Translation die Minusstrangsynthese zu initiieren (Abbildung 4-1D). Das nächste Ribosom würde derweil bereits auf dem seltenen Valincodon gebremst werden (Abbildung 4-1C).

Zur Analyse von Translationskinetik, cotranslationaler Proteinfaltung und Protein-Nukleinsäure-Interaktionen in Echtzeit wurde in mehreren Studien der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eingesetzt (Buhr et al. 2016; Malinen et al. 2022). Mit Blick auf die HCV-Forschung fand FRET zudem bereits Anwendung in der Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion bzw. funktionellen Oligomerisierung von NS5B (Clemente-Casares et al. 2011). Die Methode könnte entsprechend wegweisend sein, um die zuvor ausgeführten Abläufe experimentell genauer nachzuvollziehen. Sowohl in der hochkonservierten NS5B codierenden Region als auch in der 3'UTR müssten dazu allerdings zunächst geeignete Farbstoff-Insertionsstellen etabliert werden.

4.3 Limitationen der hier vorgelegten Arbeit

Um den Einfluss der Mutation der ineffizienten zu effizienten Codons in der NS5B-Region auf die Replikation zu untersuchen, wurden mit dem SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt zehn unabhängige HiBiT-Assays durchgeführt. So konnte eine solide Datengrundlage generiert werden, die einen deutlichen Trend zeigte und eine statistische Auswertung ermöglichte. Dennoch wäre, insbesondere mit Blick auf die ausgeprägte biologische Variabilität im Zellmodell, eine höhere Anzahl unabhängiger Versuche hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Effekte wünschenswert.

In Bezug auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Replikationszyklus des *full-length* HCV muss limitierend genannt werden, dass im Zuge dieser Dissertation

lediglich mit subgenomischen HCV-Replikons gearbeitet wurde. Subgenomische Replikons sind zwar gerade bei HCV ein etabliertes System zur Untersuchung der viralen Translation und Replikation, allerdings bilden sie allein durch das Fehlen der nicht-essentiellen RNA-Strukturelemente und Protein-codierenden Sequenzen nicht alle Aspekte des natürlichen Replikationszyklus ab. Die Experimente sollten daher weiterführend mit *full-length* Replikons wiederholt werden, wobei hier zunächst eine geeignete HiBiT-Insertionsstelle etabliert werden muss.

Sowohl die Ribosome Profiling-Experimente von G. Gerresheim als auch die HiBiT-Assays im Rahmen dieser Arbeit erfolgten ausschließlich mit dem JFH1-Isolat von Genotyp 2a, sodass die Aussagen zunächst lediglich für den vorliegenden Genotyp getroffen werden können. Da die seltenen Codons der Genomanalyse zufolge unter den meisten HCV-Isolaten konserviert sind (Gerresheim et al. 2020), ist eine funktionelle Relevanz für die HCV-Replikation auch in anderen Genotypen anzunehmen. Die Ergebnisse sollten dazu jedoch noch in weiteren HCV-Isolaten experimentell validiert werden.

Methodisch ist kritisch zu berücksichtigen, dass die Replikation der transfizierten RNAs nicht direkt, sondern lediglich indirekt erfasst wurde, indem die Translation der neu synthetisierten Plusstränge in den Zellen mittels HiBiT-Assays quantifiziert wurde. Auf diese indirekte Messung der Abundanz der Replikons musste sich beschränkt werden, weil zu diesem Zeitpunkt in der AG Niepmann aus technischen Gründen noch keine Möglichkeit der spezifischen direkten Erfassung der Plusstränge bestand. Da die Proteinexpression jedoch nur ein indirektes Maß für die Plusstrangabundanz darstellt, sind neben der Replikation der RNAs auch deren Stabilität, die Translationseffizienz und zelluläre Faktoren als Einflussfaktoren zu berücksichtigen. Um definitive Aussagen treffen zu können, ist die direkte Erfassung der Minus- und Plusstrangabundanz mittels RT-qPCR nach Etablierung eines sensitiven Protokolls nötig.

Hinsichtlich der statistischen Auswertung ist darüber hinaus anzumerken, dass das Kriterium der Varianzhomogenität bei Betrachtung aller Subgruppen mittels ANOVA verletzt wurde. Begründet sind die Varianzunterschiede durch die Ausprägung der Polymerase (+/-), die biologische Variabilität der Zellen sowie der RNAs und die infolge der Normalisierung fehlende Streuung der Werte des Wildtypkonstrukts bei 4 h, wobei es sich hier zum Teil um gewünschte Effekte handelt (Faktor Zeitpunkt, Polymerase). Im Rahmen der statistischen Beratung wurden die Daten analysiert und festgestellt, dass die Varianz innerhalb der für den untersuchten Effekt relevanten Subgruppen weitestgehend gegeben war. Für die zentralen Fragestellungen der Arbeit bleibt die Aussagekraft der ANOVA daher erhalten. Beim Vergleich von Subgruppen mit ausgeprägter Varianzinhomogenität (bspw. Pol +/-) sollte diese Einschränkung bei der

Interpretation der Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden. Alternativ wären nicht-parametrische Tests möglich, wobei dann eine deutliche Einschränkung der Teststärke hinzunehmen wäre.

In Zusammenschau mit den Ribosome Profiling Ergebnissen von G. Gerresheim scheint es wahrscheinlich, dass die ineffizienten Codons in der NS5B codierenden Region zu einer Verlangsamung der Translation im Sinne von Ribosome Pausing führen und diese relevant für die HCV-Replikation ist, jedoch ist der Kausalzusammenhang bislang nicht experimentell erwiesen. Das oben dargestellte Modell basiert rein auf theoretischen Überlegungen und bedarf weiterer Forschung, vorzugsweise durch Interaktionsstudien zur Aufschlüsselung der konkreten Abläufe und Interaktionen. Aus zeitlichen und finanziellen Gründen war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.4 Fazit und Ausblick

Viele Details zum Ablauf der Translation und Replikation des HCV sowie zum Wechsel zwischen beiden Prozessen sind bis heute noch nicht bekannt. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge könnte eine Verlangsamung der Translation durch Ribosome Pausing in der C-terminalen NS5B-Region für die HCV-Replikation von Bedeutung sein, indem ein effizienter Wechsel zwischen Translation und Replikation ermöglicht wird.

Die konservierten, seltenen Codons in der NS5B codierenden Region nahe des Stoppcodons scheinen sowohl für das in Vorexperimenten detektierte Ribosome Pausing ursächlich als auch für die HCV-Replikation funktionell relevant zu sein. Die stille Mutation der ineffizienten Codons zu häufigen Triplets führte ohne Veränderung der Sekundärstruktur des 5BSL3.3 zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Replikationseffizienz der HCV-Replikons, während die Translationseffizienz nicht messbar beeinflusst wurde.

Mechanistisch könnte die Verlangsamung der Translation in der C-terminalen NS5B-Region der NS5B-Replikase erlauben, bereits cotranslational ihr RNA-Template zu finden und – nach oder sogar während der Termination der Translation – effizient die Minusstrangsynthese zu initiieren. Dabei kann angenommen werden, dass der schon aus dem Ribosom ausgetretene enzymatisch aktive Kern der NS5B-Polymerase bereits korrekt gefaltet ist und in *cis* an das 3'-Ende des Genoms binden kann. Der lange C-terminale Schwanz von NS5B, der auch die Transmembran-Helix enthält, steckt durch das Pausieren der Translation auf den ineffizienten Codons bzw. durch die länger andauernde Termination hingegen noch im Ribosom fest. Die Tatsache, dass zwei Ribosomen pausieren (eins auf den ineffizienten Codons und eins auf dem Stopp-

Codon) legt sogar die Überlegung nahe, dass möglicherweise ein Dimer von NS5B für die effiziente Initiation der Minusstrang-Synthese nötig ist.

Der genaue Ablauf basiert derzeit allerdings nur auf theoretischen Überlegungen und bedarf noch weiterer Forschung zur experimentellen Validierung. Interessant wäre zunächst die zusätzliche Analyse mittels RT-qPCR zur Erfassung der Auswirkungen auf RNA-Ebene durch die direkte Messung der Minus- und Plusstrangabundanz. Weiterführend könnten Methoden wie der Förster-Resonanzenergietransfer wegweisend sein, um die konkreten Vorgänge und Interaktionen experimentell nachzuvollziehen.

Die seltenen Codons in der NS5B-Region sind unter den meisten HCV-Isolaten konserviert, sodass anzunehmen ist, dass die Ergebnisse auf die meisten Genotypen übertragen werden können. Zur Verifizierung der Übertragbarkeit wäre allerdings die Wiederholung der Experimente mit anderen HCV-Isolaten und *full-length* RNAs angebracht. Nach Einführung der stillen Mutationen in *full-length* Replikons wären darüber hinaus Ribosome Profiling Experimente mit der Codonmutante wünschenswert, um das Ribo-Seq-Profil hinsichtlich der Translationsrate mit dem bereits analysierten Wildtyp zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus zählt zu den humanpathogenen Viren mit einzelsträngigen RNA-Genomen mit positiver Polarität. Es befällt vorwiegend Leberzellen und verursacht bei knapp 70 % der Betroffenen eine chronische Hepatitis C. Trotz der Verfügbarkeit hochwirksamer antiviraler Medikamente wird der Behandlungserfolg durch die oftmals späte Diagnosestellung und den begrenzten Medikamentenzugang limitiert. Unbehandelt führt die chronische Hepatitis C im Verlauf einiger Jahre zu einer Leberzirrhose, die mit einem erhöhten Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom einhergeht, das in vielen Fällen nicht mehr kurativ therapiert werden kann. Ein Impfstoff wurde bislang nicht entwickelt. Obwohl HCV-Infektionen bis heute ein weltweites Gesundheitsproblem darstellen, ist über den molekularen Ablauf der Translation und Replikation sowie den Wechsel zwischen beiden Prozessen bis heute vieles nicht bekannt. Es bedarf daher weiterer Forschung zur Aufschlüsselung des viralen Replikationszyklus.

In vorausgegangenen Studien von G. Gerresheim wurden zwei pausierende Ribosomen auf und vor dem NS5B-Stoppcodon sowie eine Häufung von konservierten, ineffizienten Codons in der NS5B codierenden Region vor dem Stoppcodon detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die ineffizienten Codons eine funktionelle Bedeutung in der Translation oder Replikation des HCV haben. Dazu wurden verschiedene subgenomische HCV-Replikons entwickelt, bei denen die ineffizienten Codons still, d. h. ohne Veränderung der Aminosäuresequenz oder der Sekundärstruktur der RNA, zu effizienten Triplets mutiert wurden. Um die Auswirkungen auf die Translations- und Replikationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp zu erfassen, wurden die Replikons in Huh-7.5 Hepatomzellen transfiziert und zu definierten Zeitpunkten HiBiT-Translationsreporter-Assays durchgeführt. Die Translation der Genome wurde dabei als ein indirektes Maß für die Abundanz der Genome betrachtet.

Die stille Mutation der ineffizienten zu effizienten Codons hatte in den Assays einen signifikanten negativen Einfluss auf die Replikation der Konstrukte, während die Translation nicht beeinträchtigt wurde. Das Pausieren der Ribosomen auf den ineffizienten Codons in der C-terminalen NS5B-Region scheint somit für die effiziente Initiation der HCV-Replikation durch die NS5B-Polymerase relevant zu sein, möglicherweise sogar als NS5B-Dimer. Dies könnte dadurch vermittelt werden, dass die schon gefaltete katalytische Domäne der NS5B-Polymerase durch das Pausieren genügend Zeit hat, cotranslational auf dem nahe gelegenen 3'-Ende des Genoms ihr Template für die Minusstrang-Synthese in *cis* zu binden.

6 Summary

The hepatitis C virus (HCV) belongs to the group of human-pathogenic viruses with single-stranded RNA genomes of positive polarity. It predominantly infects hepatocytes, causing chronic hepatitis in approximately 70 % of infected individuals. Despite the availability of highly effective antiviral drugs, treatment outcomes are often limited due to delayed diagnosis and restricted access to medications. If left untreated, chronic hepatitis C progresses over several years to liver cirrhosis, which is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma, a condition that often can no longer be treated curatively. Until today, no vaccine has been developed. Although HCV infections remain a global health issue, so far, many aspects of the molecular processes underlying translation, replication and the switch in between are poorly understood. Therefore, research into the viral life cycle needs to be continued.

Previous studies by G. Gerresheim detected two pausing ribosomes at and upstream of the NS5B stop codon, and an accumulation of conserved, inefficient codons in the NS5B-coding region upstream of the HCV stop codon.

This study aimed to investigate whether the inefficient codons play a functional role in the translation or replication of HCV. In order to analyse that, various subgenomic HCV replicons were designed in which the inefficient codons were silently mutated – i. e. without modifying the amino acid sequence or the RNA secondary structure – into efficient triplets. In order to assess the effects on translation and replication efficiency compared to the wild type, the replicons were transfected into Huh-7.5 hepatoma cells, and translation efficiency was tested using the inserted HiBiT tag at defined time points. Here, HiBiT translation was used as a surrogate for plus strand abundance.

