

Analyse und Verbesserung der spezifischen Detektion der Minusstrangsynthese
des Hepatitis C Virus

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

vorgelegt von Budnik, Jonas
aus Nienburg/Weser

Gießen 2024

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

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Tag der Disputation: 27.08.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinische Aspekte der Hepatitis C.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	2
1.1.2	Symptome.....	2
1.1.3	Diagnostik.....	2
1.1.4	Therapie.....	3
1.2	Aufbau von HCV.....	4
1.3	HCV Replikationszyklus.....	6
1.4	HCV-Replikonsystem in der Zellkultur.....	8
1.5	Replikation.....	9
1.6	Ziel dieser Arbeit.....	12
1.7	Fragestellung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.2	Geräte.....	16
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.4	Lösungen und Puffer.....	20
2.1.5	Enzyme.....	23
2.1.6	Kit-Systeme.....	23
2.1.7	Plasmide.....	24
2.1.8	Antikörper.....	24
2.1.9	Oligonukleotide.....	25
2.1.10	Größen- und Längenstandards.....	26
2.1.11	Bakterienstämme.....	26
2.1.12	Zelllinien.....	27
2.1.13	Kulturmedien.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Überblick.....	28

2.2.2	Auftauen von Zellen.....	28
2.2.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	29
2.2.4	Zellzahlbestimmung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer	29
2.2.5	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	30
2.2.6	Kultivierung von Bakterien	30
2.2.7	Transformation.....	30
2.2.8	Isolation einer Einzelkolonie und Ansetzen einer Vorkultur.....	31
2.2.9	Ansetzen einer Hauptkultur	31
2.2.10	Plasmidpräparation.....	32
2.2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit dem Qubit®.....	32
2.2.12	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.13	Restriktionsverdau.....	33
2.2.14	Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren	34
2.2.15	Standard <i>in vitro</i> -Transkription.....	35
2.2.16	Hi-T7 <i>in vitro</i> -Transkription.....	36
2.2.17	Blocker-Oligonukleotide in der <i>in vitro</i> -Transkription	36
2.2.18	Nukleinsäureextraktion aus einem Agarose-Gel.....	37
2.2.19	DNase-Verdau.....	37
2.2.20	Transfektion	38
2.2.21	Zelllyse	38
2.2.22	Totale RNA-Extraktion	39
2.2.23	Aufreinigung mittels RNA Cleanup und Concentration Kit	39
2.2.24	Reverse Transkription	40
2.2.25	Blocker-Oligonukleotide in der Reverse Transkription	41
2.2.26	Quantitative PCR	41
2.2.27	Western Blot	43
2.2.27.1	<i>Probengewinnung</i>	43
2.2.27.2	<i>Auftrennung der Proteine</i>	43
2.2.27.3	<i>Transfer der Proteine</i>	45
2.2.27.4	<i>Detektion der Proteine</i>	45
2.2.28	Biotin-PCR.....	46
2.2.29	Aufreinigung mit Streptavidin Magnetic Beads	47
2.2.30	Auswertung der qPCR.....	48

3	Ergebnisse	50
3.1	Kontrolle der Rahmenbedingungen	50
3.1.1	Kontrolle der hergestellten HCV-Konstrukte	50
3.1.2	Kontrolle der HCV Proteinexpression	51
3.1.3	Kontrolle der PCR-Produkte.....	53
3.2	Bildung artifizierter Minusstränge verhindern	54
3.2.1	Hi-T7 Polymerase	54
3.2.2	Blocker-Oligonukleotid.....	55
3.2.3	SNAP Spinach Primer und Touch-Down-RT-Protokoll	58
3.2.4	Neuer EMCV Primer.....	60
3.2.5	RT-Dauer	61
3.2.6	Spinach-Amplikon Blocker	64
3.3	DNA-induzierter qPCR-Hintergrund	66
3.3.1	Turbo DNase.....	66
3.3.2	Gel Extraktion.....	67
3.3.3	LiCl Fällung.....	68
3.3.4	Streptavidin-Beads Aufreinigung.....	70
3.4	qPCR-Analyse der HCV-Minusstrangsynthese.....	74
4	Diskussion	78
4.1	Diskussion der Methoden	79
4.1.1	<i>in vitro</i> -Transkription	79
4.1.2	RT-Reaktion.....	81
4.1.3	qPCR.....	83
4.2	Die Minusstrang-Synthese im <i>Time Course</i> -Experiment.....	87
4.3	Fazit und Ausblick	88
5	Zusammenfassung	90
6	Summary	91
7	Abkürzungsverzeichnis	92
8	Abbildungsverzeichnis	96
9	Tabellenverzeichnis	97

10	Literaturverzeichnis	98
11	Anhang.....	109
11.1	Plasmidkarten	109
11.1.1	pUC18_P.s_WT_hp_9899.....	109
11.1.2	pUC18_P.s_WT_hp_GND_9899.....	110
11.1.3	pUC18_P.s_WT_SL I-II_wt_9968	110
11.1.4	pUC18_P.s_WT_SL I-III_10182.....	111
11.1.5	pUC18_P.s_WT_SL I-III_GND_10182.....	112
11.1.6	pUC18_P.s_WT_5'UTRsinfr_stop_10242	112
11.1.7	pUC18_P.s_WT_5'UTR_Core_10779	113
12	Publikationsverzeichnis.....	114
12.1.1	Manuskript in Bearbeitung	114
13	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....	115
14	Danksagung	116

1 Einleitung

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde erstmals 1975 als ein Infektionserreger für die transfusions-assoziierte Hepatitis, die weder dem Typ A noch dem Typ B zugeordnet werden konnte (Non-A non-B Hepatitis, NANBH), beschrieben (Alter et al., 1975; Feinstone et al., 1975). In einem Tierexperiment mit Schimpansen wurden virale Eigenschaften in der Übertragung der NANBH nachgewiesen (Alter et al., 1978). Folgend wurde ein cDNA Klon aus Patientenserum isoliert und das entsprechende positiv orientierte RNA Genom identifiziert, welches ein NANBH Antigen codiert, sodass die Krankheit durch diesen Erreger fortan als Hepatitis C bezeichnet wurde (Choo et al., 1989). Mithilfe dieses Wissens wurde dann ein Antikörper-Test entworfen, welcher einen großen Mehrwert für die Forschung und Diagnostik brachte (Kuo et al., 1989). Einige Zeit später wurde ein infektiöser cDNA Klon entworfen, welcher die Grundlage für die Analyse der Funktionsmechanismen des Virus *in vitro* und *in vivo* bildete (Kolykhalov et al., 1997). Diese Errungenschaften wurden als Grundstein der Therapieforschung in diesem Feld mit einem Nobelpreis honoriert (NobelPrize.org, 2020). Das HCV wurde später der Spezies *Hepacivirus C* zugeordnet, welche 7 Genotypen umfasst und der Gattung *Hepacivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae* angehört (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016; Smith et al., 2014). Die World-Health-Organisation (WHO) formulierte 2016 das Ziel, die chronische Hepatitis C als Gefahr für die Öffentlichkeit bis 2030 zu eliminieren, indem mindestens 90 % der Infektionen diagnostiziert und mindestens 80 % der diagnostizierten Infektionen behandelt werden (WHO, 2018). Dieses Ziel kann nur mit einer Kombination aus Screening-Verfahren, konsequenter Therapie von Infektionen und flächendeckenden Präventivmaßnahmen erfolgen (Houghton, 2019). Neben etablierten Screening-Verfahren und einer suffizienten interferon-freien Therapie mangelt es seit Jahren an einer Impfung, da die Vielfältigkeit des HCV die Forschung vor eine große Herausforderung stellt (Bailey et al., 2019). Die Grundlagenforschung am HCV ist somit weiterhin wichtig, da das WHO-Ziel 2030 mit den aktuell verfügbaren Mitteln voraussichtlich nicht erreicht werden kann (Blach et al., 2022; Cox, 2020; Roingeard & Beaumont, 2020).