Silent mutation of inefficient codons to efficient ones significantly impaired replication of the constructs in the assays, while translation remained unaffected. In conclusion, ribosome pausing at the inefficient codons in the C-terminal NS5B region appears to be important for efficient HCV replication by the NS5B polymerase (likely even coming as a dimer), probably by providing enough time for the folded catalytic domain of the NS5B polymerase to cotranslationally bind its genuine template for negative-strand synthesis initiation at the very 3'-end of the genome in *cis*.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
1x V	einfach verdaut
2x V	doppelt verdaut
3'X	3'X Schwanz
A	Adenin
A	Alanin
AA	Aminosäuremutante
Abk.	Abkürzung
AG	Arbeitsgruppe
AmpR	Ampicillin-Resistenz
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
BB	Backbone
bp	Basenpaare
C	Core-Protein
C	Cytosin
CMV	Cytomegalievirus
com	engl. <i>common</i>
com	Codonmutante (hin zu einem effizienten Codon)
CRE	engl. <i>cis-replication element</i>
D	Domäne
DAA	engl. <i>direct-acting antiviral</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DLS	engl. <i>dimerization linkage sequence</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	engl. <i>envelope</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
EMR	engl. Eastern Mediterranean Region

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i>
Fluc2	engl. <i>Firefly Luciferase 2</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Glycin
G	Guanin
GT	Genotyp
GTP	Guanosintriphosphat
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis Delta Virus
Hfk.	Häufigkeit
HiB	HiBiT
HWZ	Halbwertszeit
I	Insert
I	Isoleucin
IRES	engl. <i>internal ribosome entry site</i>
JASP	engl. <i>Jeffreys's Amazing Statistics Program</i>
kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
LB	Lennox Broth
LDL	engl. <i>low-density lipoprotein</i>
leaky	<i>leaky</i> Stoppcodon
Leu	Leucin
M	Marker
Men	Mengovirus
miRNA	microRNA
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
n	Stichprobengröße
NS	Nichtstrukturprotein
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
P	Prolin
P2A	P2A-Peptid
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
Pol	Polymerase

Pol +	Polymerase aktiv
Pol -	Polymerase inaktiv
P/S	Penicillin/Streptomycin
p(U/C)	poly-Uracil/Cytosin-Trakt
R	Arginin
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rNTPs	Ribonukleosidtriphosphate
RT-qPCR	engl. <i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
S	Serin
S	Svedberg-Sedimentationskonstante
SD	Standardabweichung
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SL	engl. <i>stem-loop</i>
SNAPf	SNAP-Protein
ss	engl. <i>single stranded</i>
T	Threonin
T	Thymin
T7P	T7-Promotor
T7T	T7-Terminator
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
UE	Untereinheit
UTR	unverdaut
UV	engl. <i>untranslated region</i>
Val	Valin
VLDL	engl. <i>very low-density lipoprotein</i>
VR	variable Region
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
Y	Tyrosin
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des lipoviralen Partikels.	4
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des HCV-Genoms.....	5
Abbildung 1-3: Ribosome Profiling des HCV Genoms in Huh-7.5 Hepatomzellen.	12
Abbildung 1-4: Ribosome Pausing in der NS5B-Region.	13
Abbildung 2-1: Verteilungsdiagramm vor und nach dem Logarithmieren der Messwerte.....	41
Abbildung 2-2: Regenwolke-Diagramm zur Darstellung der Streuung.	43
Abbildung 3-1: Mutation der Wildtypsequenz.....	44
Abbildung 3-2: Aufbau des Konstrukts pHCV-HiB-NS5B-26AS.	47
Abbildung 3-3: Weg der Klonierung des Konstrukts pHCV-HiB-NS5B-26AS in Gelbildern.....	49
Abbildung 3-4: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit pHCV-NS5B- 26AS-rare/-com.....	50
Abbildung 3-5 Aufbau des 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukts.	52
Abbildung 3-6: Weg der Klonierung des 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukts in Gelbildern.....	53
Abbildung 3-7: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit 5'UTR-Core- NS5B-HiB.....	55
Abbildung 3-8: Deskriptive Abbildung für den Faktor NS5B-Mutation im 5'UTR- Core-NS5B-HiB-Konstrukt.....	57
Abbildung 3-9: Aufbau des 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukts.	58
Abbildung 3-10: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit 5'UTR-Core- EMCV-HiB.....	60
Abbildung 3-11: Deskriptive Abbildung für den Faktor NS5B-Mutation im 5'UTR- Core-EMCV-HiB-Konstrukt.....	61
Abbildung 3-12: Aufbau des SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukts.....	62
Abbildung 3-13: Weg der Klonierung des SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukts in Gelbildern.....	63

Abbildung 3-14: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit SLI-III-EMCV-HiB.	64
Abbildung 3-15: Relative Lumineszenzsignale im HiBiT-Assay mit SLI-III-EMCV-HiB.	67
Abbildung 3-16: Durchschnittliche Formazan-Absorption in WST-1-Assays zur Detektion der Zellvitalität.	68
Abbildung 3-17: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB für die Varianten mit aktiver Polymerase.	70
Abbildung 3-18: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB für die Varianten mit inaktiver Polymerase.	71
Abbildung 4-1: Modell zur Darstellung der funktionellen Bedeutung des Ribosome Pausings in der NS5B codierenden Region für die HCV Replikation.	84
Abbildung 11-1: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Datensatz.	118
Abbildung 11-2: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Datensatz.	119
Abbildung 11-3: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für SLI-III-EMCV-HiB-Datensatz.	120

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 2-2: Verwendete wiederverwendbare Materialien	15
Tabelle 2-3: Verwendete Geräte.....	15
Tabelle 2-4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 2-5: Verwendete Kit-Systeme	17
Tabelle 2-6: Verwendete Puffer	18
Tabelle 2-7: Verwendete Enzyme und Puffer	19
Tabelle 2-8: Verwendete Plasmide	19
Tabelle 2-9: Verwendete Nukleotide.....	21
Tabelle 2-10: Verwendete Primer	21
Tabelle 2-11: Verwendete Größen- und Längenstandards	22
Tabelle 2-12: Verwendete Kulturmedien.....	22
Tabelle 2-13: Verwendete Bakterienstämme	22
Tabelle 2-14: Verwendete Zelllinien.....	23
Tabelle 2-15: Ansatz für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	33
Tabelle 3-1: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit 5'UTR-Core-NS5B-HiB.....	56
Tabelle 3-2: Standard-Post-hoc-Test für den Faktor NS5B-Mutation.	56
Tabelle 3-3: 2-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit 5'UTR-Core-EMCV-HiB.....	61
Tabelle 3-4: 3-faktorielle ANOVA der HiBiT-Assays mit SLI-III-EMCV-HiB.	69
Tabelle 3-5: Standard-Post-hoc-Test für die Interaktion Zeitpunkt * Polymerase.	69
Tabelle 11-1: Elemente des pUC57-pHCV-SNAPf-Fluc2-P2A-HiB-NS5B-26AS.....	112
Tabelle 11-2: Elemente des pUC18-5'UTR-Core-NS5B-HiB.....	113
Tabelle 11-3: Elemente des pUC18-5'UTR-Core-EMCV-HiB.....	114
Tabelle 11-4: Elemente des pUC18-SLI-III-EMCV-HiB.	115
Tabelle 11-5: 1- bzw. 3-Buchstabencode der in der Arbeit erwähnten Aminosäuren.	116
Tabelle 11-6: Deskriptive Statistik der ANOVA mit 5'UTR-Core-NS5B-HiB.	117

Tabelle 11-7: Deskriptive Statistik der ANOVA mit 5'UTR-Core-EMCV-HiB.	118
Tabelle 11-8: Deskriptive Statistik der ANOVA mit SLI-III-EMCV-HiB.....	119
Tabelle 11-9: Post-hoc-Vergleiche aller Subgruppen im SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt zur Analyse der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Polymerase, NS5B-Mutation und Zeitpunkt.....	121

10 Literaturverzeichnis

- Aguilar Rangel, M.; Stein, K.; Frydman, J. (2024): A Machine Learning Approach Uncovers Principles and Determinants of Eukaryotic Ribosome Pausing. In: *Science Advances* 10 (42), eado0738. DOI: 10.1126/sciadv.ado0738.
- Appel, N.; Zayas, M.; Miller, S.; Krijnse-Locker, J.; Schaller, T.; Friebe, P. et al. (2008): Essential Role of Domain III of Nonstructural Protein 5A for Hepatitis C Virus Infectious Particle Assembly. In: *PLoS Pathogens* 4 (3), e1000035. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000035.
- Arumugaswami, V.; Remenyi, R.; Kanagavel, V.; Yiang Sue, E.; Ngoc Ho, T.; Liu, C. et al. (2008): High-Resolution Functional Profiling of Hepatitis C Virus Genome. In: *PLoS Pathogens* 4 (10), e1000182. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000182.
- Awadh, A. A. (2023): The Role of Cytosolic Lipid Droplets in Hepatitis C Virus Replication, Assembly, and Release. In: *BioMed Research International* 2023, S. 5156601. DOI: 10.1155/2023/5156601.
- Bartenschlager, R.; Ahlborn-Laake, L.; Mous, J.; Jacobsen, H. (1994): Kinetic and Structural Analyses of Hepatitis C Virus Polyprotein Processing. In: *Journal of Virology* 68 (8), S. 5045–5055.
- Bartenschlager, R.; Lohmann, V.; Wilkinson, T.; Koch, J. (1995): Complex Formation Between the NS3 Serine-Type Proteinase of the Hepatitis C Virus and NS4A and its Importance for Polyprotein Maturation. In: *Journal of Virology* 69 (12), S. 7519–7528. DOI: 10.1128/JVI.69.12.7519-7528.1995.
- Behrens, S. E.; Tomei, L.; Francesco, R. de (1996): Identification and Properties of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus. In: *The EMBO Journal* 15 (1), S. 12–22.
- Berry, K.; Waghray, S.; Doudna, J. A. (2010): The HCV IRES Pseudoknot Positions the Initiation Codon on the 40S Ribosomal Subunit. In: *RNA (New York, N. Y.)* 16 (8), S. 1559–1569. DOI: 10.1261/rna.2197210.
- Blight, K. J.; McKeating, J. A.; Marcotrigiano, J.; Rice, C. M. (2003): Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 1a RNAs in Cell Culture. In: *Journal of Virology* 77 (5), S. 3181–3190. DOI: 10.1128/jvi.77.5.3181-3190.2003.
- Blight, K. J.; Norgard, E. A. (2006): Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. HCV Replicon Systems. Hg. v. Seng-Lai Tan. Norfolk (UK).

- Blobel, G.; Sabatini, D. D. (1970): Controlled Proteolysis of Nascent Polypeptides in Rat Liver Cell Fractions. I. Location of the Polypeptides within Ribosomes. In: *The Journal of Cell Biology* 45 (1), S. 130–145. DOI: 10.1083/jcb.45.1.130.
- Borman, A. M.; Bailly, J. L.; Girard, M.; Kean, K. M. (1995): Picornavirus Internal Ribosome Entry Segments: Comparison of Translation Efficiency and the Requirements for Optimal Internal Initiation of Translation in vitro. In: *Nucleic Acids Research* 23 (18), S. 3656–3663. DOI: 10.1093/nar/23.18.3656.
- Borman, A. M.; Le Mercier, P.; Girard, M.; Kean, K. M. (1997): Comparison of Picornaviral IRES-driven Internal Initiation of Translation in Cultured Cells of Different Origins. In: *Nucleic Acids Research* 25 (5), S. 925–932. DOI: 10.1093/nar/25.5.925.
- Boulant, S.; Targett-Adams, P.; McLauchlan, J. (2007): Disrupting the Association of Hepatitis C Virus Core Protein with Lipid Droplets Correlates with a Loss in Production of Infectious Virus. In: *The Journal of General Virology* 88 (Pt 8), S. 2204–2213. DOI: 10.1099/vir.0.82898-0.
- Buhr, F.; Jha, S.; Thommen, M.; Mittelstaet, J.; Kutz, F.; Schwalbe, H. et al. (2016): Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding Towards Different Protein Conformations. In: *Molecular Cell* 61 (3), S. 341–351. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.01.008.
- Cao, J.; Geballe, A. P. (1996): Coding Sequence-Dependent Ribosomal Arrest at Termination of Translation. In: *Molecular and Cellular Biology* 16 (2), S. 603–608. DOI: 10.1128/MCB.16.2.603.
- Catanese, M. T.; Uryu, K.; Kopp, M.; Edwards, T. J.; Andrus, L.; Rice, W. J. et al. (2013): Ultrastructural Analysis of Hepatitis C Virus Particles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23), S. 9505–9510. DOI: 10.1073/pnas.1307527110.
- Chen, W.; Dev, J.; Mezhyrova, J.; Pan, L.; Piai, A.; Chou, J. J. (2018): The Unusual Transmembrane Partition of the Hexameric Channel of the Hepatitis C Virus. In: *Structure (London, England : 1993)* 26 (4), 627-634.e4. DOI: 10.1016/j.str.2018.02.011.
- Clarke, D.; Griffin, S.; Beales, L.; Gelais, C. S.; Burgess, S.; Harris, M.; Rowlands, D. (2006): Evidence for the Formation of a Heptameric Ion Channel Complex by the Hepatitis C Virus P7 Protein in vitro. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (48), S. 37057–37068. DOI: 10.1074/jbc.M602434200.

- Clemente-Casares, P.; López-Jiménez, A. J.; Bellón-Echeverría, I.; Encinar, J. A.; Martínez-Alfaro, E.; Pérez-Flores, R.; Mas, A. (2011): De novo Polymerase Activity and Oligomerization of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA-Polymerases from Genotypes 1 to 5. In: *PLOS One* 6 (4), e18515. DOI: 10.1371/journal.pone.0018515.
- Collart, M. A.; Weiss, B. (2020): Ribosome Pausing, a Dangerous Necessity for Co-Translational Events. In: *Nucleic Acids Research* 48 (3), S. 1043–1055. DOI: 10.1093/nar/gkz763.
- Crick, F. H. (1966): Codon-Anticodon Pairing: the Wobble Hypothesis. In: *Journal of Molecular Biology* 19 (2), S. 548–555. DOI: 10.1016/s0022-2836(66)80022-0.
- Curran, J. F. (1995): Decoding with the A:I Wobble Pair Is Inefficient. In: *Nucleic Acids Research* 23 (4), S. 683–688. DOI: 10.1093/nar/23.4.683.
- Dong, H.; Nilsson, L.; Kurland, C. G. (1996): Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. In: *Journal of Molecular Biology* 260 (5), S. 649–663. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0428.
- Edgil, D.; Harris, E. (2005): End-to-End Communication in the Modulation of Translation by Mammalian RNA Viruses. In: *Virus Research* 119 (1), S. 43–51. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.10.012.
- Egger, D.; Wölk, B.; Gosert, R.; Bianchi, L.; Blum, H. E.; Moradpour, D.; Bienz, K. (2002): Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. In: *Journal of Virology* 76 (12), S. 5974–5984. DOI: 10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002.
- El-Zayadi, A.-R.; Anis, M. (2012): Hepatitis C virus Induced Insulin Resistance Impairs Response to Anti Viral Therapy. In: *World Journal of Gastroenterology : WJG* 18 (3), S. 212–224. DOI: 10.3748/wjg.v18.i3.212.
- Failla, C.; Tomei, L.; Francesco, R. de (1994): Both NS3 and NS4A Are Required for Proteolytic Processing of Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins. In: *Journal of Virology* 68 (6), S. 3753–3760. DOI: 10.1128/JVI.68.6.3753-3760.1994.
- Fasano, M.; Ieva, F.; Ciarallo, M.; Caccianotti, B.; Santantonio, T. A. (2024): Acute Hepatitis C: Current Status and Future Perspectives. In: *Viruses* 16 (11). DOI: 10.3390/v16111739.
- Fattahi, M.; Malekpour, A.; Mortazavi, M.; Safarpour, A.; Naseri, N. (2014): The Characteristics of Rare Codon Clusters in the Genome and Proteins of Hepatitis C Virus; a Bioinformatics Look. In: *Middle East Journal of Digestive Diseases* 6 (4), S. 214–227.