1.1 Klinische Aspekte der Hepatitis C

Klinisch führt eine Infektion mit HCV zu einer Hepatitis C. Die Hepatitis C ist zunächst eine akute Infektion, die in ca. 75 % der Fälle asymptomatisch verläuft und eine

Spontanheilungsrate von ca. 25 % aufweist. In den übrigen 75 % der Fälle wird die Infektion chronisch (persistierende Infektion > 6 Monaten). Eine chronische Hepatitis C führt innerhalb von 20 Jahren bei 20 % der Patienten¹ über eine Fibrosierung zur Leberzirrhose. Von diesem Patientenkollektiv entwickeln pro Jahr 1 - 4 % ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) (Chen & Morgan, 2006).

1.1.1 Epidemiologie

Die globale Prävalenz einer Hepatitis C Infektion liegt bei ca. 1 % mit einer absoluten Zahl an Infektionen von ca. 71,1 Millionen Infektionen. Davon haben die Genotypen 1 und 3 mit 44 % und 25 % den größten Anteil am Infektionsgeschehen. Die Prävalenz in Deutschland liegt bei ca. 0,3 % (Blach et al., 2017). Die Übertragung des Virus erfolgt parenteral über Nadeln oder Blutprodukte, vertikal über virämische Mütter oder sexuell. Dem sexuellen Übertragungsweg wird hierbei nur eine untergeordnete Bedeutung zugeschrieben. Den Hauptübertragungsweg stellen intravenöser, intranasaler und intrarektaler Drogenkonsum dar. Aufgrund der gemeinsamen Transmissionswege vom Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und HCV ist eine Co-Infektion mit HCV bei HIV Patienten häufig und führt zu einer erhöhten Morbidität (Webster et al., 2015).

1.1.2 Symptome

Die Symptome der Hepatitis C lassen sich in hepatische und extrahepatische Manifestationen gliedern. Patienten können Symptome wie Krankheitsgefühl, Schwäche, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Ikterus aufweisen (Chen & Morgan, 2006). Außerdem kann eine Kryoglobulinämie, als häufigste Ursache von extrahepatischen Manifestationen, auch zu Symptomen wie Fatigue, Hauteffloreszenzen, Arthralgien, Raynaud-Phänomen, Vaskulitis, Nierenerkrankungen oder einer peripheren Neuropathie führen (Cacoub et al., 2000).

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik der Hepatitis C erfolgt über ein Screening mit einem Anti-HCV-Antikörpertest und einen Bestätigungstest über den direkten Nachweis von HCV-RNA (Sarrazin et al., 2020). Die HCV-RNA ist bereits 2 Wochen nach der Infektion nachweisbar. Einige

¹ Gender Hinweis: In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

Zeit später (ca. 6 Wochen) sind im Rahmen der Serokonversion Antikörper in nachweisbaren Mengen im Serum des Patienten zu finden. Der Antikörpertest ist bei einer akuten, chronischen und abgeheilten Infektion positiv. Der direkte Virusnachweis über RT-qPCR liefert den Nachweis für eine aktuelle Infektion, den Genotyp und die Viruslast (Gretch, 1997; Webster et al., 2015). Sollte der Antikörpertest positiv und der HCV-RNA Test negativ ausfallen, spricht dieses für eine ausgeheilte Infektion mit der Einschränkung, dass die Viruslast bei einer aktuellen Infektion auch intermittierend unter der Nachweisgrenze liegen kann. Des Weiteren sind falsch negative Ergebnisse des Antikörpertests gehäuft bei immunsupprimierten Patienten beschrieben (De Almeida Pondé, 2013). Eine weitere Methode zum Nachweis einer HCV-Infektion ist der Nachweis des Core Antigens. Diese Nachweismethode ist mit seiner sehr hohen Spezifität vergleichbar mit der HCV-RNA-Detektion und in frühen Krankheitsstadien von Nutzen (Ross et al., 2010). Für eine sichere Diagnose müssen immer die Symptome des Patienten, die Serologie und die weitere Diagnostik, wie die Klinische Chemie, im Gesamtbild betrachtet werden.

1.1.4 Therapie

Eine Therapieindikation besteht für alle replikativen HCV-Infektionen (nachweisbare HCV-RNA). Die Indikation ist auch ohne einen Transaminasenanstieg und unabhängig vom Nachweis einer Leberfibrose gegeben. Bei einer akuten HCV-Infektion kann in Ausnahmefällen bei einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine spontane Elimination und einem geringen Risiko für die Übertragung des Virus eine mögliche Spontanheilung in den ersten 4 Wochen abgewartet werden (Sarrazin et al., 2020). Die Therapie der chronischen Hepatitis C sollte nach Möglichkeit Interferon-frei unter der Anwendung von direkt antiviral wirkenden Substanzen (*direct acting antivirals*, DAA) und ohne Ribavirin erfolgen. Die Therapieregime unterscheiden sich hierbei zwischen den Genotypen, sehen aber meistens den Einsatz von Sofosbuvir in Kombination mit Ledipasvir oder Velpatasvir vor (Manns et al., 2017). Eine Ausheilung der Erkrankung wurde als die Abwesenheit von HCV RNA 12 Wochen nach Ende der Therapie, kurz SVR (*engl. sustained virologic response*), definiert (Falade-Nwulia et al., 2017).

Sofosbuvir ist ein Polymerase Nukleotid Inhibitor (NI), der als Uridin-Analogon, unabhängig vom Genotyp, die virale NS5B-Polymerase hemmt, da sein Einbau in die HCV RNA zur Termination der Replikation führt. Ledipasvir ist ein Inhibitor des NS5A-Phosphoproteins, der nahe dem N-Terminus von Domäne 1 bindet, ohne die Stabilität des Proteins zu beeinflussen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Ledipasvir

die Bildung von Doppel-Membran-Vesikeln (DMV) hemmt. Velpatasvir ist ein NS5A Inhibitor der zweiten Generation mit einem breiteren Wirkspektrum und geringerer Toxizität (Alazard-Dany et al., 2019).

1.2 Aufbau von HCV

Die Größe eines HCV-Partikels liegt bei ca. 30 – 60 nm (He et al., 1987). Das HCV-Genom wird von einer Lipiddoppelschicht zellulären Ursprungs umhüllt. In diese Membran sind die Glykoproteine E1 und E2 eingebettet (Abbildung 1-1). Innerhalb dieser Hülle befindet sich das Nukleokapsid, bestehend aus dem Core-Protein, welches das positiv orientierte einzelsträngige RNA-Genom enthält (Lindenbach & Rice, 2013). Das behüllte Virus hat im Serum eine verhältnismäßig geringe maximale Dichte von ca. 1,17 g/ml (Hijikata et al., 1993). Der Grund dafür ist eine Assoziation mit Komponenten der beta-Lipoproteine wie beispielsweise ApoE und ApoB (Diaz et al., 2006; Thomssen et al., 1992). Das im Zuge dieser Assoziation gebildete Hybrid-Partikel im Serum wird als Lipoviropartikel (LVP) bezeichnet (Wrensch et al., 2018). Diese Eigenschaft des Virus hat eine Bedeutung für den Eintrittsmechanismus in den Hepatozyten, aber auch für die Abwehr gegen eine Neutralisierung durch Antikörper (Lindenbach & Rice, 2013).

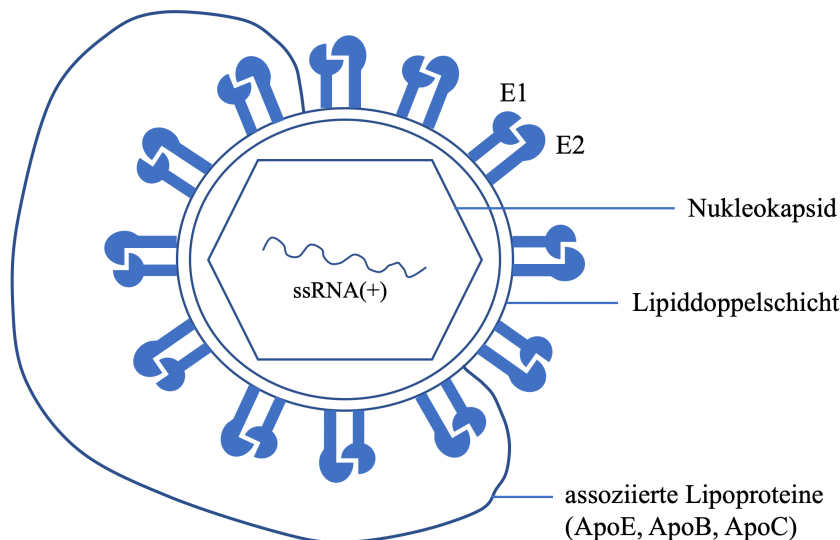


Abbildung 1-1: Aufbau des HCV als LVP.