- Ferrari, E.; He, Z.; Palermo, R. E.; Huang, H.-C. (2008): Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Exhibits Distinct Nucleotide Requirements for Initiation and Elongation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (49), S. 33893–33901. DOI: 10.1074/jbc.M803094200.
- Ferreira, J.; Sheflin-Findling, S. (2025): Update on Pediatric Hepatitis C Infection. In: *Current Gastroenterology Reports* 27 (1), S. 18. DOI: 10.1007/s11894-024-00955-3.
- Fricke, M.; Dünnes, N.; Zayas, M.; Bartenschlager, R.; Niepmann, M.; Marz, M. (2015): Conserved RNA Secondary Structures and Long-Range Interactions in Hepatitis C Viruses. In: *RNA (New York, N.Y.)* 21 (7), S. 1219–1232. DOI: 10.1261/rna.049338.114.
- Friebe, P.; Boudet, J.; Simorre, J.-P.; Bartenschlager, R. (2005): Kissing-Loop Interaction in the 3' End of the Hepatitis C Virus Genome Essential for RNA Replication. In: *Journal of Virology* 79 (1), S. 380–392. DOI: 10.1128/JVI.79.1.380-392.2005.
- Gerresheim, G. K. (2020): Interaktion des Hepatitis C Virus mit zellulären Faktoren. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen. Biochemisches Institut. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2020/15259/>, zuletzt geprüft am 10.04.2022.
- Gerresheim, G. K.; Dünnes, N.; Nieder-Röhrmann, A.; Shalamova, L. A.; Fricke, M.; Hofacker, I. et al. (2017): MicroRNA-122 Target Sites in the Hepatitis C Virus RNA NS5B Coding Region and 3' Untranslated Region: Function in Replication and Influence of RNA Secondary Structure. In: *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74 (4), S. 747–760. DOI: 10.1007/s00018-016-2377-9.
- Gerresheim, G. K.; Hess, C. S.; Shalamova, L. A.; Fricke, M.; Marz, M.; Andreev, D. E. et al. (2020): Ribosome Pausing at Inefficient Codons at the End of the Replicase Coding Region Is Important for Hepatitis C Virus Genome Replication. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18). DOI: 10.3390/ijms21186955.
- Gouttenoire, J.; Roingeard, P.; Penin, F.; Moradpour, D. (2010): Amphipathic Alpha-Helix AH2 Is a Major Determinant for the Oligomerization of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 4B. In: *Journal of Virology* 84 (24), S. 12529–12537. DOI: 10.1128/JVI.01798-10.
- Grakoui, A.; McCourt, D. W.; Wychowski, C.; Feinstone, S. M.; Rice, C. M. (1993): A Second Hepatitis C Virus-Encoded Proteinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (22), S. 10583–10587.

- Harrus, D.; Ahmed-El-Sayed, N.; Simister, P. C.; Miller, S.; Triconnet, M.; Hagedorn, C. H. et al. (2010): Further Insights Into the Roles of GTP and the C Terminus of the Hepatitis C Virus Polymerase in the Initiation of RNA Synthesis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (43), S. 32906–32918. DOI: 10.1074/jbc.M110.151316.
- Henke, J. I.; Goergen, D.; Zheng, J.; Song, Y.; Schüttler, C. G.; Fehr, C. et al. (2008): MicroRNA-122 Stimulates Translation of Hepatitis C Virus RNA. In: *The EMBO Journal* 27 (24), S. 3300–3310. DOI: 10.1038/emboj.2008.244.
- Ingolia, N. T.; Ghaemmaghami, S.; Newman, J. R. S.; Weissman, J. S. (2009): Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5924), S. 218–223. DOI: 10.1126/science.1168978.
- Ivanyi-Nagy, R.; Kanevsky, I.; Gabus, C.; Lavergne, J.-P.; Ficheux, D.; Penin, F. et al. (2006): Analysis of Hepatitis C Virus RNA Dimerization and Core-RNA Interactions. In: *Nucleic Acids Research* 34 (9), S. 2618–2633. DOI: 10.1093/nar/gkl240.
- JASP Team (2024): JASP (Version 0.19.0)[Computer software]. Online verfügbar unter <https://jasp-stats.org/>.
- Jones, C. T.; Murray, C. L.; Eastman, D. K.; Tassello, J.; Rice, C. M. (2007): Hepatitis C Virus P7 and NS2 Proteins Are Essential for Production of Infectious Virus. In: *Journal of Virology* 81 (16), S. 8374–8383. DOI: 10.1128/JVI.00690-07.
- Jopling, C. L.; Yi, M.; Lancaster, A. M.; Lemon, S. M.; Sarnow, P. (2005): Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5740), S. 1577–1581. DOI: 10.1126/science.1113329.
- Kato, T.; Date, T.; Miyamoto, M.; Furusaka, A.; Tokushige, K.; Mizokami, M.; Wakita, T. (2003): Efficient Replication of the Genotype 2a Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon. In: *Gastroenterology* 125 (6), S. 1808–1817. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.09.023.
- Khan, S.; Soni, S.; Veerapu, N. S. (2020): HCV Replicon Systems: Workhorses of Drug Discovery and Resistance. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, S. 325. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00325.
- Kimchi-Sarfaty, C.; Oh, J. M.; Kim, I.-W.; Sauna, Z. E.; Calcagno, A. M.; Ambudkar, S. V.; Gottesman, M. M. (2007): A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. In: *Science (New York, N.Y.)* 315 (5811), S. 525–528. DOI: 10.1126/science.11135308.

- Komar, A. A.; Lesnik, T.; Reiss, C. (1999): Synonymous Codon Substitutions Affect Ribosome Traffic and Protein Folding During In Vitro Translation. In: *FEBS Letters* 462 (3), S. 387–391. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)01566-5.
- Lee, H.; Shin, H.; Wimmer, E.; Paul, A. V. (2004): Cis-Acting RNA Signals In the NS5B C-Terminal Coding Sequence of the Hepatitis C Virus Genome. In: *Journal of Virology* 78 (20), S. 10865–10877. DOI: 10.1128/JVI.78.20.10865-10877.2004.
- Lee, S.; Lee, D. K. (2018): What Is the Proper Way to Apply the Multiple Comparison Test? In: *Korean Journal of Anesthesiology* 71 (5), S. 353–360. DOI: 10.4097/kja.d.18.00242.
- Lindenbach, B. D. (2013): Virion Assembly and Release. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 369, S. 199–218. DOI: 10.1007/978-3-642-27340-7_8.
- Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. (2013): The Ins and Outs of Hepatitis C Virus Entry and Assembly. In: *Nature Reviews. Microbiology* 11 (10), S. 688–700. DOI: 10.1038/nrmicro3098.
- Liu, C.-H.; Kao, J.-H. (2023): Acute Hepatitis C Virus Infection: Clinical Update and Remaining Challenges. In: *Clinical and Molecular Hepatology* 29 (3), S. 623–642. DOI: 10.3350/cmh.2022.0349.
- Liu, Y.; Jiang, W. W.; Pratt, J.; Rockway, T.; Harris, K.; Vasavanonda, S. et al. (2006): Mechanistic study of HCV polymerase inhibitors at individual steps of the polymerization reaction. In: *Biochemistry* 45 (38), S. 11312–11323. DOI: 10.1021/bi060511j.
- Liu, Y.; Wimmer, E.; Paul, A. V. (2009): Cis-Acting RNA Elements in Human and Animal Plus-Strand RNA Viruses. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1789 (9-10), S. 495–517. DOI: 10.1016/j.bbagr.2009.09.007.
- Liutkute, M.; Samatova, E.; Rodnina, M. V. (2020): Cotranslational Folding of Proteins on the Ribosome. In: *Biomolecules* 10 (1). DOI: 10.3390/biom10010097.
- Lohcharoenkal, W.; Liu, Y.; Wang, L.; Yang, Y.; Rojanasakul, Y. (2014): Luciferase Reporter Cells as a Platform to Detect SMAD-Dependent Collagen Production. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118 (6), S. 732–735. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.021.
- Lohmann, V. (2013): Hepatitis C Virus RNA Replication. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 369, S. 167–198. DOI: 10.1007/978-3-642-27340-7_7.

- Lohmann, V.; Körner, F.; Dobierzewska, A.; Bartenschlager, R. (2001): Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. In: *Journal of Virology* 75 (3), S. 1437–1449. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1437-1449.2001.
- Lohmann, V.; Körner, F.; Herian, U.; Bartenschlager, R. (1997): Biochemical Properties of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase and Identification of Amino Acid Sequence Motifs Essential for Enzymatic Activity. In: *Journal of Virology* 71 (11), S. 8416–8428. DOI: 10.1128/JVI.71.11.8416-8428.1997.
- Lohmann, V.; Körner, F.; Koch, J.; Herian, U.; Theilmann, L.; Bartenschlager, R. (1999): Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5424), S. 110–113. DOI: 10.1126/science.285.5424.110.
- Luik, P.; Chew, C.; Aittoniemi, J.; Chang, J.; Wentworth, P.; Dwek, R. A. et al. (2009): The 3-Dimensional Structure of a Hepatitis C Virus P7 Ion Channel by Electron Microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31), S. 12712–12716. DOI: 10.1073/pnas.0905966106.
- Malinen, A. M.; Bakermans, J.; Aalto-Setälä, E.; Blessing, M.; Bauer, D. L. V.; Parilova, O. et al. (2022): Real-Time Single-Molecule Studies of RNA Polymerase-Promoter Open Complex Formation Reveal Substantial Heterogeneity Along the Promoter-Opening Pathway. In: *Journal of Molecular Biology* 434 (2), S. 167383. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167383.
- Martinello, M.; Naggie, S.; Rockstroh, J. K.; Matthews, G. V. (2023): Direct-Acting Antiviral Therapy for Treatment of Acute and Recent Hepatitis C Virus Infection: A Narrative Review. In: *Clinical Infectious Diseases* 77 (Suppl 3), S238-S244. DOI: 10.1093/cid/ciad344.
- Martínez, M. A.; Martus, G.; Capel, E.; Parera, M.; Franco, S.; Nevot, M. (2012): Quasispecies Dynamics of RNA Viruses. In: Günther Witzany (Hg.): *Viruses: Essential Agents of Life*. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 21–42.
- Masaki, T.; Suzuki, R.; Murakami, K.; Aizaki, H.; Ishii, K.; Murayama, A. et al. (2008): Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. In: *Journal of Virology* 82 (16), S. 7964–7976. DOI: 10.1128/JVI.00826-08.
- Masante, C.; Jaubert, C.; Palau, W.; Plissonneau, J.; Besnard, L.; Ventura, M.; Di Primo, C. (2015): Mutations of the SL2 Dimerization Sequence of the Hepatitis C Genome

- Abrogate Viral Replication. In: *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72 (17), S. 3375–3385. DOI: 10.1007/s00018-015-1893-3.
- Messina, J. P.; Humphreys, I.; Flaxman, A.; Brown, A.; Cooke, G. S.; Pybus, O. G.; Barnes, E. (2014): Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61 (1), S. 77–87. DOI: 10.1002/hep.27259.
- Meydan, S.; Klepacki, D.; Karthikeyan, S.; Margus, T.; Thomas, P.; Jones, J. E. et al. (2017): Programmed Ribosomal Frameshifting Generates a Copper Transporter and a Copper Chaperone from the Same Gene. In: *Molecular Cell* 65 (2), S. 207–219. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.12.008.
- Moradpour, D.; Evans, M. J.; Gosert, R.; Yuan, Z.; Blum, H. E.; Goff, S. P. et al. (2004): Insertion of Green Fluorescent Protein into Nonstructural Protein 5A Allows Direct Visualization of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. In: *Journal of Virology* 78 (14), S. 7400–7409. DOI: 10.1128/JVI.78.14.7400-7409.2004.
- Moradpour, D.; Penin, F. (2013): Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 369, S. 113–142. DOI: 10.1007/978-3-642-27340-7_5.
- Mosley, R. T.; Edwards, T. E.; Murakami, E.; Lam, A. M.; Grice, R. L.; Du, J. et al. (2012): Structure of Hepatitis C Virus Polymerase in Complex with Primer-Template RNA. In: *Journal of Virology* 86 (12), S. 6503–6511. DOI: 10.1128/JVI.00386-12.
- Nakamura, Y.; Gojobori, T.; Ikemura, T. (2000): Codon Usage Tabulated from International DNA Sequence Databases: Status for the Year 2000. In: *Nucleic Acids Research* 28 (1), S. 292. Online verfügbar unter <http://www.kazusa.or.jp/codon/>, zuletzt geprüft am 16.02.2025.
- Niepmann, M. (2013): Hepatitis C Virus RNA Translation. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 369, S. 143–166. DOI: 10.1007/978-3-642-27340-7_6.
- Niepmann, M.; Gerresheim, G. K. (2020): Hepatitis C Virus Translation Regulation. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (7). DOI: 10.3390/ijms21072328.
- Niepmann, M.; Shalamova, L. A.; Gerresheim, G. K.; Rossbach, O. (2018): Signals Involved in Regulation of Hepatitis C Virus RNA Genome Translation and Replication. In: *Frontiers in Microbiology* 9, S. 395. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00395.
- Paul, D.; Madan, V.; Bartenschlager, R. (2014): Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. In: *Cell Host & Microbe* 16 (5), S. 569–579. DOI: 10.1016/j.chom.2014.10.008.

- Paul, D.; Romero-Brey, I.; Gouttenoire, J.; Stoitsova, S.; Krijnse-Locker, J.; Moradpour, D.; Bartenschlager, R. (2011): NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes ∇ †. In: *Journal of Virology* 85 (14), S. 6963–6976. DOI: 10.1128/JVI.00502-11.
- Paulous, S.; Malnou, C. E.; Michel, Y. M.; Kean, K. M.; Borman, A. M. (2003): Comparison of the Capacity of Different Viral Internal Ribosome Entry Segments to Direct Translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. In: *Nucleic Acids Research* 31 (2), S. 722–733.
- Pechmann, S.; Chartron, J. W.; Frydman, J. (2014): Local Slowdown of Translation by Nonoptimal Codons Promotes Nascent-Chain Recognition by SRP In Vivo. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (12), S. 1100–1105. DOI: 10.1038/nsmb.2919.
- Pietschmann, T.; Kaul, A.; Koutsoudakis, G.; Shavinskaya, A.; Kallis, S.; Steinmann, E. et al. (2006): Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (19), S. 7408–7413. DOI: 10.1073/pnas.0504877103.
- Pietschmann, T.; Lohmann, V.; Rutter, G.; Kurpanek, K.; Bartenschlager, R. (2001): Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs. In: *Journal of Virology* 75 (3), S. 1252–1264. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1252-1264.2001.
- Quax, T. E. F.; Claassens, N. J.; Söll, D.; van der Oost, J. (2015): Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. In: *Molecular Cell* 59 (2), S. 149–161. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.035.
- Quinkert, D.; Bartenschlager, R.; Lohmann, V. (2005): Quantitative Analysis of the Hepatitis C Virus Replication Complex. In: *Journal of Virology* 79 (21), S. 13594–13605. DOI: 10.1128/JVI.79.21.13594-13605.2005.
- Raney, K. D.; Sharma, S. D.; Moustafa, I. M.; Cameron, C. E. (2010): Hepatitis C Virus Non-structural Protein 3 (HCV NS3): A Multifunctional Antiviral Target. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (30), S. 22725–22731. DOI: 10.1074/jbc.R110.125294.
- Reiss, S.; Rebhan, I.; Backes, P.; Romero-Brey, I.; Erfle, H.; Matula, P. et al. (2011): Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. In: *Cell Host & Microbe* 9 (1), S. 32–45. DOI: 10.1016/j.chom.2010.12.002.