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Hepatitis-C-Virus (HCV), mit den im Serum assoziierten Lipoproteinen, in Form eines Lipoviropartikel (LVP). Das Virus besitzt eine Hülle aus einer **Lipiddoppelschicht**, in die die Glykoproteine E1 und E2 als Heterodimere eingebettet sind (**E1**, **E2**). Innerhalb der Hülle befindet sich das **Nukleokapsid**, welches aus dem Core-Protein aufgebaut ist. Das Nukleokapsid beinhaltet die positiv polarisierte Einzelstrang-RNA (**ssRNA(+)**) des HCV. Die assoziierten Apolipoproteine (**ApoE**, **ApoB**, **ApoC**) variieren zwischen den Genotypen und sind hier beispielhaft dargestellt.

Quelle: Eigene Darstellung.

Das RNA-Genom des Virus hat eine Länge von 9.600 Nukleotiden und besteht grundlegend aus einem offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende von einer nicht-codierenden Region (*untranslated region*, 5'UTR, 3'UTR) flankiert wird. Der ca. 9033 Nukleotide lange ORF codiert zum einen die strukturbildenden Proteine Core, E1 und E2, und zum anderen die nicht-strukturbildenden Proteine p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B. Das Translationsprodukt des ORF ist zunächst ein Polyprotein, welches co- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in kleinere funktionale Proteine prozessiert wird. Dabei werden die strukturbildenden Proteine von der Signal-Peptidase des Endoplasmatischen Retikulums und die nicht-strukturbildenden Proteine von der NS3 Protease und zwischen NS2/3 autokatalytisch geschnitten (Moradpour & Penin, 2013). Eine grobe Übersicht über die Funktionen der einzelnen Proteine ist Tabelle 1-1 und Tabelle 1-2 zu entnehmen.

Tabelle 1-1: Funktion der strukturbildenden Proteine

Protein	Funktion
Core	Dieses Protein bildet das Nukleokapsid.
E1	Glykoprotein der Hülle mit Aufgaben während des Entry, der Fusion mit dem ER und dem Assembly. Es bildet ein Heterodimer mit E2.
E2	Glykoprotein der Hülle mit Aufgaben während des Entry, der Fusion mit dem ER und dem Assembly. Es bildet ein Heterodimer mit E1.

Tabelle erstellt nach den Inhalten aus (Moradpour & Penin, 2013)

Tabelle 1-2: Funktion der nicht strukturbildenden Proteine

Protein	Funktion
p7	Viroporin, dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist. Es spielt eine Rolle beim Assembly und Release.
NS2	Membran-assoziierte dimere Cystein-Protease, schneidet an der NS2/NS3-Bindungsstelle des Vorläufer-Polyproteins.
NS3	Serin-Protease und NTPase/RNA-Helikase. Sie bildet einen nicht-kovalenten Komplex mit NS4A.
NS4A	Kofaktor von NS3.
NS4B	Formt das Membraneous Web, kann RNA binden und spielt eine Rolle im Assembly.
NS5A	Serin-Phosphoprotein, das RNA binden kann, die RNA-Replikation moduliert und eine Rolle beim Assembly spielt.
NS5B	RNA-abhängige RNA-Polymerase.

Tabelle erstellt nach den Inhalten aus (Moradpour & Penin, 2013)

1.3 HCV Replikationszyklus

Dieses Kapitel soll einen groben Überblick über den Replikationszyklus des HCV geben. Die LVP werden mit dem Blutstrom zur Leber transportiert. In den hepatischen Sinusoiden treten sie durch das fenestrierte Endothel in den Disse-Raum über und erlangen somit direkten Kontakt zu den Hepatozyten. Der HCV-Replikationszyklus lässt sich grob in die Schritte Eintritt (“Entry“), Fusion, Freisetzung des Genoms (“Uncoating“), Translation, Replikation, Zusammenbau (“Assembly“) und Freisetzung der Viren (“Release“) gliedern (Catanese & Dorner, 2015). In Abbildung 1-2 ist ein Schema für den groben Überblick über den Ablauf des Replikationszyklus dargestellt, der im Weiteren näher erläutert werden soll.

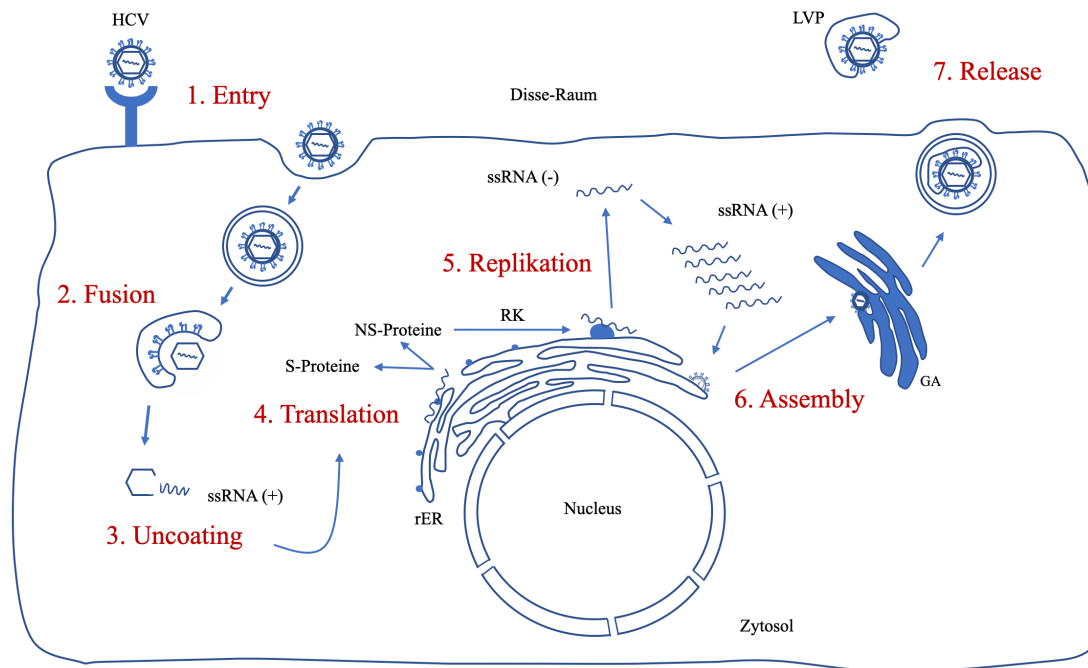


Abbildung 1-2: Replikationszyklus des Hepatitis C Virus.

Die Abbildung zeigt einen groben Überblick über den Replikationszyklus des Hepatitis-C-Virus (**HCV**) im Hepatozyten. Zunächst erfolgt eine Bindung des HCV an die Rezeptoren (HSPG, LDL-Rezeptor, SR-BI) auf der Oberfläche des Hepatozyten im Disse-Raum. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt dann über den Mechanismus der Endozytose (**Entry**). Als nächstes verschmilzt die Lipiddoppelschicht des HCV mit der Wand des Endosoms und das Nukleokapsid wird in das Zytosol freigesetzt (**Fusion**). Es folgt ein **Uncoating**, bei dem die positiv polarisierte Einzelstrang-RNA (**ssRNA (+)**) des HCV in das Zytosol freigesetzt wird. Die Translation erfolgt am rauen Endoplasmatischen Retikulum (**rER**). Dann wird das entstandene Polyprotein aus nicht-strukturbildenden (**NS-Proteine**) und strukturbildenden Proteinen (**S-Proteine**) prozessiert. Die NS-Proteinen bilden auf dem rER einen Replikationskomplex (**RK**), der aus ssRNA (+) negativ polarisierte Einzelstrang-RNA (**ssRNA (-)**) repliziert. Diese ssRNA (-) wird durch den Replikationskomplex zu einer Vielzahl von ssRNA (+) für den Assembly-Schritt repliziert. Die neu gebildete ssRNA (+) wird dann am rER mit den S-Proteinen zu einem vollständigen Lipoviropartikel (**LVP**) zusammengesetzt (**Assembly**). Es folgt der Weitertransport zum Golgi-Apparat (**GA**) zur Verpackung in Endosomen und dem **Release** aus der Zelle durch Exozytose als LVP.