- RKI (2018): Hepatitis C RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Aktuelles/Publikationen/RKI-Ratgeber/Ratgeber/Ratgeber_HepatitisC.html?nn=16911148#doc16784696bodyText5, zuletzt aktualisiert am 05.02.2018, zuletzt geprüft am 15.07.2018.
- Romero-Brey, I.; Lohmann, V. (2016): The HCV Replicase Complex and Viral RNA Synthesis. In: *Hepatitis C Virus I*, S. 149–196. DOI: 10.1007/978-4-431-56098-2_8.
- Romero-López, C.; Berzal-Herranz, A. (2017): The 5BSL3.2 Functional RNA Domain Connects Distant Regions in the Hepatitis C Virus Genome. In: *Frontiers in Microbiology* 8, S. 2093. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02093.
- Romero-López, C.; Berzal-Herranz, A. (2020): The Role of the RNA-RNA Interactome in the Hepatitis C Virus Life Cycle. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041479.
- Romero-López, C.; Ríos-Marco, P.; Berzal-Herranz, B.; Berzal-Herranz, A. (2018): The HCV Genome Domains 5BSL3.1 and 5BSL3.3 Act as Managers of Translation. In: *Scientific Reports* 8. DOI: 10.1038/s41598-018-34422-7.
- Sabi, R.; Tuller, T. (2014): Modelling the Efficiency of Codon-tRNA Interactions Based on Codon Usage Bias. In: *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 21 (5), S. 511–526. DOI: 10.1093/dnares/dsu017.
- Sabi, R.; Tuller, T. (2017): Computational Analysis of Nascent Peptides that Induce Ribosome Stalling and their Proteomic Distribution in *Saccharomyces Cerevisiae*. In: *RNA (New York, N.Y.)* 23 (7), S. 983–994. DOI: 10.1261/rna.059188.116.
- Sarrazin, C.; Zimmermann, T.; Berg, T.; Hinrichsen, H.; Mauss, S.; Wedemeyer, H.; Zeuzem, S. (2020): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis C Virus (HCV)-Infektion. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 58 (11), S. 1110–1131. DOI: 10.1055/a-1226-0241.
- Sasaki, M.; Anindita, P. D.; Phongphaew, W.; Carr, M.; Kobayashi, S.; Orba, Y.; Sawa, H. (2018): Development of a Rapid and Quantitative Method for the Analysis of Viral Entry and Release Using a NanoLuc Luciferase Complementation Assay. In: *Virus Research* 243, S. 69–74. DOI: 10.1016/j.virusres.2017.10.015.
- Schmidt-Mende, J.; Bieck, E.; Hugle, T.; Penin, F.; Rice, C. M.; Blum, H. E.; Moradpour, D. (2001): Determinants for Membrane Association of the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (47), S. 44052–44063. DOI: 10.1074/jbc.M103358200.

- Schuller, A. P.; Green, R. (2018): Roadblocks and Resolutions in Eukaryotic Translation. In: *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (8), S. 526–541. DOI: 10.1038/s41580-018-0011-4.
- Sen, S.; Voorheis, H. P. (2014): Protein folding: understanding the role of water and the low Reynolds number environment as the peptide chain emerges from the ribosome and folds. In: *Journal of theoretical biology* 363, S. 169–187. DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.07.025.
- Shalamova, L. (2019): Dissecting the Requirements for Hepatitis C Virus RNA Synthesis Using a Minus Strand Replication System. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen. Biochemisches Institut. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2019/13950/>, zuletzt geprüft am 09.04.2022.
- Shanmugam, S.; Nichols, A. K.; Saravanabalaji, D.; Welsch, C.; Yi, M. (2018): HCV NS5A Dimer Interface Residues Regulate HCV Replication by Controlling Its Self-interaction, Hyperphosphorylation, Subcellular Localization and Interaction with Cyclophilin A. In: *PLOS Pathogens* 14 (7), e1007177. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007177.
- Shi, S. T.; Lai, M. M. C. (2006): Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. HCV 5' and 3'UTR: When Translation Meets Replication. Hg. v. Seng-Lai Tan. Norfolk (UK).
- Shimakami, T.; Yamane, D.; Jangra, R. K.; Kempf, B. J.; Spaniel, C.; Barton, D. J.; Lemon, S. M. (2012): Stabilization of Hepatitis C Virus RNA by an Ago2-miR-122 Complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (3), S. 941–946. DOI: 10.1073/pnas.1112263109.
- Smith, D. B.; Bukh, J.; Kuiken, C.; Muerhoff, A. S.; Rice, C. M.; Stapleton, J. T.; Simmonds, P. (2013): Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (1), S. 318–327. DOI: 10.1002/hep.26744.
- Smith, D. B.; Bukh, J.; Kuiken, C.; Muerhoff, A. S.; Rice, C. M.; Stapleton, J. T.; Simmonds, P. (2019): HCV Classification. A Web Resource to Manage the Classification and Genotype and Subtype Assignments of Hepatitis C Virus. Hg. v. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Online verfügbar unter https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification, zuletzt aktualisiert am 05.2019, zuletzt geprüft am 05.03.2021.

- Steinmann, E.; Penin, F.; Kallis, S.; Patel, A. H.; Bartenschlager, R.; Pietschmann, T. (2007): Hepatitis C Virus P7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. In: *PLoS Pathogens* 3 (7), e103. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030103.
- Tsukiyama-Kohara, K.; Iizuka, N.; Kohara, M.; Nomoto, A. (1992): Internal Ribosome Entry Site Within Hepatitis C Virus RNA. In: *Journal of Virology* 66 (3), S. 1476–1483. DOI: 10.1128/JVI.66.3.1476-1483.1992.
- Vieyres, G.; Pietschmann, T. (2019): HCV Pit Stop at the Lipid Droplet: Refuel Lipids and Put on a Lipoprotein Coat before Exit. In: *Cells* 8 (3). DOI: 10.3390/cells8030233.
- Wang, C.; Sarnow, P.; Siddiqui, A. (1993): Translation of Human Hepatitis C Virus RNA in Cultured Cells Is Mediated by an Internal Ribosome-Binding Mechanism. In: *Journal of Virology* 67 (6), S. 3338–3344.
- Wang, H.; McManus, J.; Kingsford, C. (2017): Accurate Recovery of Ribosome Positions Reveals Slow Translation of Wobble-Pairing Codons in Yeast. In: *Journal of Computational Biology* 24 (6), S. 486–500. DOI: 10.1089/cmb.2016.0147.
- Wang, Q. M.; Hockman, M. A.; Staschke, K.; Johnson, R. B.; Case, K. A.; Lu, J. et al. (2002): Oligomerization and Cooperative RNA Synthesis Activity of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. In: *Journal of Virology* 76 (8), S. 3865–3872. DOI: 10.1128/JVI.76.8.3865-3872.2002.
- Wang, T.; Larcher, L. M.; Ma, L.; Veedu, R. N. (2018): Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (10). DOI: 10.3390/molecules23102564.
- Webster, D. P.; Klennerman, P.; Dusheiko, G. M. (2015): Hepatitis C. In: *Lancet (London, England)* 385 (9973), S. 1124–1135. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)62401-6.
- World Health Organization (2016): Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021. Towards Ending Viral Hepatitis. Hg. v. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://iris.who.int/handle/10665/246177>.
- World Health Organization (2022): Global Health Sector Strategies on, respectively, HIV, Viral Hepatitis and Sexually Transmitted Infections for the Period 2022–2030. Hg. v. World Health Organization. Online verfügbar unter <https://iris.who.int/handle/10665/360348>.
- World Health Organization (2024a): Global Hepatitis Report 2024: Action for Access in Low- and Middle-income Countries. World Health Organization. Online verfügbar

- unter <https://iris.who.int/handle/10665/376461>, zuletzt aktualisiert am 09.04.2024, zuletzt geprüft am 15.07.2025.
- World Health Organization (2024b): Hepatitis C Fact Sheet. Hg. v. World Health Organization, zuletzt aktualisiert am 09.04.2024, zuletzt geprüft am 15.07.2025.
- Wrensch, F.; Crouchet, E.; Ligat, G.; Zeisel, M. B.; Keck, Z.-Y.; Fong, S. K. H. et al. (2018): Hepatitis C Virus (HCV)-Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. In: *Frontiers in Immunology* 9, S. 1436. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01436.
- Wruck, F.; Katranidis, A.; Nierhaus, K. H.; Büldt, G.; Hegner, M. (2017): Translation and folding of single proteins in real time. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (22), E4399-407. DOI: 10.1073/pnas.1617873114.
- Yao, N.; Reichert, P.; Taremi, S. S.; Prosise, W. W.; Weber, P. C. (1999): Molecular Views of Viral Polyprotein Processing Revealed by the Crystal Structure of the Hepatitis C Virus Bifunctional Protease-Helicase. In: *Structure (London, England : 1993)* 7 (11), S. 1353–1363. DOI: 10.1016/s0969-2126(00)80025-8.
- You, S.; Rice, C. M. (2008): 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). In: *Journal of Virology* 82 (1), S. 184–195. DOI: 10.1128/JVI.01796-07.
- You, S.; Stump, D. D.; Branch, A. D.; Rice, C. M. (2004): A Cis-Acting Replication Element in the Sequence Encoding the NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase Is Required for Hepatitis C Virus RNA Replication. In: *Journal of Virology* 78 (3), S. 1352–1366. DOI: 10.1128/jvi.78.3.1352-1366.2004.
- Younossi, Z.; Park, H.; Henry, L.; Adeyemi, A.; Stepanova, M. (2016): Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C: A Meta-analysis of Prevalence, Quality of Life, and Economic Burden. In: *Gastroenterology* 150 (7), S. 1599–1608. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.039.
- Yu, C.-H.; Dang, Y.; Zhou, Z.; Wu, C.; Zhao, F.; Sachs, M. S.; Liu, Y. (2015): Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-Translational Protein Folding. In: *Molecular Cell* 59 (5), S. 744–754. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.07.018.
- Zayas, M.; Long, G.; Madan, V.; Bartenschlager, R. (2016): Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A. In: *PLoS Pathogens* 12 (1). DOI: 10.1371/journal.ppat.1005376.

Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) (Hg.) (2003): Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung von Replikonstrukten des HCV in Eukaryonten Zellen. ZKBS. Online verfügbar unter <https://zkbs-online.de/stellungnahmen/viren#c2879>, zuletzt geprüft am 08.12.2024.

Zhang, G.; Ignatova, Z. (2011): Folding at the Birth of the Nascent Chain: Coordinating Translation with Co-Translational Folding. In: *Current Opinion in Structural Biology* 21 (1), S. 25–31. DOI: 10.1016/j.sbi.2010.10.008.

11 Anhang

11.1 Plasmide

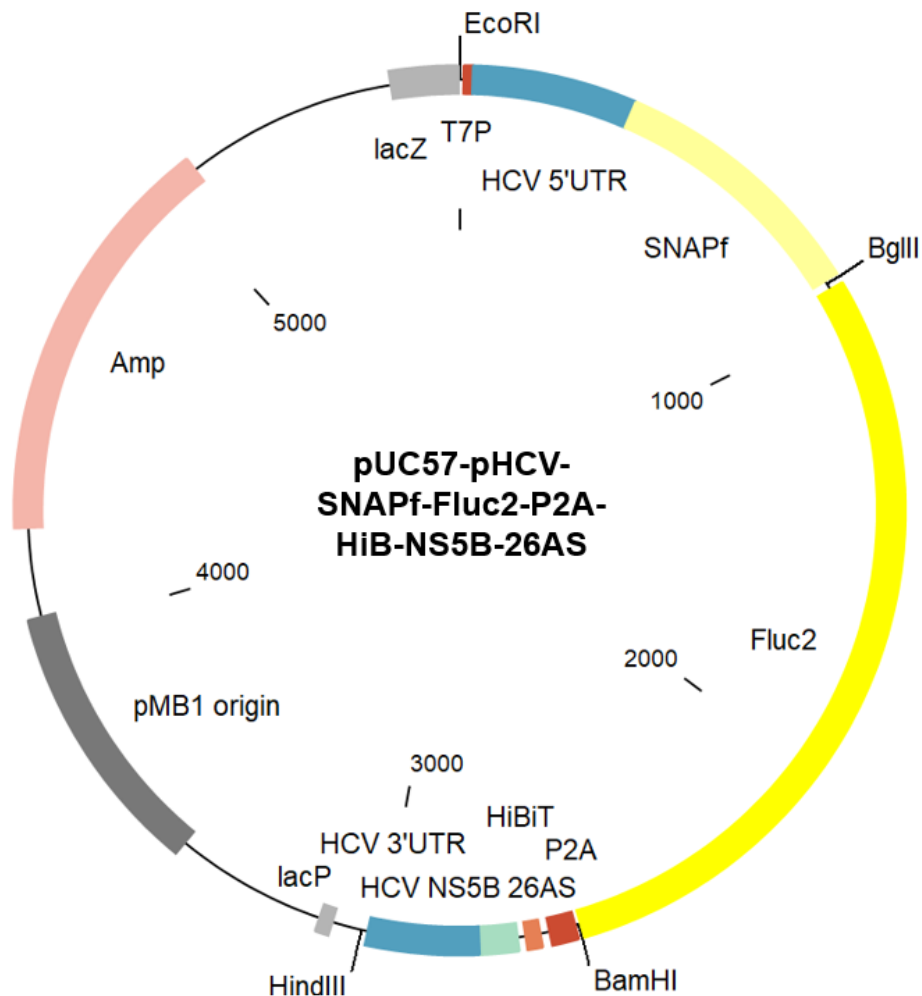


Tabelle 11-1: Elemente des pUC57-pHCV-SNAPf-Fluc2-P2A-HiBiT-NS5B-26AS.

Name	Start – Ende	Beschreibung
T7P	7 – 25	Promotor der T7-RNA-Polymerase
HCV 5'UTR	26 – 365	Sequenz der nicht-translatierten Region am 5' Ende des HCV-Plusstrangs
SNAPf	366 – 911	Sequenz der SNAP-Protein-Markierung
Fluc2	927 – 2576	Sequenz der Firefly Luciferase 2
P2A	2586 – 2642	Sequenz des P2A-Peptids (aus Porzinem Teschovirus 1 zur cotranslationalen Teilung von zwei Proteinen innerhalb eines ORFs)
HiBiT	2661 – 2693	Sequenz des HiBiT-Proteins
HCV NS5B 26AS	2709 – 2789	Terminale 26 AS der NS5B-Region des HCV, inklusive der seltenen Codons
HCV 3'UTR	2790 – 3025	Sequenz der nicht-translatierten Region am 3' Ende des HCV-Plusstrangs
AmpR	4212 – 5072	Ampicillin-Resistenz zur Plasmid-Selektion

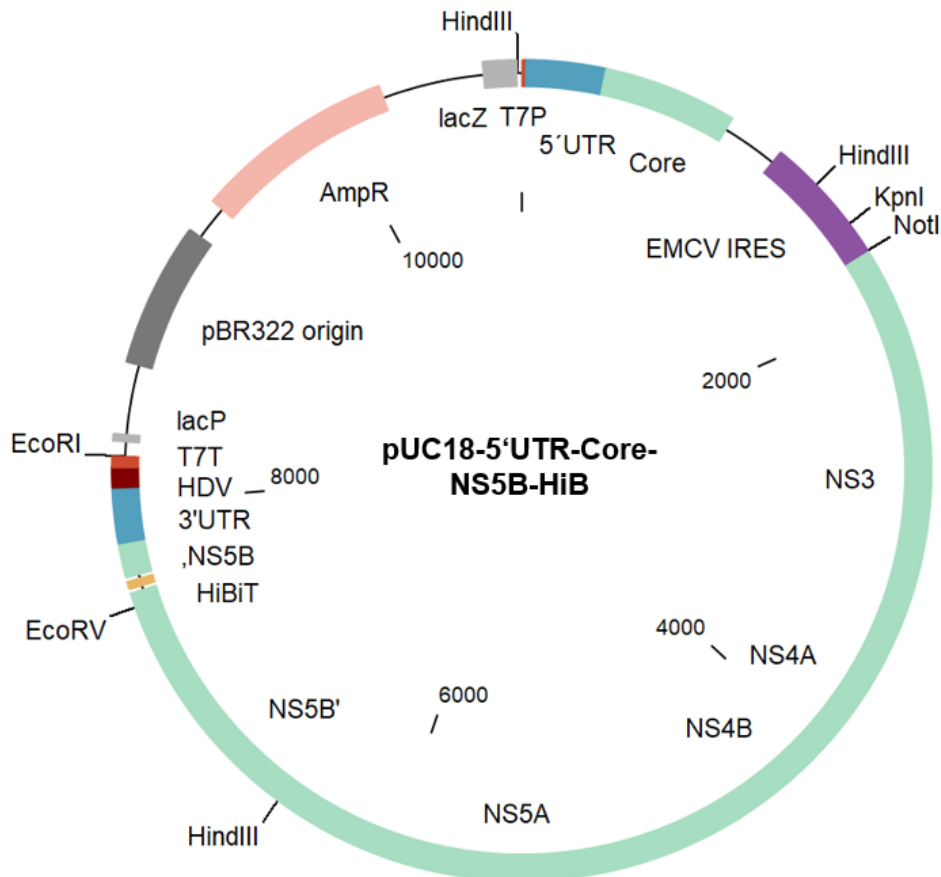


Tabelle 11-2: Elemente des pUC18-5'UTR-Core-NS5B-HiB.

Name	Start - Ende	Beschreibung
T7P	3 – 19	Promotor der T7-RNA-Polymerase
5'UTR	20 – 359	Sequenz der nicht-translatierten Region am 5' Ende des HCV-Plusstrangs
Core	360 – 932	Codierende Sequenz des Core-Protein
EMCV IRES	1182 – 1737	Sequenz der IRES des Enzephalomyocarditis-Virus
NS3	1744 – 3636	Codierende Sequenz des NS3-Proteins
NS4A	3637 – 3798	Codierende Sequenz des NS4A-Proteins
NS4B	3799 – 4581	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5A	4582 – 5979	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5B'	5980 – 7608	Codierende Sequenz des NS5B-Proteins
HiBiT	7627 – 7659	Insertion der Sequenz des HiBiT-Proteins in NS5B codierende Region
,NS5B	7678 – 7824	Fortsetzung der codierenden Sequenz des NS5B-Proteins
3'UTR	7825 – 8060	Sequenz der nicht-translatierten Region am 3' Ende des HCV-Plusstrangs
HDV	8061 – 8148	Sequenz des Hepatitis D Virus (HDV)-Ribozyms
T7T	8149 – 8194	Terminator der T7-RNA-Polymerase
pBR322 origin	8597 – 9216	Replikationsursprung des pBR322-Plasmids
AmpR	9371 – 10231	Ampicillin-Resistenz zur Plasmid-Selektion

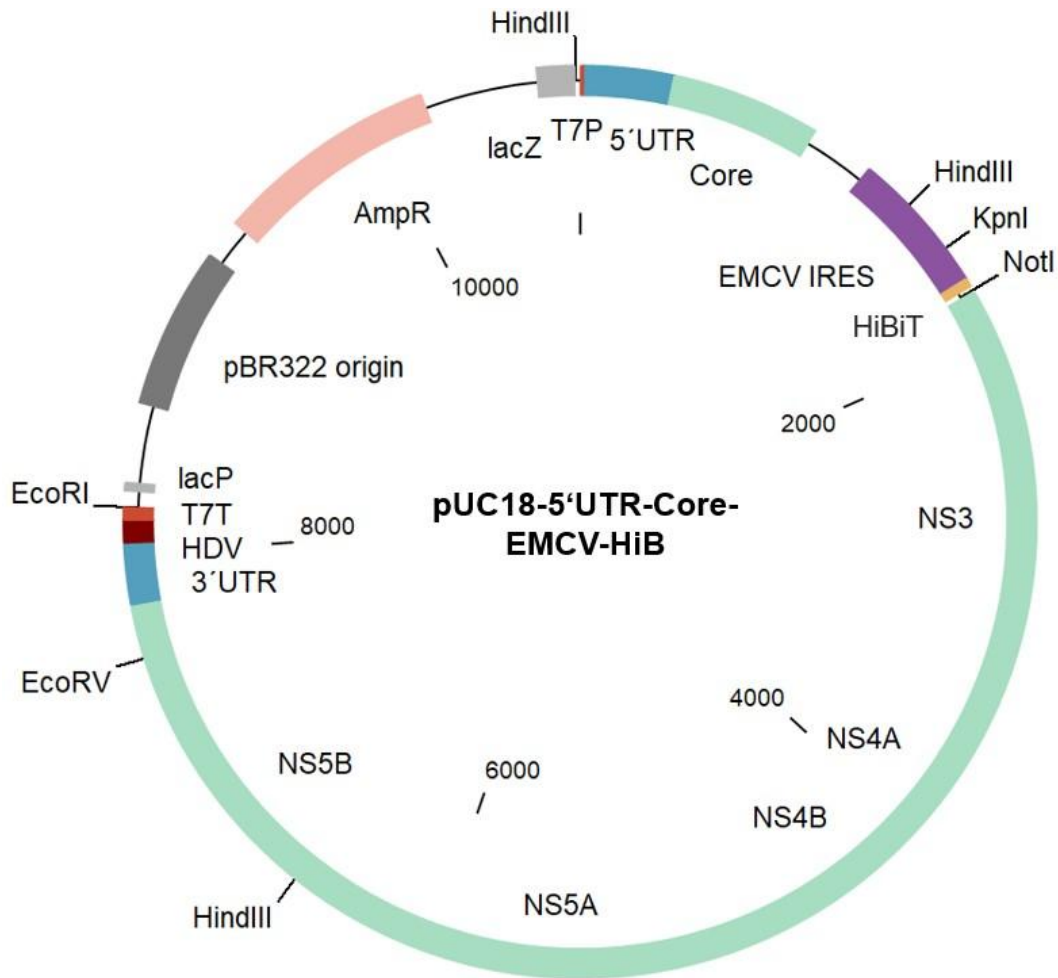


Tabelle 11-3: Elemente des pUC18-5'UTR-Core-EMCV-HiB.

Name	Start - Ende	Beschreibung
T7P	3 – 19	Promotor der T7-RNA-Polymerase
5'UTR	20 – 359	Sequenz der nicht-translatierten Region am 5' Ende des HCV-Plusstrangs
Core	360 – 932	Codierende Sequenz des Core-Protein
EMCV IRES	1182 – 1737	Sequenz der IRES des Enzephalomyocarditis-Virus
HiBiT	1738 - 1771	Insertion der Sequenz des HiBiT-Proteins
NS3	1795 – 3687	Codierende Sequenz des NS3-Proteins
NS4A	3688 – 3849	Codierende Sequenz des NS4A-Proteins
NS4B	3850 – 4632	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5A	4633 – 6030	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5B	6031 – 7806	Codierende Sequenz des NS5B-Proteins
3'UTR	7807 – 8042	Sequenz der nicht-translatierten Region am 3' Ende des HCV-Plusstrangs
HDV	8043 – 8129	Sequenz des Hepatitis D Virus (HDV)-Ribozyms
T7T	8130 – 8176	Terminator der T7-RNA-Polymerase
pBR322 origin	8579 – 9198	Replikationsursprung des pBR322-Plasmids
AmpR	9353 – 10213	Ampicillin-Resistenz zur Plasmid-Selektion

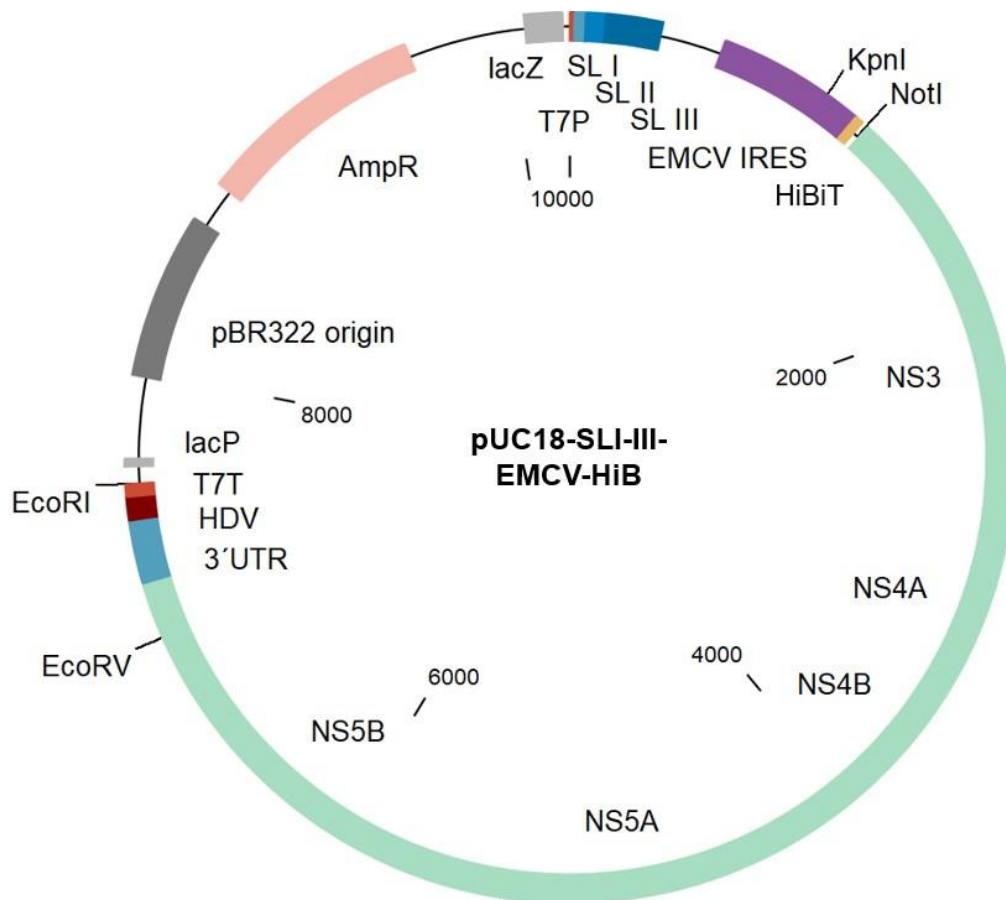


Tabelle 11-4: Elemente des pUC18-SLI-III-EMCV-HiB.

Name	Start - Ende	Beschreibung
T7P	1 – 18	Promotor der T7-RNA-Polymerase
SL I	19 – 59	Sequenz von SL I der 5'UTR des HCV-Plusstrangs
SL II	60 – 134	Sequenz von SL II der 5'UTR des HCV-Plusstrangs
SL III	135 – 346	Sequenz von SL III der 5'UTR des HCV-Plusstrangs
EMCV IRES	538 – 1138	Sequenz der IRES des Enzephalomyocarditis-Virus
HiBiT	1139 – 1171	Insertion der Sequenz des HiBiT-Proteins
NS3	1196 – 3088	Codierende Sequenz des NS3-Proteins
NS4A	3089 – 3250	Codierende Sequenz des NS4A-Proteins
NS4B	3251 – 4033	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5A	4034 – 5431	Codierende Sequenz des NS4B-Proteins
NS5B	5432 – 7207	Codierende Sequenz des NS5B-Proteins
3'UTR	7208 – 7443	Sequenz der nicht-translatierten Region am 3' Ende des HCV-Plusstrangs
HDV	7444 – 7530	Sequenz des Hepatitis D Virus (HDV)-Ribozyms
T7T	7531 – 7577	Terminator der T7-RNA-Polymerase
pBR322 origin	7980 – 8599	Replikationsursprung des pBR322-Plasmids
AmpR	8754 – 9614	Ampicillin-Resistenz zur Plasmid-Selektion

11.2 Buchstabencode Aminosäuren

Tabelle 11-5: 1- bzw. 3-Buchstabencode der in der Arbeit erwähnten Aminosäuren.

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

11.3 Deskriptive Statistik und Annahmeprüfungen

Vor Durchführung einer ANOVA wurde mit einem Q-Q-Diagramm grafisch auf Normalverteilung der Residuen und mit dem Levene-Test auf Varianzhomogenität geprüft, wobei ein signifikantes Testergebnis auf eine Verletzung des Kriteriums hinweist. Die Ergebnisse der Annahmeprüfungen sowie die deskriptive Statistik der für die ANOVA aufbereiteten, logarithmierten Daten (2.2.5) sind für jedes Konstrukt im Folgenden dargestellt.

11.3.1 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Konstrukt

In Tabelle 11-6 sind die Lage- und Streuparameter der aufbereiteten und logarithmierten Messwerte für die einzelnen Subgruppen – basierend auf den untersuchten Einflussfaktoren Polymerase (Pol), Zeitpunkt und NS5B-Mutation – dargestellt.

Tabelle 11-6: Deskriptive Statistik der ANOVA mit 5'UTR-Core-NS5B-HiB. SD entspricht der Standardabweichung, n der Anzahl unabhängiger Versuche.

Pol	Zeitpunkt	NS5B-Mutation	Mittelwert	SD	n
-	04	AA	-0.116	0.183	4
		com	0.104	0.235	6
		rare	0.142	0.124	6
	08	AA	-0.364	0.304	4
		com	-0.022	0.334	6
		rare	0.136	0.282	6
	24	AA	-1.348	0.451	4
		com	-0.925	0.300	6
		rare	-0.968	0.534	6
+	48	AA	-2.000	0.000	4
		com	-1.884	0.285	6
		rare	-1.783	0.402	6
	04	AA	-0.078	0.137	4
		com	0.071	0.159	6
		rare	0.004	0.000	6
	08	AA	-0.371	0.310	4
		com	0.050	0.342	6
		rare	0.022	0.301	6
	24	AA	-1.488	0.360	4
		com	-0.870	0.589	6
		rare	-0.852	0.483	6
	48	AA	-2.000	0.000	4
		com	-1.741	0.417	6
		rare	-1.754	0.382	6

Das Q-Q-Diagramm zeigte, abgesehen von wenigen Ausreißern am unteren Ende, eine Normalverteilung der Residuen (Abbildung 11-1).