Quelle: Eigene Darstellung.

Der Entry beginnt durch das Binden von E1 und E2 und/oder ApoE an die Rezeptoren des Hepatozyten. Als Rezeptoren sind hierbei unter anderem HSPG, LDL-Rezeptor, SR-BI und CD-81 beteiligt. Anschließend führen Rezeptortyrosinkinasen über die Assoziation von CD-81 und Claudin-1 zur Endozytose vom HCV. Die Fusion der Virushülle mit dem Endosom geschieht in frühen Endosomen, da diese den notwendigen pH-Wert aufweisen. Das Nukleokapsid gelangt in das Zytosol und gibt die Plusstrang-RNA frei (Coller et al., 2009; Zeisel et al., 2013). Die Plusstrang-RNA wird nun direkt als Matrize („Template“) für die Translation im Zytosol genutzt, indem der Translationsapparat zur internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) der 5'UTR rekrutiert wird (Niepmann, 2013).

Das durch die Translation entstandene Vorläufer-Polypeptid wird nun zu strukturbildenden und nicht-strukturbildenden Proteinen prozessiert (Kapitel 1.2). Ein Großteil der nicht-strukturbildenden Proteine organisiert nun die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in Anwesenheit von Lipiden zu einem membranösen Netzwerk ("Membraneous Web") um und formt den Replikationskomplex (Gosert et al., 2003). Der Replikationskomplex synthetisiert auf der Plusstrang-RNA die komplementäre Minusstrang-RNA. Im weiteren Zeitverlauf wird von dieser Minusstrang-RNA eine Vielzahl (ca. 10-fach) an Plusstrang-RNA-Kopien repliziert (Lohmann, 2013). Dieser Mechanismus hilft dem Virus bei der Regulation der Replikation, da eine hohe RNA-Synthese-Aktivität einen negativen Einfluss auf die Translation hat und die angeborene Immunabwehr aktivieren kann (Tabata et al., 2020). Weitere Details zum Ablauf der Replikation sind dem Kapitel 1.5 zu entnehmen. Sowohl Translation als auch Replikation werden durch eine Vielzahl von RNA-RNA-Interaktionen reguliert (Abbildung 1-3). Ein weiterer Regulationsfaktor ist die leberspezifische microRNA-122, welche durch ihre vielen Bindungsstellen an der HCV-RNA (Abbildung 1-3) unterschiedliche Funktionen in der Stabilisation der RNA und Regulation von Translation und Replikation übernimmt. Eine davon ist zum Beispiel die Bindung an die 5'UTR, was zum Schutz der RNA gegen den Abbau durch zelluläre Nukleasen führt (Niepmann et al., 2018; Niepmann & Gerresheim, 2020). Das Assembly des Viruspartikels findet an der Membran des ER statt. Die Membran des ER bietet, in Assoziation mit Lipidtropfen auf der Seite des Zytoplasmas und Lumens, eine Plattform für den Aufbau des Viruspartikels aus seinen Strukturproteinen und dem Beladen mit der Plusstrang-RNA (Bartenschlager et al., 2011). Anschließend wird das Viruspartikel vom ER in den Golgi-Apparat transportiert, um dort in ein Endosom verpackt VAMP1-abhängig seinen Austritt aus dem Hepatozyten zu finden (Coller et al., 2012).

1.4 HCV-Replikonsystem in der Zellkultur

Es wurde zwar frühzeitig ein cDNA-Klon entwickelt, dessen *in vitro*-Transkript in der Lage war Schimpansen zu infizieren, allerdings war es nicht in der Lage, in einer Zellkultur effizient zu replizieren (Kolykhalov et al., 1997; Rice, 2011). Es begann die Suche nach einem funktionierenden System für die Zellkultur. Der erste Durchbruch war der Entwurf eines subgenomischen HCV-Replikons auf Grundlage eines modifizierten HCV Genotyp 1b. Es enthielt alle für eine Replikation relevanten Gene und einen

Neomycin-Antibiotika-Resistenz-Marker und konnte in der Zelllinie Huh-7 mit geringer Effizienz replizieren (Lohmann et al., 1999). Danach wurde herausgefunden, dass bestimmte Spontanmutationen der RNA zu einer höheren Effizienz führten, aber keine infektiösen Viruspartikel produziert wurden (Lohmann et al., 2001). Es folgte die Etablierung eines Replikons auf Grundlage des Genotyp 2a, der von einem japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis gewonnen und JFH1 genannt wurde. Dieses Replikon konnte nun ohne Spontanmutationen in Huh-7 Zellen effizient replizieren (Kato et al., 2003). Außerdem wurde herausgefunden, dass Huh-7 Zellen, die mit Interferon-alpha behandelt wurden, eine noch bessere Effizienz aufweisen (Blight et al., 2002). Der Grund dafür liegt in einer Punktmutation im RIG-I Gen (engl.: *retinoic acid inducible gene 1*), wodurch der Interferon-Signalweg gestört ist und es zu einer besseren Ausbreitung des Virus kommt (Sumpter et al., 2005). Die Zelllinie mit diesen Eigenschaften wird Huh-7.5 bezeichnet. Ein großer Fortschritt wurde gemacht als von mehreren Arbeitsgruppen ein rekombinantes HCV-Replikon veröffentlicht wurde, welches in Huh-7.5 Zellen effizient replizieren und infektiöse Viren bilden konnte (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005; Zhong et al., 2005). Für diese Rekombination wurde von JFH1 die NS3 - NS5B Region verwendet und mit der Core - NS2 Region von Genotyp 2a Isolat J6 kombiniert. Daraus ergab sich ein chimärer Klon (JC1) mit einer Genotyp-Schnittstelle innerhalb des NS2-Gen (Pietschmann et al., 2006). Fortan wurde für alle Genotypen ein Replikon entwickelt, welches die strukturbildenden Regionen des Genotyps und die nicht-strukturbildenden Regionen von JFH1 beinhaltet (Gottwein et al., 2009). Diese Replikonsysteme sind heute ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der Mechanismen von HCV.

1.5 Replikation

Die Replikation ist ein Schlüsselpunkt in der Vermehrung des Virus in der Leber. Die Replikation benötigt viele Komponenten, um zu funktionieren. Ein Großteil davon wird durch die Translation der HCV-RNA und das anschließende Prozessieren des Vorläufer-Polyproteins hergestellt. Das NS4B Protein induziert zu Beginn der Replikation die Bildung eines Membraneous Web, welches als eine Vielzahl von ER-Einstülpungen in Assoziation mit weiteren Vesikeln den Ort der Replikation darstellt (Egger et al., 2002; Paul et al., 2011). Die RNA gelangt über eine kleine Öffnung der Einstülpung auf der Seite des Zytosols zum Replikationsort, und die notwendigen Enzyme NS3 bis NS5B sind in der Membran verankert und bilden den Replikationskomplex (Lohmann, 2013).

Innerhalb dieses Replikationsortes ist die Replikation gegen Proteasen und Nukleasen geschützt (Aizaki et al., 2004; El-Hage & Luo, 2003; Shi et al., 2003). Diese Annahmen wurden durch die Entdeckung von Doppel-Membran-Vesikeln (DMV), die in direkter Assoziation mit Proteinen des Replikationskomplexes stehen, erweitert. Es wurde nachgewiesen, dass die Vesikel sowohl die Proteine des Replikationskomplexes als auch die RNA selber beinhalten (Ferraris et al., 2010). Das Membraneous Web scheint folglich sowohl aus ER-Ausstülpungen als auch aus Einzel- und Doppel-Membran-Vesikeln (SMV, *engl. single membrane vesicle*) zu bestehen. Die Formation von SMVs wird hierbei durch die NS4B angeregt und die Formation der DMVs durch die NS5A (Romero-Brey et al., 2012). Diese Arten von Membranformationen wurden auch bei anderen Viren, wie den Picornaviren, Noroviren und Coronaviren, nachgewiesen (Wolff et al., 2020). Der genaue Mechanismus der Membranveränderungen in der infizierten Zelle ist noch nicht abschließend geklärt.

Nach der Bildung des Replikationskomplexes übernimmt NS5B als Schlüsselenzym die Replikation der RNA. NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, deren katalytische Domäne vom N-Terminus und deren Membrananker vom C-Terminus gebildet wird. Die Polymerase besitzt *in vitro* die Fähigkeit zur *copy back*, *de novo* und primer-abhängigen RNA-Synthese. Als Kofaktoren werden hierbei lediglich die zweiwertigen Ionen Magnesium oder Mangan benötigt (Moradpour & Penin, 2013). Die Initiation der *de novo*-Synthese startet durch das Binden von zwei Nukleotiden am 3'-Ende zur Synthese von Dinukleotid-Primern. Dieser Schritt benötigt eine hohe Konzentration an Nukleotiden (Ferrari et al., 2008). Die Dinukleotid-Primer lösen sich noch leicht vom NS5B/Template-Komplex und sind im Überschuss vorhanden (Lohmann, 2013). In einem zweiten Schritt wird das dritte Nukleotid gebunden, wofür eine hohe Konzentration an Guanosintriphosphat (GTP) und eine Konformationsänderung der Polymerase notwendig ist. Danach erlaubt die Konformation der Polymerase die Elongation und Synthese der Minusstrang-RNA (Harrus et al., 2010).

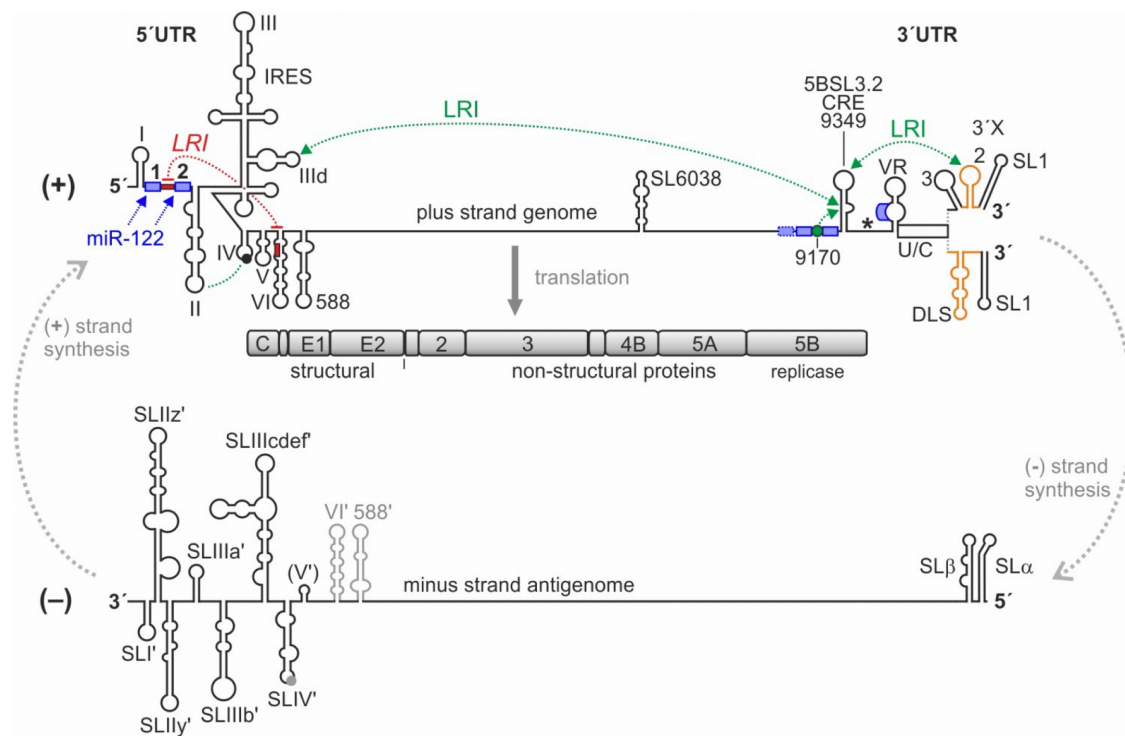


Abbildung 1-3: HCV RNA Genom Replikation.

Die Abbildung zeigt das HCV (+) Strang Genom (engl. **plus strand genome**) mit seinen komplexen Sekundärstrukturen in den nicht-translatierten 5'- und 3'-Regionen (UTRs). Beginn und Ende der Polyprotein-codierenden-Region wird mit einem Startcodon (**schwarzer Kreis**) und einem Stoppcodon (**Sternchen**) gekennzeichnet. Das Polyprotein wird durch co- und posttranslationale Modifikationen zu strukturbildenden (engl. **structural**) und nicht strukturbildenden Proteinen (engl. **non-structural proteins**) prozessiert. Des Weiteren werden in dieser Abbildung die fördernden (**grüne Pfeile**) und inhibierenden (**rote Pfeile**) RNA-RNA-Interaktionen (**LRI**, engl. long-range-interactions) und Bindungsstellen (**blaue Rechtecke**) für die leberspezifische microRNA-122 (**miR-122**) dargestellt. Das HCV Genom wird repliziert durch die Synthese eines Minusstrangs (engl. **minus strand antigenome**), der wiederum als Vorlage für die Synthese einer Vielzahl von Plussträngen dient. **IRES**, engl. internal ribosome entry site; **SL**, engl. Stem-Loop; **CRE**, engl. cis-replication element; **U/C**, ploy(U/C)-Trakt; **VR**, variable Region; **DLS**, engl. dimerization linkage sequenz.

Die Abbildung stammt mit freundlicher Genehmigung von Michael Niepmann. Quelle: Niepmann et al., 2018.

Der Minusstrang bietet ein gutes Template für die *de novo*-Synthese, wohingegen das 3'-Ende des Plusstrang-Genoms für die Initiation der Minusstrangsynthese unpassend erscheint (Tabata et al., 2020). Die 3'UTR besteht grundlegend aus drei Domänen, der variablen Region (VR), dem poly-(U/UC)-Trakt und dem so genannten 3'X-Schwanz, welcher aus den drei Stammschleifen (SL, engl. *stem-loops*) SL 1, SL 2 und SL 3 besteht (Abbildung 1-3). Während die VR nur einen Einfluss auf die Effizienz der Replikation zu haben scheint, sind der poly-(U/UC)-Trakt und der 3'X-Schwanz essentiell für die Replikation (Yi & Lemon, 2003). Der poly-(U/UC)-Trakt liefert vermutlich eine relevante Bindungsstelle für virale und zelluläre Proteine. Vor allem der

Uridin-Homopolymer-Abschnitt ist essentiell für die Replikation (You & Rice, 2008). Des Weiteren wurde in der NS5B-codierenden Region ein *cis*-regulatorisches Element (CRE) entdeckt, der Stem-Loop SL 5B3.2. Dieser Stem-Loop kann eine „*kissing loop interaction*“ mit dem Stem-Loop SL 2 des X-Schwanzes bilden, was eine für die Replikation essentielle Interaktion darstellt (Abbildung 1-3, Niepmann et al., 2018). Das CRE SL 5B3.2 kann außerdem einen Pseudoknoten („*pseudoknot*“) mit dem Bereich um Nukleotid 9.110 bilden, was die Replikation negativ beeinflusst, da sich so die *kissing loop interaction* nicht mehr ausbilden kann. Aufgrund dessen wird vermutet, dass dieses CRE einen Einfluss auf den Wechsel von Translation zu Replikation hat (Tuplin et al., 2012). Der genaue Mechanismus der Initiation der Minusstrangsynthese ist bislang unbekannt und muss weiter untersucht werden. Es ist für die weitere Analyse der Funktionen einzelner Replikationselemente von Bedeutung, ob ein Element seine Funktion auf dem Plusstrang oder auf dem Minusstrang ausübt. In den aktuell verwendeten Replikon-Systemen sind stets beide Genomende vorhanden, weshalb für Untersuchungen, mit dem Ziel dieses zu unterscheiden, eine Methode mit spezifischem Fokus auf die Minusstranginitiation notwendig ist (Niepmann et al., 2018).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der WHO zur globalen Eliminierung von HCV stellt trotz der DAAs weiterhin eine Herausforderung dar. Ein wirksamer Impfstoff konnte bislang nicht etabliert werden und bedarf eines genaueren Verständnisses der molekularen Mechanismen der Entwicklung des Virus. Ein hilfreiches Werkzeug zur Erforschung dieser Mechanismen ist die Entkopplung der Minusstrangsynthese von der Plusstrangsynthese und Translation. Damit hätte man die Möglichkeit, die speziellen Voraussetzungen für die Minusstrangsynthese in Hinsicht auf regulatorische *cis*-Elemente herauszufinden. Dadurch könnten wiederum neue Therapieziele für Medikamente gefunden werden. In einer Arbeit von L. Shalamova wurde ein Minusstrang-Replikationssystem entwickelt, bei dem das Replikon über eine artifizielle Stammschleife (*hairpin*) am 5'-Ende, eine reverse komplementäre Spinach Aptamer Sequenz, eine Encephalomyocarditis Virus (EMCV) IRES und die Gene der nicht-strukturbildenden Proteine NS3 – NS5B verfügt (Shalamova, 2018).