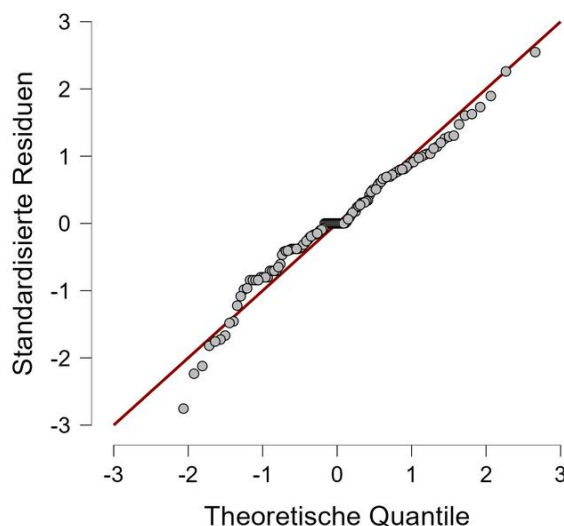


Abbildung 11-1: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für 5'UTR-Core-NS5B-HiB-Datensatz. Der Großteil der Messwerte (Punkte) liegt auf einer Geraden (rote Linie) und entspricht damit einer Normalverteilung. Am unteren Ende weichen wenige Punkte als Ausreißer davon ab.

Der Levene-Test war signifikant ($p = 0,017$), wobei die Varianzinhomogenität durch die biologische Variabilität, den Zeitverlauf und die fehlende Streuung des Aminosäurekonstrukts bei 48 h zu erklären ist (2.2.5.2). Betrachtet man die Zeitpunkte isoliert, sind die Standardabweichungen der Konstrukte mit Ausnahme der Aminosäuremutante bei 48 h weitestgehend vergleichbar.

11.3.2 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukt

Tabelle 11-7 zeigt die Lage- und Streuparameter der aufbereiteten und logarithmierten Daten für die beiden Varianten (Pol +/-) des 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Konstrukts zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

Tabelle 11-7: Deskriptive Statistik der ANOVA mit 5'UTR-Core-EMCV-HiB. Dargestellt sind die Lage- und Streuparameter der Subgruppen, aufgetrennt nach den analysierten Faktoren Polymerase (Pol) und Zeitpunkt. SD entspricht der Standardabweichung, n der Anzahl unabhängiger Versuche.

Pol	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	n
-	04	0.067	0.165	4
	08	0.216	0.196	4
	24	0.039	0.151	4
	48	-0,319	0.153	4
	72	-0,352	0,184	2
+	04	0,000	0.000	4
	08	0.162	0.057	4
	24	-0,072	0.040	4
	48	-0,326	0.132	4
	72	-0,405	0.055	2

Das Q-Q-Diagramm zeigte näherungsweise eine Normalverteilung der Residuen mit wenigen Ausreißern an beiden Enden (Abbildung 11-2).

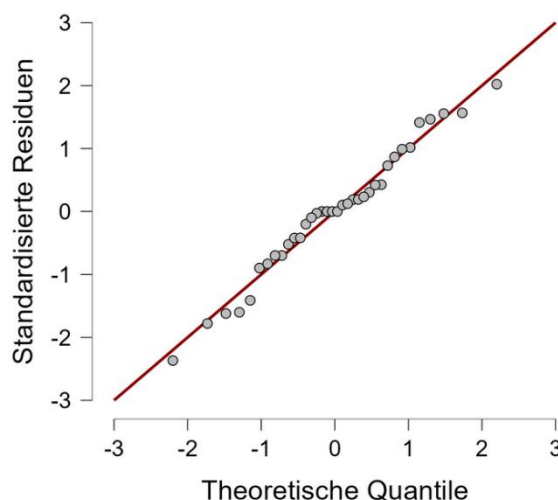


Abbildung 11-2: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für 5'UTR-Core-EMCV-HiB-Datensatz. Der Großteil der Messwerte (Punkte) liegt auf einer Geraden (rote Linie) und entspricht damit einer Normalverteilung.

Der Levene-Test war signifikant ($p = 0,039$), was auf eine Varianzheterogenität hindeutet. Betrachtet man die deskriptive Analyse, war in der Gruppe der Konstrukte mit inaktiver Polymerase insgesamt eine höhere Standardabweichung als in der Gruppe der Konstrukte mit aktiver Polymerase zu beobachten (Tabelle 11-7).

11.3.3 SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt

In Tabelle 11-8 sind die Lage und Streuparameter der aufbereiteten und logarithmierten Daten für die getesteten Subgruppen – unterteilt nach den Faktoren Polymerase (Pol), Zeitpunkt und NS5B-Mutation – für das SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt gezeigt.

Tabelle 11-8: Deskriptive Statistik der ANOVA mit SLI-III-EMCV-HiB. Dargestellt sind die Lage- und Streuparameter der Subgruppen, aufgetrennt nach den analysierten Faktoren Polymerase (Pol), Zeitpunkt und NS5B-Mutation. SD entspricht der Standardabweichung, n der Anzahl unabhängiger Versuche.

Pol	Zeitpunkt	NS5B-Mutation	Mittelwert	SD	n
-	04	AA	-0,024	0,149	10
		com	-0,043	0,114	10
		rare	-0,054	0,070	10
	24	AA	-0,210	0,111	10
		com	-0,296	0,048	10
		rare	-0,328	0,109	10
	48	AA	-0,524	0,158	10
		com	-0,592	0,113	10
		rare	-0,624	0,140	10
	72	AA	-0,882	0,274	10
		com	-1,054	0,318	10
		rare	-0,868	0,158	10
+	96	AA	-1,156	0,420	10
		com	-1,251	0,454	10
		rare	-1,309	0,318	10
	04	AA	0,070	0,086	10
		com	0,027	0,081	10

		rare	0,004	0,000	10
24		AA	-0,216	0,112	10
		com	-0,255	0,088	10
		rare	-0,280	0,095	10
48		AA	-0,431	0,078	10
		com	-0,419	0,100	10
		rare	-0,342	0,137	10
72		AA	-0,188	0,246	10
		com	0,008	0,138	10
		rare	0,270	0,297	10
96		AA	0,102	0,267	10
		com	0,377	0,148	10
		rare	0,734	0,165	10

Das Q-Q-Diagramm zeigte eine weitestgehende Normalverteilung der Residuen mit wenigen Ausreißern an beiden Enden (Abbildung 11-3).

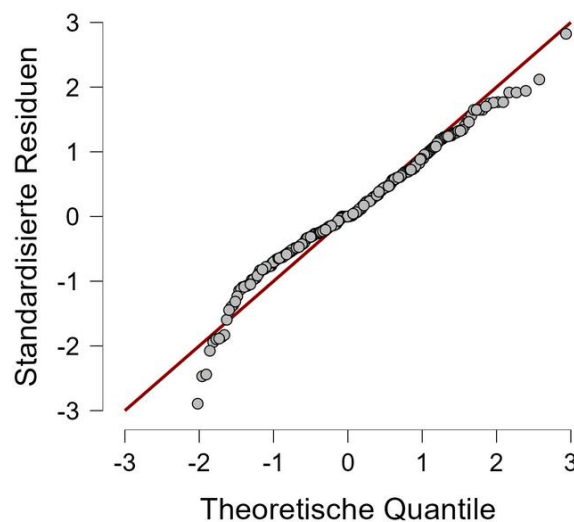


Abbildung 11-3: Q-Q-Diagramm zur Prüfung auf Normalverteilung für SLI-III-EMCV-HiB-Datensatz. Der Großteil der Messwerte (Punkte) liegt auf einer Geraden (rote Linie) und entspricht damit einer Normalverteilung. An beiden Enden weichen wenige Punkte als Ausreißer davon ab.

Trotz Annäherung der Varianzen durch das Logarithmieren war der Levene-Test signifikant ($p < 0,001$). Die deskriptive Statistik veranschaulicht, dass die Varianzinhomogenität vor allem durch den Zeitverlauf und die Ausprägung der NS5B-Polymerase bedingt ist (Tabelle 11-8). Zu den frühen Zeitpunkten (4 h/ 24 h/ 48 h) sind die Standardabweichungen der Konstrukte innerhalb eines Zeitpunkts vergleichbar. Zu den späten Zeitpunkten, insbesondere zum 96 h-Zeitpunkt, sind die Standardabweichungen zwischen den Gruppen Pol +/- hingegen inhomogen, da die Konstrukte mit aktiver Polymerase eine höhere biologische Variabilität aufweisen. Betrachtet man den Faktor NS5B-Mutation isoliert, ist die Streuung der Werte innerhalb der Subgruppen Pol +/- hingegen weitestgehend homogen (Tabelle 11-8).

11.4 Post-hoc-Vergleiche SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt

Tabelle 11-9: Post-hoc-Vergleiche aller Subgruppen im SLI-III-EMCV-HiB-Konstrukt zur Analyse der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Polymerase, NS5B-Mutation und Zeitpunkt. Die Subgruppe in der ersten Spalte entspricht stets derjenigen, mit der alle aufgeführten Subgruppen in der zweiten Spalte verglichen werden („Vergleichsgruppe“). Die Ausprägung der Polymerase ist durch (+) und (-) gekennzeichnet, das Wildtypkonstrukt mit „rare“, die Codonmutante mit „com“ und die Aminosäuremutante mit „AA“ abgekürzt. Die Subgruppe („+ rare 04“) entspricht demnach beispielsweise dem Wildtypkonstrukt mit intakter NS5B-Polymerase zum Zeitpunkt 4 h nach Transfektion. Die Mittelwertsdifferenz („MW-Differenz“), die 95 %-Konfidenzintervalle (KI) und die Signifikanz sind immer auf den Vergleich des Wertes in der ersten Zeile gegen den in der zweiten Zeile bezogen. Die Tabelle setzt sich solange fort, bis alle Subgruppen miteinander verglichen wurden. Ein Wert wird somit für mehrere Vergleiche genutzt (multiples Testen), was zu Verzerrungen des Signifikanzniveaus führen kann. Für die Post-hoc-Tests wurde daher die Bonferroni-Korrektur genutzt, um höhere Maßstäbe an das Signifikanzniveau zu setzen. Die Signifikanz sind jeweils mit Bonferroni-Korrektur angegeben (p_{Bonf}) und wie folgt definiert: $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

Post-hoc-Vergleiche - Polymerase * NS5B Mutation * Zeitpunkt							
Subgruppe	Vergleichsgruppe	MW-Differenz	95% KI für Mittelwertdifferenz		t	p_{Bonf}	
			Untere	Obere			
(- AA 04)	(+ AA 04)	-0.095	-0.430	0.241	-1.070	1.000	
	(- com 04)	0.019	-0.316	0.355	0.216	1.000	
	(+ com 04)	-0.051	-0.386	0.285	-0.575	1.000	
	(- rare 04)	0.029	-0.306	0.365	0.332	1.000	
	(+ rare 04)	-0.029	-0.364	0.307	-0.324	1.000	
	(- AA 24)	0.186	-0.149	0.521	2.101	1.000	
	(+ AA 24)	0.191	-0.144	0.527	2.163	1.000	
	(- com 24)	0.272	-0.063	0.608	3.074	1.000	
	(+ com 24)	0.231	-0.105	0.566	2.608	1.000	
	(- rare 24)	0.304	-0.032	0.639	3.432	0.302	
	(+ rare 24)	0.256	-0.080	0.591	2.889	1.000	
	(- AA 48)	0.500	0.165	0.835	5.649	< .001	***
	(+ AA 48)	0.407	0.071	0.742	4.595	0.003	**
	(- com 48)	0.568	0.233	0.903	6.418	< .001	***
	(+ com 48)	0.394	0.059	0.730	4.457	0.005	**
	(- rare 48)	0.600	0.265	0.935	6.780	< .001	***
	(+ rare 48)	0.318	-0.018	0.653	3.588	0.172	
	(- AA 72)	0.858	0.522	1.193	9.691	< .001	***
	(+ AA 72)	0.164	-0.172	0.499	1.850	1.000	
	(- com 72)	1.030	0.694	1.365	11.635	< .001	***
	(+ com 72)	-0.032	-0.368	0.303	-0.363	1.000	
	(- rare 72)	0.843	0.508	1.179	9.528	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.294	-0.630	0.041	-3.324	0.439	
	(- AA 96)	1.131	0.796	1.467	12.784	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.126	-0.462	0.209	-1.426	1.000	
	(- com 96)	1.227	0.892	1.562	13.864	< .001	***
	(+ com 96)	-0.401	-0.737	-0.066	-4.536	0.004	**
	(- rare 96)	1.285	0.950	1.620	14.519	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.758	-1.093	-0.422	-8.564	< .001	***
(+ AA 04)	(- com 04)	0.114	-0.222	0.449	1.285	1.000	
	(+ com 04)	0.044	-0.292	0.379	0.495	1.000	
	(- rare 04)	0.124	-0.211	0.459	1.402	1.000	
	(+ rare 04)	0.066	-0.269	0.401	0.745	1.000	
	(- AA 24)	0.281	-0.055	0.616	3.171	0.738	
	(+ AA 24)	0.286	-0.049	0.622	3.233	0.599	
	(- com 24)	0.367	0.031	0.702	4.144	0.020	*
	(+ com 24)	0.325	-0.010	0.661	3.677	0.124	
	(- rare 24)	0.398	0.063	0.734	4.501	0.004	**
	(+ rare 24)	0.350	0.015	0.686	3.958	0.042	*
	(- AA 48)	0.595	0.259	0.930	6.718	< .001	***
	(+ AA 48)	0.501	0.166	0.837	5.664	< .001	***
	(- com 48)	0.663	0.327	0.998	7.488	< .001	***