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun, die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeit zu verifizieren und den Hintergrund (ca. 10 - 20 % des Hauptsignals), den die neu etablierte Methode in der qPCR verursacht, durch eine Optimierung der Protokolle zu beseitigen.

Zunächst galt es Überlegungen anzustellen, warum es zu diesem Hintergrund kommt. Eine Vermutung ist, dass sich die HCV-RNA am Ende zurückfaltet (*copy back*) und es infolge von *selfpriming* und fortlaufender Transkription durch die verwendete Polymerase zur Bildung von artifiziellen Minussträngen kommt, die dann in der qPCR detektiert werden. Der Ablauf dieses Mechanismus ist in der Abbildung 1-4 dargestellt. Dieser ist sowohl bei der *in vitro*-Transkription als auch bei der Reversen Transkription (RT) denkbar.

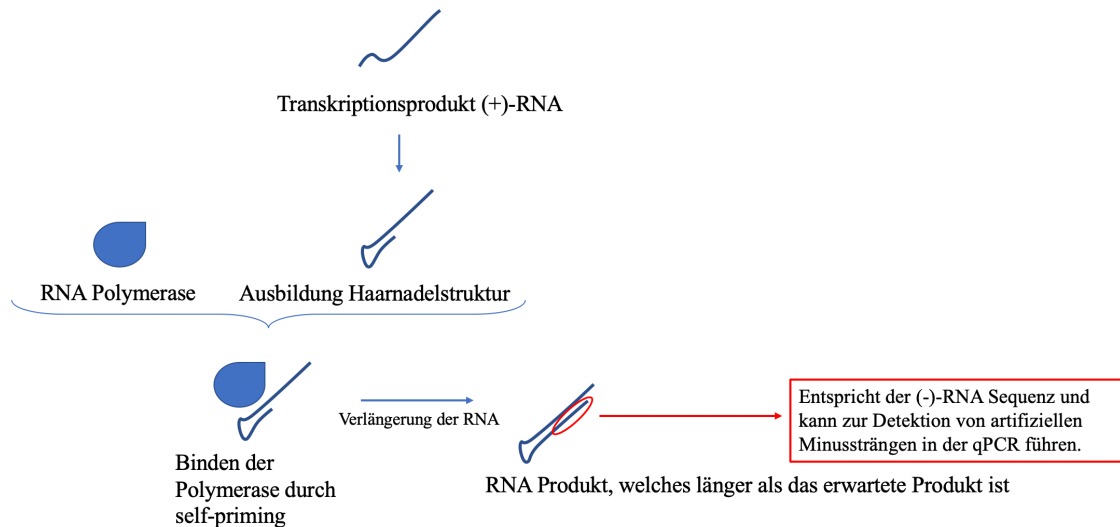


Abbildung 1-4: Schema des copy back-Mechanismus.

Die Abbildung zeigt ein Schema des als ursächlich vermuteten Mechanismus. Das Transkriptionsprodukt ((+)-RNA) bildet dabei eine Haarnadelstruktur aus, die von der RNA Polymerase als Primer genutzt wird. Durch die Verlängerung des RNA Produktes entsteht eine Sequenz (**rotes Oval**), die dem Minusstrang entspricht und im Rahmen einer qPCR als Hintergrundsignal detektiert werden könnte (**roter Kasten**).

Abbildung erstellt nach Inhalten aus Gholamalipour et al., 2018.

Eine weitere Vermutung sieht das Problem in einem unvollständigen DNA-Verdau, wodurch es sowohl zum Verbleib nicht verdauter DNA in der Lösung sowie zur Entstehung kleiner DNA-Oligonukleotide kommt, die entweder in der RT-qPCR mitdetektiert werden oder in der RT-Reaktion als Primer für die Transkription artifizieller Minusstränge sorgen. Aufgrund dieser Vermutungen galt es das Arbeitsprotokoll in Hinsicht auf die Prävention dieser Probleme zu modifizieren und anzupassen. Nach dem Erlernen des von L. Shalamova etablierten Protokolls wurden verschiedenste Modifikationen *in vitro* ausgetestet. Am Ende der Arbeit sollten die Modifikationen in der Zellkultur mit einer Transfektion im 72 h Zeitverlauf ausprobiert und evaluiert werden.

Für die Experimente in der Zellkultur wurden 7 HCV-Replikationskonstrukte verwendet. Das Konstrukt hp_wt besitzt einen artifiziellen Stem-Loop mit einer GC-reichen Sequenz

am 5'-Ende, um die RNA weitgehend gegen den Abbau durch Nukleasen zu schützen. Das Konstrukt I-II_wt besitzt zusätzlich die HCV Wildtyp-Sequenzen SL I und SL II. Das Konstrukt I-III_wt besitzt zusätzlich zu den Sequenzen von I-II_wt die HCV Wildtyp-Sequenz SL III. Das Konstrukt 5'UTR_wt besitzt zusätzlich zu den Sequenzen von I-III_wt eine 36 Nukleotid lange *in-frame* HCV core-codierende Teilsequenz gefolgt von einem UGA-Stoppodon. Das Konstrukt Core_wt besitzt statt der kurzen core-codierenden Sequenz von 5'UTR_wt die vollständige core-codierende HCV Sequenz. Die Konstrukte hp_GND und I-III_GND sind Plasmidvarianten von hp_wt und I-III_wt mit einer GND-Mutation innerhalb des NS5B-Gens, wodurch die Polymerase nicht zur Replikation fähig ist (die Aminosäuren GDD werden zu GND im katalytischen Zentrum der Polymerase) (Lohmann et al., 1997). Die genaue Beschreibung der Plasmide ist den Plasmidkarten im Anhang zu entnehmen (Kapitel 11.1).

Die RT-qPCR dient in dieser Arbeit der Detektion der Strang-Abundanzen. Plusstränge wurden mithilfe von Primern amplifiziert, die an die Sequenz der EMCV-IRES binden und neu synthetisierte Minusstränge mithilfe von Primern, die an die Spinach-Region des Minusstranges binden.

1.7 Fragestellung

Vor dem in Kapitel 1.6 beschriebenen Problemhintergrund hat die vorliegende Arbeit das folgende Ziel. Es soll geklärt werden, wodurch das Hintergrundsignal in dem von L. Shalimova etablierten Protokoll verursacht wird und wie dieses Problem zu beheben ist. Hierzu wurden nach Prüfung des Protokolls folgende Hypothesen aufgestellt:

1. In der *in vitro*-Transkription des DNA-Plasmid entstehen artifizielle Minusstränge durch ein Rückfalten des 3'-Endes und Selfpriming mit fortlaufender Transkription.
2. In der Reversen Transkriptions-Reaktion mit der HCV RNA entstehen artifizielle DNA-Minusstränge (unabhängig vom eingesetzten RT-Primer) durch ein Rückfalten des 3'-Endes der Template-RNA und Selfpriming mit fortlaufender Transkription. Ein solches Selfpriming ist insbesondere deswegen zu befürchten, weil das authentische HCV-RNA 3'-Ende selbst einen starken Stem-Loop ausbildet, der am 3'-Ende der transfizierten Plusstrang-RNA eine effiziente Primer-Template-Kombination für die reverse Transkriptase anbietet.
3. Ein unvollständiger DNase-Verdau führt zur Bildung von kürzeren DNA-Stücken, die aber noch lang genug sind, um in der qPCR als Hintergrund detektiert zu werden.
4. Ein unvollständiger DNase-Verdau führt zur Bildung von kurzen DNA-Oligonucleotiden, die an die RNA hybridisieren können und dann in der RT-Reaktion als Primer agieren und somit zur Synthese artifizieller Minusstränge führen.
5. Das Replikationsverhalten der Konstrukte ändert sich durch das Einfügen bzw. Weglassen der unterschiedlichen Stem-Loops der HCV 5'UTR.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2-1: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Chromatographie Papier 3MM (Whatman)	VWR
Petrischalen	Sarstedt
Phase Lock Gel Heavy	Quantabio
Phasemaker™ Tubes	Invitrogen
Pipettenspitzen (0,5 µl – 1250 µl)	Sarstedt
PVDF Membran, Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore
Reaktionsgefäße (200 µl – 50 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme, CL-XPosure™ (18 cm x 24 cm)	Thermo Scientific
Serologische Pipetten (5 ml – 50 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² – 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 well, 12 well)	Sarstedt
Zellkulturschalen (9 cm – 15 cm)	Sarstedt

2.1.2 Geräte

Tabelle 2-2: Geräte

Gerät	Hersteller
Avanti JXN-26 Centrifuge mit Rotoren JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter
Bakterien Inkubator Certomat® H	B. Braun
Bi-Destille, Destamat	Heraeus
Blotapparatur, Fastblot B43/44	Biometra
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Biorad
ChemiDoc™ Imaging System	Biorad
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder GmbH

Digitales pH-Meter 644	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Duomax 1030	Heidolph Instruments
Elektrophorese Netzteil, PowerPac™ Basic Power Supply	Biorad
Elektrophoresesystem Horizontal, Owl™ Easy Cast™ B1A	Thermo Scientific
Geldokumentationssystem, Gel Doc XR	Biorad
Heiz-Magnetrührer US 152	Stuart
Heizblock, AccuBlock™	Labnet
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Laborwaage	Sartorius
LED Blue Light Transilluminator	Syngene
Magna Rack™	Invitrogen
Mikroskop Leica DM IL invers	Leica Microsysteme
Mikrowelle, 700 W	Severin
Ministar, silverline, PCR-Tube Centrifuge	VWR
Mixing Block MB-102	Bioer
Neubauer improved Zählkammer (0,1mm Tiefe)	Superior Marienfeld
Pipetboy	Integra
Pipetten (2 µl – 1000 µl)	Gilson
PlateFuge, Microplate Microcentrifuge	Benchmark Scientific
Platteninkubator B15	Thermo Scientific
Qubit® 2 Fluorometer	Invitrogen
Schütteltisch, Kreisschüttler 3017	GFL
Sterilbank, Lamina Air HA 2448 BS	Heraeus
Thermocycler T1	Biometra
Thermocycler TProfessional	Biometra
Tischzentrifuge, Centrifuge 5424	Eppendorf
Vortex Genie 2™	Bender & Hoben
Wasserbad julabo	Julabo

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roti®garose	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 %, p.a., ACS	Carl Roth
APS	
Borsäure $\geq 99,8$ %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth
Bromphenolblau	Fluka Chemie
Calciumchlorid ≥ 98 %, getrocknet, Pulver	Carl Roth
Chloroform ROTI®SOLV, HPLC Stab. mit 1 Vol. % Ethanol	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
CutSmart Buffer (10 x)	NEB
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Carl Roth
DTT, High Purity	Gerbu
EDTA ≥ 99 %, p.a., ACS	Carl Roth
Essigsäure ROTIPURAN® $\geq 95,9$ %, p.a.	Carl Roth
Ethanol 96 %, Ph.Eur., reinst.	Carl Roth
Ethanol ROTIPURAN® $\geq 99,8$ %, p.a.	Carl Roth
Ethanol vergällt, $\geq 99,6$ %	Carl Roth
Ethidiumbromid Solution 10 mg/ml	Sigma-Aldrich
FBS Qualified, Fetal Bovine Serum	Life Technologies
Formamid	Merck
Glycerin Rotipuran® $\geq 99,5$ %, p.a., wasserfrei	Carl Roth
Glycin PUFFERAN® ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth
GlycoBlue™ Coprecipitant	Invitrogen
Isopropanol $\geq 99,5$ %, zur Synthese	Carl Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie
Lipofectamine® 2000	Invitrogen
Lithium Chloride Precipitation Soln.	Invitrogen
Mangan-(II)-chlorid-Tetrahydrat, ACS	Merck
Methanol ROTISOLV® HPLC Gradient	Carl Roth

Material und Methoden

MgCl ₂ Solution 25 mM	NEB
Milchpulver	EDEKA
MOPS PUFFERAN® ≥ 99 %	Carl Roth
Natriumacetat, 99 %, p.a., ACS, wasserfrei	Carl Roth
Natriumazid reinst	Serva
Natriumchlorid ≥ 99 %, Ph.Eur., USP	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Pen Strep, Penicillin Streptomycin	Life Technologies
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Carl Roth
Roti®-CELL 10 x PBS	Carl Roth
Roti®-CELL 10 x PBS CELLPURE steril	Carl Roth
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth
Rubidiumchlorid ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth
Salzsäure rauchend 37 %	Fluka Chemie
SDS/Natriumlaurylsulfat ≥ 99 %	Carl Roth
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Biorad
Streptavidin Magnetic Beads	NEB
SYBR™ Gold Nucleid Acid Gel Stain	Invitrogen
TEMED 99 %, p.a.	Carl Roth
Tri – Natriumcitrat – Dihydrat ≥ 99%, p.a., ACS	Carl Roth
Tris	Roche Diagnostics GmbH
Triton X 100 reinst	Carl Roth
TRIZOL® Reagent	Ambion
Trypsin-EDTA 0,5 % (10 x)	Gibco
Trypsin-EDTA 0,5 % (10 x)	Life Technologies
Tween® 20, Sigma Ultra	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Carl Roth
β-Mercaptoethanol, 99 %, p.a.	Carl Roth

2.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 2-4: Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung /Endkonzentration	Ansatz
Blocklösung	7,5 % Milchpulver 1 x PBS	<u>Für 150 ml:</u> 11,25 g 150 ml
DNA-Probenpuffer	75 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 8) Bromphenolblau Xylencyanol ddH ₂ O	<u>Für 20 ml:</u> 15 ml (100 %) 2 ml (0,5 M) einige Körner einige Körner auf 20 ml auffüllen
DTT 1 M	1 M DTT ddH ₂ O	<u>Für 10 ml:</u> 1,5 g auf 10 ml auffüllen
EDTA 0,5 M	0,5 M EDTA ddH ₂ O	<u>Für 100 ml:</u> 14,61 g auf 100 ml auffüllen
Natriumacetat 3 M	3 M Natriumacetat ddH ₂ O	<u>Für 50 ml:</u> 20,41 g auf 50 ml auffüllen
Natriumchlorid 0,5 M	0,5 M Natriumchlorid ddH ₂ O	<u>Für 100 ml:</u> 10,16 g auf 100 ml auffüllen
PBS 1 x	10 x PBS ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 100 ml auf 1 l auffüllen
PBS-T	1 x PBS 0,5 % Tween® 20	<u>Für 100 ml:</u> 99,5 ml 0,5 ml
PPPC (2 x)	100 mM Tris HCl pH 6,8	<u>Für 50 ml:</u> 5 ml (1 M)

	24 % Glycerin 8 % SDS 2 % β -Mercaptoethanol 0,02 % Coomassie Blau ddH ₂ O	12 ml (100 %) 4 g 0,01 g 1 ml (100 %) auf 50 ml auffüllen
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 10 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 7,5) Bromphenolblau Xylencyanol	<u>Für 20 ml:</u> 16 ml 2 ml 2 ml (0,5 M) einige Körner einige Körner
SDS-Laufpuffer (10 x)	0,1 % SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 10 g 30 g 144 g auf 1 l auffüllen
SSC Puffer (20 x)	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat H ₂ O HCl H ₂ O	<u>Für 1:</u> 175,3 g 88,2 g auf 800 ml auffüllen auf pH 7 einstellen auf 1 l auffüllen Autoklavieren!
Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 5,8 g 2,9 g 3,7 ml (10 %) 200 ml (100%) auf 1 l auffüllen
Transformations-Puffer 1	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂	<u>Für 400 ml:</u> 1,18 g 0,59 g 3,96 g