	(+ com 48)	0.489	0.154	0.825	5.527	< .001	***
	(- rare 48)	0.695	0.359	1.030	7.849	< .001	***
	(+ rare 48)	0.412	0.077	0.748	4.657	0.002	**
	(- AA 72)	0.952	0.617	1.288	10.760	< .001	***
	(+ AA 72)	0.258	-0.077	0.594	2.920	1.000	
	(- com 72)	1.124	0.789	1.460	12.705	< .001	***
	(+ com 72)	0.063	-0.273	0.398	0.706	1.000	
	(- rare 72)	0.938	0.602	1.273	10.597	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.200	-0.535	0.136	-2.255	1.000	
	(- AA 96)	1.226	0.891	1.562	13.854	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.032	-0.367	0.304	-0.357	1.000	
	(- com 96)	1.322	0.986	1.657	14.933	< .001	***
	(+ com 96)	-0.307	-0.642	0.029	-3.467	0.266	
	(- rare 96)	1.380	1.044	1.715	15.588	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.663	-0.999	-0.328	-7.494	< .001	***
(- com 04)	(+ com 04)	-0.070	-0.405	0.265	-0.791	1.000	
	(- rare 04)	0.010	-0.325	0.346	0.116	1.000	
	(+ rare 04)	-0.048	-0.383	0.288	-0.540	1.000	
	(- AA 24)	0.167	-0.169	0.502	1.885	1.000	
	(+ AA 24)	0.172	-0.163	0.508	1.947	1.000	
	(- com 24)	0.253	-0.082	0.588	2.858	1.000	
	(+ com 24)	0.212	-0.124	0.547	2.392	1.000	
	(- rare 24)	0.285	-0.051	0.620	3.216	0.635	
	(+ rare 24)	0.237	-0.099	0.572	2.673	1.000	
	(- AA 48)	0.481	0.145	0.816	5.433	< .001	***
	(+ AA 48)	0.388	0.052	0.723	4.379	0.007	**
	(- com 48)	0.549	0.213	0.884	6.202	< .001	***
	(+ com 48)	0.375	0.040	0.711	4.241	0.013	*
	(- rare 48)	0.581	0.245	0.916	6.564	< .001	***
	(+ rare 48)	0.298	-0.037	0.634	3.372	0.372	
	(- AA 72)	0.839	0.503	1.174	9.475	< .001	***
	(+ AA 72)	0.145	-0.191	0.480	1.634	1.000	
	(- com 72)	1.011	0.675	1.346	11.419	< .001	***
	(+ com 72)	-0.051	-0.387	0.284	-0.579	1.000	
	(- rare 72)	0.824	0.489	1.160	9.312	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.313	-0.649	0.022	-3.540	0.205	
	(- AA 96)	1.112	0.777	1.448	12.568	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.145	-0.481	0.190	-1.642	1.000	
	(- com 96)	1.208	0.872	1.543	13.648	< .001	***
	(+ com 96)	-0.421	-0.756	-0.085	-4.752	0.001	**
	(- rare 96)	1.266	0.930	1.601	14.303	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.777	-1.112	-0.442	-8.779	< .001	***
(+ com 04)	(- rare 04)	0.080	-0.255	0.416	0.907	1.000	
	(+ rare 04)	0.022	-0.313	0.358	0.251	1.000	
	(- AA 24)	0.237	-0.099	0.572	2.676	1.000	
	(+ AA 24)	0.242	-0.093	0.578	2.738	1.000	
	(- com 24)	0.323	-0.012	0.658	3.649	0.137	
	(+ com 24)	0.282	-0.054	0.617	3.183	0.709	
	(- rare 24)	0.355	0.019	0.690	4.007	0.035	*
	(+ rare 24)	0.307	-0.029	0.642	3.464	0.269	
	(- AA 48)	0.551	0.215	0.886	6.224	< .001	***
	(+ AA 48)	0.458	0.122	0.793	5.170	< .001	***
	(- com 48)	0.619	0.283	0.954	6.993	< .001	***
	(+ com 48)	0.445	0.110	0.781	5.032	< .001	***
	(- rare 48)	0.651	0.315	0.986	7.355	< .001	***
	(+ rare 48)	0.368	0.033	0.704	4.163	0.018	*
	(- AA 72)	0.909	0.573	1.244	10.266	< .001	***
	(+ AA 72)	0.215	-0.121	0.550	2.425	1.000	
	(- com 72)	1.081	0.745	1.416	12.210	< .001	***
	(+ com 72)	0.019	-0.317	0.354	0.212	1.000	
	(- rare 72)	0.894	0.559	1.230	10.103	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.243	-0.579	0.092	-2.750	1.000	
	(- AA 96)	1.182	0.847	1.518	13.359	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.075	-0.411	0.260	-0.851	1.000	

	(- com 96)	1.278	0.942	1.613	14.439	< .001	***
	(+ com 96)	-0.351	-0.686	-0.015	-3.961	0.042	*
	(- rare 96)	1.336	1.000	1.671	15.094	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.707	-1.042	-0.372	-7.989	< .001	***
(- rare 04)	(+ rare 04)	-0.058	-0.394	0.277	-0.656	1.000	
	(- AA 24)	0.157	-0.179	0.492	1.769	1.000	
	(+ AA 24)	0.162	-0.173	0.498	1.831	1.000	
	(- com 24)	0.243	-0.093	0.578	2.742	1.000	
	(+ com 24)	0.201	-0.134	0.537	2.276	1.000	
	(- rare 24)	0.274	-0.061	0.610	3.099	0.933	
	(+ rare 24)	0.226	-0.109	0.562	2.557	1.000	
	(- AA 48)	0.471	0.135	0.806	5.317	< .001	***
	(+ AA 48)	0.377	0.042	0.713	4.263	0.012	*
	(- com 48)	0.539	0.203	0.874	6.086	< .001	***
	(+ com 48)	0.365	0.030	0.701	4.125	0.021	*
	(- rare 48)	0.571	0.235	0.906	6.448	< .001	***
	(+ rare 48)	0.288	-0.047	0.624	3.255	0.555	
	(- AA 72)	0.828	0.493	1.164	9.359	< .001	***
	(+ AA 72)	0.134	-0.201	0.470	1.518	1.000	
	(- com 72)	1.000	0.665	1.336	11.303	< .001	***
	(+ com 72)	-0.062	-0.397	0.274	-0.695	1.000	
	(- rare 72)	0.814	0.478	1.149	9.196	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.324	-0.659	0.012	-3.657	0.134	
	(- AA 96)	1.102	0.767	1.437	12.452	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.156	-0.491	0.180	-1.759	1.000	
	(- com 96)	1.198	0.862	1.533	13.531	< .001	***
	(+ com 96)	-0.431	-0.766	-0.095	-4.868	< .001	***
	(- rare 96)	1.256	0.920	1.591	14.186	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.787	-1.123	-0.452	-8.896	< .001	***
(+ rare 04)	(- AA 24)	0.215	-0.121	0.550	2.425	1.000	
	(+ AA 24)	0.220	-0.115	0.556	2.488	1.000	
	(- com 24)	0.301	-0.035	0.636	3.399	0.339	
	(+ com 24)	0.260	-0.076	0.595	2.932	1.000	
	(- rare 24)	0.332	-0.003	0.668	3.756	0.092	
	(+ rare 24)	0.284	-0.051	0.620	3.213	0.640	
	(- AA 48)	0.529	0.193	0.864	5.973	< .001	***
	(+ AA 48)	0.435	0.100	0.771	4.919	< .001	***
	(- com 48)	0.597	0.261	0.932	6.743	< .001	***
	(+ com 48)	0.423	0.088	0.759	4.782	0.001	**
	(- rare 48)	0.629	0.293	0.964	7.104	< .001	***
	(+ rare 48)	0.346	0.011	0.682	3.912	0.050	
	(- AA 72)	0.886	0.551	1.222	10.015	< .001	***
	(+ AA 72)	0.192	-0.143	0.528	2.174	1.000	
	(- com 72)	1.058	0.723	1.394	11.960	< .001	***
	(+ com 72)	-0.003	-0.339	0.332	-0.039	1.000	
	(- rare 72)	0.872	0.537	1.207	9.852	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.266	-0.601	0.070	-3.000	1.000	
	(- AA 96)	1.160	0.825	1.496	13.108	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.098	-0.433	0.238	-1.102	1.000	
	(- com 96)	1.256	0.920	1.591	14.188	< .001	***
	(+ com 96)	-0.373	-0.708	-0.037	-4.212	0.015	*
	(- rare 96)	1.314	0.978	1.649	14.843	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.729	-1.065	-0.394	-8.239	< .001	***
(- AA 24)	(+ AA 24)	0.005	-0.330	0.341	0.062	1.000	
	(- com 24)	0.086	-0.249	0.422	0.973	1.000	
	(+ com 24)	0.045	-0.291	0.380	0.507	1.000	
	(- rare 24)	0.118	-0.218	0.453	1.330	1.000	
	(+ rare 24)	0.070	-0.266	0.405	0.788	1.000	
	(- AA 48)	0.314	-0.021	0.649	3.548	0.199	
	(+ AA 48)	0.221	-0.115	0.556	2.494	1.000	
	(- com 48)	0.382	0.047	0.718	4.317	0.010	**
	(+ com 48)	0.209	-0.127	0.544	2.356	1.000	
	(- rare 48)	0.414	0.079	0.750	4.679	0.002	**
	(+ rare 48)	0.132	-0.204	0.467	1.486	1.000	

	(- AA 72)	0.672	0.336	1.007	7.590	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.022	-0.358	0.313	-0.251	1.000	
	(- com 72)	0.844	0.508	1.179	9.534	< .001	***
	(+ com 72)	-0.218	-0.554	0.117	-2.464	1.000	
	(- rare 72)	0.657	0.322	0.993	7.427	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.480	-0.816	-0.145	-5.426	< .001	***
	(- AA 96)	0.945	0.610	1.281	10.683	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.312	-0.648	0.023	-3.528	0.214	
	(- com 96)	1.041	0.706	1.376	11.762	< .001	***
	(+ com 96)	-0.587	-0.923	-0.252	-6.637	< .001	***
	(- rare 96)	1.099	0.764	1.434	12.418	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.944	-1.279	-0.608	-	< .001	***
					10.665		
(+ AA 24)	(- com 24)	0.081	-0.255	0.416	0.911	1.000	
	(+ com 24)	0.039	-0.296	0.375	0.445	1.000	
	(- rare 24)	0.112	-0.223	0.448	1.268	1.000	
	(+ rare 24)	0.064	-0.271	0.400	0.725	1.000	
	(- AA 48)	0.308	-0.027	0.644	3.486	0.249	
	(+ AA 48)	0.215	-0.120	0.551	2.431	1.000	
	(- com 48)	0.377	0.041	0.712	4.255	0.013	*
	(+ com 48)	0.203	-0.132	0.538	2.294	1.000	
	(- rare 48)	0.409	0.073	0.744	4.616	0.003	**
	(+ rare 48)	0.126	-0.209	0.462	1.424	1.000	
	(- AA 72)	0.666	0.331	1.002	7.528	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.028	-0.363	0.308	-0.313	1.000	
	(- com 72)	0.838	0.503	1.174	9.472	< .001	***
	(+ com 72)	-0.224	-0.559	0.112	-2.526	1.000	
	(- rare 72)	0.652	0.316	0.987	7.364	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.486	-0.821	-0.150	-5.488	< .001	***
	(- AA 96)	0.940	0.605	1.275	10.621	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.318	-0.653	0.018	-3.590	0.171	
	(- com 96)	1.036	0.700	1.371	11.700	< .001	***
	(+ com 96)	-0.593	-0.928	-0.258	-6.700	< .001	***
	(- rare 96)	1.094	0.758	1.429	12.355	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.949	-1.285	-0.614	-	< .001	***
					10.727		
(- com 24)	(+ com 24)	-0.041	-0.377	0.294	-0.466	1.000	
	(- rare 24)	0.032	-0.304	0.367	0.357	1.000	
	(+ rare 24)	-0.016	-0.352	0.319	-0.185	1.000	
	(- AA 48)	0.228	-0.108	0.563	2.575	1.000	
	(+ AA 48)	0.135	-0.201	0.470	1.520	1.000	
	(- com 48)	0.296	-0.039	0.631	3.344	0.410	
	(+ com 48)	0.122	-0.213	0.458	1.383	1.000	
	(- rare 48)	0.328	-0.007	0.663	3.706	0.111	
	(+ rare 48)	0.045	-0.290	0.381	0.513	1.000	
	(- AA 72)	0.586	0.250	0.921	6.617	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.108	-0.444	0.227	-1.224	1.000	
	(- com 72)	0.758	0.422	1.093	8.561	< .001	***
	(+ com 72)	-0.304	-0.640	0.031	-3.437	0.296	
	(- rare 72)	0.571	0.236	0.907	6.454	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.566	-0.902	-0.231	-6.399	< .001	***
	(- AA 96)	0.859	0.524	1.195	9.710	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.398	-0.734	-0.063	-4.501	0.004	**
	(- com 96)	0.955	0.619	1.290	10.789	< .001	***
	(+ com 96)	-0.674	-1.009	-0.338	-7.611	< .001	***
	(- rare 96)	1.013	0.677	1.348	11.444	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.030	-1.365	-0.695	-	< .001	***
					11.638		
(+ com 24)	(- rare 24)	0.073	-0.263	0.408	0.824	1.000	
	(+ rare 24)	0.025	-0.311	0.360	0.281	1.000	
	(- AA 48)	0.269	-0.066	0.605	3.041	1.000	
	(+ AA 48)	0.176	-0.160	0.511	1.987	1.000	
	(- com 48)	0.337	0.002	0.673	3.810	0.075	
	(+ com 48)	0.164	-0.172	0.499	1.849	1.000	

	(- rare 48)	0.369	0.034	0.705	4.172	0.018	*
	(+ rare 48)	0.087	-0.249	0.422	0.980	1.000	
	(- AA 72)	0.627	0.291	0.962	7.083	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.067	-0.403	0.268	-0.758	1.000	
	(- com 72)	0.799	0.464	1.134	9.027	< .001	***
	(+ com 72)	-0.263	-0.598	0.073	-2.971	1.000	
	(- rare 72)	0.612	0.277	0.948	6.920	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.525	-0.860	-0.190	-5.932	< .001	***
	(- AA 96)	0.901	0.565	1.236	10.176	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.357	-0.692	-0.022	-4.034	0.031	*
	(- com 96)	0.996	0.661	1.332	11.256	< .001	***
	(+ com 96)	-0.632	-0.968	-0.297	-7.144	< .001	***
	(- rare 96)	1.054	0.719	1.390	11.911	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.989	-1.324	-0.653	-	< .001	***
					11.171		
(- rare 24)	(+ rare 24)	-0.048	-0.383	0.287	-0.543	1.000	
	(- AA 48)	0.196	-0.139	0.532	2.217	1.000	
	(+ AA 48)	0.103	-0.232	0.438	1.163	1.000	
	(- com 48)	0.264	-0.071	0.600	2.987	1.000	
	(+ com 48)	0.091	-0.245	0.426	1.026	1.000	
	(- rare 48)	0.296	-0.039	0.632	3.348	0.404	
	(+ rare 48)	0.014	-0.322	0.349	0.156	1.000	
	(- AA 72)	0.554	0.219	0.889	6.259	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.140	-0.475	0.195	-1.581	1.000	
	(- com 72)	0.726	0.391	1.062	8.204	< .001	***
	(+ com 72)	-0.336	-0.671	-3.974e-4	-3.795	0.079	
	(- rare 72)	0.540	0.204	0.875	6.096	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.598	-0.933	-0.262	-6.756	< .001	***
	(- AA 96)	0.828	0.492	1.163	9.353	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.430	-0.765	-0.095	-4.858	< .001	***
	(- com 96)	0.923	0.588	1.259	10.432	< .001	***
	(+ com 96)	-0.705	-1.041	-0.370	-7.968	< .001	***
	(- rare 96)	0.981	0.646	1.317	11.087	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.062	-1.397	-0.726	-	< .001	***
					11.995		
(+ rare 24)	(- AA 48)	0.244	-0.091	0.580	2.760	1.000	
	(+ AA 48)	0.151	-0.184	0.486	1.706	1.000	
	(- com 48)	0.312	-0.023	0.648	3.529	0.213	
	(+ com 48)	0.139	-0.197	0.474	1.568	1.000	
	(- rare 48)	0.344	0.009	0.680	3.891	0.055	
	(+ rare 48)	0.062	-0.274	0.397	0.699	1.000	
	(- AA 72)	0.602	0.267	0.937	6.802	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.092	-0.427	0.244	-1.039	1.000	
	(- com 72)	0.774	0.439	1.110	8.746	< .001	***
	(+ com 72)	-0.288	-0.623	0.048	-3.252	0.562	
	(- rare 72)	0.588	0.252	0.923	6.639	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.550	-0.885	-0.214	-6.213	< .001	***
	(- AA 96)	0.876	0.540	1.211	9.895	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.382	-0.717	-0.046	-4.315	0.010	**
	(- com 96)	0.971	0.636	1.307	10.975	< .001	***
	(+ com 96)	-0.657	-0.993	-0.322	-7.425	< .001	***
	(- rare 96)	1.029	0.694	1.365	11.630	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.014	-1.349	-0.678	-	< .001	***
					11.452		
(- AA 48)	(+ AA 48)	-0.093	-0.429	0.242	-1.054	1.000	
	(- com 48)	0.068	-0.267	0.404	0.769	1.000	
	(+ com 48)	-0.105	-0.441	0.230	-1.192	1.000	
	(- rare 48)	0.100	-0.235	0.436	1.131	1.000	
	(+ rare 48)	-0.182	-0.518	0.153	-2.061	1.000	
	(- AA 72)	0.358	0.022	0.693	4.042	0.030	*
	(+ AA 72)	-0.336	-0.672	-0.141	-3.799	0.078	
	(- com 72)	0.530	0.194	0.865	5.986	< .001	***
	(+ com 72)	-0.532	-0.868	-0.197	-6.012	< .001	***

	(- rare 72)	0.343	0.008	0.679	3.879	0.057	
	(+ rare 72)	-0.794	-1.130	-0.459	-8.973	< .001	***
	(- AA 96)	0.631	0.296	0.967	7.135	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.626	-0.962	-0.291	-7.075	< .001	***
	(- com 96)	0.727	0.392	1.062	8.215	< .001	***
	(+ com 96)	-0.901	-1.237	-0.566	-	< .001	***
					10.185		
	(- rare 96)	0.785	0.450	1.120	8.870	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.258	-1.593	-0.922	-	< .001	***
					14.213		
(+ AA 48)	(- com 48)	0.161	-0.174	0.497	1.824	1.000	
	(+ com 48)	-0.012	-0.348	0.323	-0.137	1.000	
	(- rare 48)	0.193	-0.142	0.529	2.185	1.000	
	(+ rare 48)	-0.089	-0.425	0.246	-1.007	1.000	
	(- AA 72)	0.451	0.116	0.786	5.096	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.243	-0.578	0.093	-2.745	1.000	
	(- com 72)	0.623	0.288	0.959	7.041	< .001	***
	(+ com 72)	-0.439	-0.774	-0.103	-4.958	< .001	***
	(- rare 72)	0.437	0.101	0.772	4.933	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.701	-1.036	-0.365	-7.919	< .001	***
	(- AA 96)	0.725	0.389	1.060	8.189	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.533	-0.868	-0.197	-6.021	< .001	***
	(- com 96)	0.820	0.485	1.156	9.269	< .001	***
	(+ com 96)	-0.808	-1.144	-0.473	-9.131	< .001	***
	(- rare 96)	0.878	0.543	1.214	9.924	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.165	-1.500	-0.829	-	< .001	***
					13.158		
(- com 48)	(+ com 48)	-0.174	-0.509	0.162	-1.961	1.000	
	(- rare 48)	0.032	-0.303	0.367	0.361	1.000	
	(+ rare 48)	-0.251	-0.586	0.085	-2.831	1.000	
	(- AA 72)	0.290	-0.046	0.625	3.273	0.524	
	(+ AA 72)	-0.404	-0.740	-0.069	-4.568	0.003	**
	(- com 72)	0.462	0.126	0.797	5.217	< .001	***
	(+ com 72)	-0.600	-0.936	-0.265	-6.781	< .001	***
	(- rare 72)	0.275	-0.060	0.611	3.110	0.902	
	(+ rare 72)	-0.862	-1.198	-0.527	-9.743	< .001	***
	(- AA 96)	0.563	0.228	0.899	6.366	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.694	-1.030	-0.359	-7.845	< .001	***
	(- com 96)	0.659	0.323	0.994	7.445	< .001	***
	(+ com 96)	-0.970	-1.305	-0.634	-	< .001	***
					10.955		
	(- rare 96)	0.717	0.381	1.052	8.100	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.326	-1.661	-0.991	-	< .001	***
					14.982		
(+ com 48)	(- rare 48)	0.206	-0.130	0.541	2.322	1.000	
	(+ rare 48)	-0.077	-0.412	0.258	-0.870	1.000	
	(- AA 72)	0.463	0.128	0.799	5.234	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.231	-0.566	0.105	-2.607	1.000	
	(- com 72)	0.635	0.300	0.971	7.178	< .001	***
	(+ com 72)	-0.427	-0.762	-0.091	-4.820	0.001	**
	(- rare 72)	0.449	0.113	0.784	5.071	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.689	-1.024	-0.353	-7.782	< .001	***
	(- AA 96)	0.737	0.402	1.072	8.327	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.521	-0.856	-0.185	-5.884	< .001	***
	(- com 96)	0.832	0.497	1.168	9.406	< .001	***
	(+ com 96)	-0.796	-1.131	-0.461	-8.994	< .001	***
	(- rare 96)	0.890	0.555	1.226	10.061	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.152	-1.488	-0.817	-	< .001	***
					13.021		
(- rare 48)	(+ rare 48)	-0.283	-0.618	0.053	-3.192	0.687	
	(- AA 72)	0.258	-0.078	0.593	2.911	1.000	
	(+ AA 72)	-0.436	-0.772	-0.101	-4.930	< .001	***
	(- com 72)	0.430	0.094	0.765	4.855	< .001	***
	(+ com 72)	-0.632	-0.968	-0.297	-7.143	< .001	***

	(- rare 72)	0.243	-0.092	0.579	2.748	1.000	
	(+ rare 72)	-0.894	-1.230	-0.559	-	< .001	***
					10.104		
	(- AA 96)	0.531	0.196	0.867	6.004	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.726	-1.062	-0.391	-8.206	< .001	***
	(- com 96)	0.627	0.292	0.962	7.084	< .001	***
	(+ com 96)	-1.002	-1.337	-0.666	-	< .001	***
					11.316		
	(- rare 96)	0.685	0.349	1.020	7.739	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.358	-1.693	-1.023	-	< .001	***
					15.343		
(+ rare 48)	(- AA 72)	0.540	0.205	0.876	6.103	< .001	***
	(+ AA 72)	-0.154	-0.489	0.182	-1.738	1.000	
	(- com 72)	0.712	0.377	1.048	8.048	< .001	***
	(+ com 72)	-0.350	-0.685	-0.014	-3.951	0.043	*
	(- rare 72)	0.526	0.190	0.861	5.940	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.612	-0.947	-0.276	-6.912	< .001	***
	(- AA 96)	0.814	0.478	1.149	9.197	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.444	-0.779	-0.108	-5.014	< .001	***
	(- com 96)	0.909	0.574	1.245	10.276	< .001	***
	(+ com 96)	-0.719	-1.054	-0.384	-8.124	< .001	***
	(- rare 96)	0.967	0.632	1.303	10.931	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.075	-1.411	-0.740	-	< .001	***
					12.151		
(- AA 72)	(+ AA 72)	-0.694	-1.029	-0.359	-7.841	< .001	***
	(- com 72)	0.172	-0.163	0.508	1.944	1.000	
	(+ com 72)	-0.890	-1.225	-0.554	-	< .001	***
					10.054		
	(- rare 72)	-0.014	-0.350	0.321	-0.163	1.000	
	(+ rare 72)	-1.152	-1.487	-0.816	-	< .001	***
					13.015		
	(- AA 96)	0.274	-0.062	0.609	3.093	0.952	
	(+ AA 96)	-0.984	-1.319	-0.648	-	< .001	***
					11.117		
	(- com 96)	0.369	0.034	0.705	4.173	0.018	*
	(+ com 96)	-1.259	-1.595	-0.924	-	< .001	***
					14.227		
	(- rare 96)	0.427	0.092	0.763	4.828	0.001	**
	(+ rare 96)	-1.616	-1.951	-1.280	-	< .001	***
					18.255		
(+ AA 72)	(- com 72)	0.866	0.531	1.201	9.785	< .001	***
	(+ com 72)	-0.196	-0.531	0.140	-2.213	1.000	
	(- rare 72)	0.680	0.344	1.015	7.678	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.458	-0.793	-0.123	-5.175	< .001	***
	(- AA 96)	0.968	0.632	1.303	10.934	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.290	-0.625	0.045	-3.277	0.517	
	(- com 96)	1.063	0.728	1.399	12.013	< .001	***
	(+ com 96)	-0.565	-0.901	-0.230	-6.386	< .001	***
	(- rare 96)	1.121	0.786	1.457	12.669	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.922	-1.257	-0.586	-	< .001	***
					10.414		
(- com 72)	(+ com 72)	-1.062	-1.397	-0.726	-	< .001	***
					11.998		
	(- rare 72)	-0.187	-0.522	0.149	-2.107	1.000	
	(+ rare 72)	-1.324	-1.659	-0.989	-	< .001	***
					14.960		
	(- AA 96)	0.102	-0.234	0.437	1.149	1.000	
	(+ AA 96)	-1.156	-1.491	-0.821	-	< .001	***
					13.062		
	(- com 96)	0.197	-0.138	0.533	2.228	1.000	
	(+ com 96)	-1.431	-1.767	-1.096	-	< .001	***
					16.172		
	(- rare 96)	0.255	-0.080	0.591	2.883	1.000	
	(+ rare 96)	-1.788	-2.123	-1.452	-	< .001	***
					20.199		

(+ com 72)	(- rare 72)	0.875	0.540	1.211	9.891	< .001	***
	(+ rare 72)	-0.262	-0.598	0.073	-2.961	1.000	
	(- AA 96)	1.164	0.828	1.499	13.147	< .001	***
	(+ AA 96)	-0.094	-0.430	0.241	-1.063	1.000	
	(- com 96)	1.259	0.924	1.595	14.227	< .001	***
	(+ com 96)	-0.369	-0.705	-0.034	-4.173	0.018	*
	(- rare 96)	1.317	0.982	1.653	14.882	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.726	-1.061	-0.390	-8.201	< .001	***
(- rare 72)	(+ rare 72)	-1.137	-1.473	-0.802	-	< .001	***
					12.852		
	(- AA 96)	0.288	-0.047	0.624	3.256	0.554	
	(+ AA 96)	-0.969	-1.305	-0.634	-	< .001	***
					10.954		
	(- com 96)	0.384	0.048	0.719	4.336	0.009	**
	(+ com 96)	-1.245	-1.580	-0.909	-	< .001	***
					14.064		
	(- rare 96)	0.442	0.106	0.777	4.991	< .001	***
	(+ rare 96)	-1.601	-1.937	-1.266	-	< .001	***
					18.091		
(+ rare 72)	(- AA 96)	1.426	1.090	1.761	16.109	< .001	***
	(+ AA 96)	0.168	-0.167	0.503	1.898	1.000	
	(- com 96)	1.521	1.186	1.857	17.188	< .001	***
	(+ com 96)	-0.107	-0.443	0.228	-1.212	1.000	
	(- rare 96)	1.579	1.244	1.915	17.843	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.464	-0.799	-0.128	-5.239	< .001	***
(- AA 96)	(+ AA 96)	-1.258	-1.593	-0.922	-	< .001	***
					14.211		
	(- com 96)	0.096	-0.240	0.431	1.079	1.000	
	(+ com 96)	-1.533	-1.868	-1.197	-	< .001	***
					17.320		
	(- rare 96)	0.154	-0.182	0.489	1.735	1.000	
	(+ rare 96)	-1.889	-2.225	-1.554	-	< .001	***
					21.348		
(+ AA 96)	(- com 96)	1.353	1.018	1.689	15.290	< .001	***
	(+ com 96)	-0.275	-0.611	0.060	-3.110	0.901	
	(- rare 96)	1.411	1.076	1.747	15.945	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.632	-0.967	-0.296	-7.137	< .001	***
(- com 96)	(+ com 96)	-1.628	-1.964	-1.293	-	< .001	***
					18.400		
	(- rare 96)	0.058	-0.277	0.393	0.655	1.000	
	(+ rare 96)	-1.985	-2.320	-1.649	-	< .001	***
					22.427		
(+ com 96)	(- rare 96)	1.686	1.351	2.022	19.055	< .001	***
	(+ rare 96)	-0.356	-0.692	-0.021	-4.027	0.032	*
(- rare 96)	(+ rare 96)	-2.043	-2.378	-1.707	-	< .001	***
					23.082		
* p < .05, ** p < .01, *** p < .001							

12 Publikationsverzeichnis

09/2020 Gerresheim GK†, Hess CS†, Shalamova LS, Fricke M, Marz M, Andreev DE, Shatsky IN and Niepmann M. Ribosome Pausing at Inefficient Codons at the End of the Replicase Coding Region Is Important for Hepatitis C Virus Genome Replication. Int J Mol Sci 2020; 21. doi:10.3390/ijms21186955.

† These authors contributed equally to this work (gleichberechtigte Erstautorenschaft).

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/Datum

Unterschrift

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich auf dem Weg begleitet, unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Allen voran gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Michael Niepmann für die ausgezeichnete Betreuung im Rahmen dieser Arbeit. Vielen Dank für die Vergabe des Projekts, die Bereitstellung des Labors sowie der Materialien und die vielen wertvollen Diskussionen – sowohl im Zuge der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Experimente als auch im späteren Schreibprozess.

Herrn Professor Dr. John Ziebuhr möchte ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit danken.

Ein besonders großer Dank geht an Frau Dr. Gesche K. Gerresheim für die großartige Einarbeitung und Begleitung dieses Projekts. Vielen Dank für die Unterstützung durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit, die Stunden des gemeinsamen Grübelns sowie die zahlreichen guten Impulse und Ratschläge.

Vielen Dank an Frau Dr. Anita Windhorst für das ausführliche Beantworten aller statistischen Fragen und die gewissenhafte Beratung im Rahmen der statistischen Auswertung.

Ein großes Dankeschön geht überdies an die Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und finanzielle Förderung über das gesamte Studium hinweg, inklusive der Zeit der experimentellen Laborarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich zudem bei meinen Laborkollegen und -kolleginnen für die vielen schönen gemeinsamen Stunden im Labor, die anregenden Gespräche und die gegenseitige Motivation bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung, ohne die sowohl dieses Studium als auch die Anfertigung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wären. Ihr habt mich auch in herausfordernden Phasen immer wieder aufgebaut und fest an mich geglaubt.