	100 mM RbCl ₂ 15% Glycerol Essigsäure ddH ₂ O	4,84 g 60 ml pH 5,8 einstellen auf 400 ml auffüllen Sterilfiltrieren!
Transformations-Puffer 2	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % Glycerol KOH ddH ₂ O	<u>Für 100 ml:</u> 0,21 g 1,1 g 0,12 g 15 ml pH 6,5 einstellen auf 100 ml auffüllen Sterilfiltrieren!
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50 x) (TAE-Puffer)	40 mM Tris 1 mM EDTA (pH 8,0) 20 mM Essigsäure ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 242 g 100 ml (0,5 M) 57,1 ml auf 1 l auffüllen
Tris-Borat-EDTA (10 x) (TBE-Puffer)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 108 g 55 g 40 ml (0,5 M) auf 1 l auffüllen
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) ddH ₂ O	<u>Für 50 ml:</u> 0,5 ml (1 M) 0,1 ml (0,5 M) Auf 50 ml auffüllen
Tris-HCL	1 M Tris HCl ddH ₂ O	<u>Für 1 l:</u> 121,1 g auf pH-Wert einstellen auf 1 l auffüllen
Trizin-Gelpuffer	3 M Tris	<u>Für 500 ml:</u> 181,5 g

	0,3 % SDS HCl ddH ₂ O	15 ml (10 %) auf pH 8,45 einstellen auf 500 ml auffüllen
Western Blot Lysepuffer (10 x)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ 1 % Triton X 100 ddH ₂ O	<u>Für 100 ml:</u> 10 ml (1 M) 8,2 g 0,25 g 10 ml (100 %) auf 100 ml auffüllen

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2-5: Enzyme

Enzym	Quelle
DNase I (RNase-free)	NEB
<i>EcoRI</i> ®-HF	NEB
Hi-T7® RNA Polymerase	NEB
<i>KpnI</i> -HF®	NEB
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Reverse Transkriptase	Quanta Bioscience
RNase Inhibitor, Human Placenta	NEB
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
T7 RNA Polymerase	NEB
TURBO™ DNase (2 U/μl)	Invitrogen

2.1.6 Kit-Systeme

Tabelle 2-6: Kit-Systeme

Kit	Quelle
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific
qScript™ Flex cDNA Kit	Quanta Bioscience

Qubit™ Assay Kits	Thermo Scientific
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit	Thermo Scientific
Zymoclean™ Gel RNA Recovery Kit	Zymo Research

2.1.7 Plasmide

Tabelle 2-7: Plasmide

Plasmid	Plasmidkarte	Quelle
pUC18_P.s_WT_5'UTR_Core_10779	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_5'UTR_sinfr_stop_10242	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_hp_9899	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_hp_GND_9899	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_SL I-II_wt_9968	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_SL I-III_10182	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova
pUC18_P.s_WT_SL I-III_GND_10182	s. Anhang (11.1)	Lyudmila Shalamova

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2-8: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Anti-GAPDH-71.1 Monoclonal Antibody	1:15.000	Sigma-Aldrich
Anti-Hepatitis C Virus NS3 antibody [8 G-2]	1:500	Abcam
Goat-anti-mouse IgG HOR	1:50.000	Life Technologies
Hepatitis C Virus Core Antigen Monoclonal Antibody (C7-50)	1:1.000	Thermo Scientific

2.1.9 Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers bezogen. Eine Ausnahme bilden die Primer LS_Biotin_For und LS_Biotin_Rev, diese wurden von Integrated DNA Technologies hergestellt.

Tabelle 2-9: DNA Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Quelle
Antisense1_SL3_HCV	CTC TCT GCA GAT CAT GTC CC TCGC GTT CTA ACG GG	Jonas Budnik
Antisense2_SL3_HCV	TGC AGA TCA TGT CCC TCG CGT TCT AAC GGG	Jonas Budnik
Blocker_SL3_HCV	CCC GTT AGA ACG CGA GGG ACA TGA TCT GCA GAG AG	Jonas Budnik
EMCV_RT_Variante 1	CCC TTG TTG AAT ACG CTT GAG GA	Anna-Lena Hell
EMCV_plus_qPCR_for	AGA CCC CTA GGA ATG CTC GT	Lyudmila Shalamova
EMCV_plus_qPCR_rev	CCG TCC TTC ACC ATT TCA TT	Lyudmila Shalamova
EMCV_plus_RT	CCC CTT GTT GAA TAC GCT TG	Lyudmila Shalamova
GAPDH_for	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	Lyudmila Shalamova
GAPDH_rev_RT	GAT CTC GCT CCT GGA AGA TG	Lyudmila Shalamova
LS_Biotin_For	/5BiotinTEG/mAmCA TGA TCT GCA GAG AGA CCA GTT ACG GCA C	Michael Niepmann
LS_Biotin_Rev	/5BiotinTEG/GCA TCA GAG CAG ATT GTA CTG AGA GTG CAC C	Michael Niepmann

Spinach_Blocker	+C+GC+TAC AGA CGT TGT TTG TCT TCA AGA AGC TTC C/3Sp9/	Michael Niepmann
Spinach_minus_qPCR_for	GGA ACT GCT TCC TTC ACG AC	Lyudmila Shalamova
Spinach_minus_qPCR_rev	ACC ATA TTG CCG TCT TTT GG	Lyudmila Shalamova
Spinach_minus_RT	CCG TCC TTC ACC ATT TCA TT	Lyudmila Shalamova
Spinach_minus_RT_snap	<u>CTG AAT GAA ATG</u> CCG TCC TTC <u>ACC ATT TCA</u> <u>TTC AG</u> Der unterstrichene Teil formt durch self-priming einen stem loop.	Lyudmila Shalamova

2.1.10 Größen- und Längenstandards

Tabelle 2-10: Größen- und Längenstandards

Standard	Quelle
Hyper Ladder 1 kb	Bioline
Hyper Ladder 25 bp	Bioline
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific

2.1.11 Bakterienstämme

Tabelle 2-11: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	F- <i>mcrA</i> (<i>mrr- hsdRMS- mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 araΔ139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697<i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 2-12: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
Huh-7.5	<p>Humane-Hepatokarzinoma-Zelllinie: Derivat der Huh-7-Zellen, die ursprünglich aus einer humanen Biopsie stammen und bei denen durch Interferon ein HCV-Replikon eliminiert wurde. Adhärente Zelllinie, die sich wohl u.a. aufgrund einer Mutation im RIG-I Gen besonders gut mit HCV infizieren lässt.</p>	Rice Laboratorien, Rockefeller Universität, NY, USA

2.1.13 Kulturmedien

Tabelle 2-13: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Quelle
10 % DMEM	DMEM 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) 1 % Penicillin/Streptomycin	—
Agar-Agar, Kobe I, pulv.	Pulver	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose (DMEM)	D-Glucose (4,5 g/l) L-Glutamine Phenol Rot	Life Technologies
LB-Platten	LB-Medium 2 % Agar pulv. Ampicillin 150 µg/ml	—
Lennox Broth (LB) Medium	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l (Autoklavieren!)	Carl Roth

2.2 Methoden

2.2.1 Überblick

Dieses Kapitel soll eine Übersicht darüber geben, wie ein vollständiger Versuchsablauf der Methoden im Zusammenhang grundsätzlich aussah.

1. Transformation (Kapitel 2.2.7)
2. Isolation einer Einzelkolonie (Kapitel 2.2.8)
3. Ansetzen einer Hauptkultur (Kapitel 2.2.9)
4. Maxiprep (Kapitel 2.2.10)
5. Qubit BR DNA Assay (Kapitel 2.2.11)
6. Doppel-Restriktionsenzym-Verdau (Kapitel 2.2.13)
7. Kontrolle mit Gel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.12)
8. Einfacher-Restriktionsenzym-Verdau (Kapitel 2.2.13)
9. Nukleinsäureextraktion mit Ethanol-fällung (Kapitel 2.2.14)
10. Kontrolle mit Gel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.12)
11. Qubit BR DNA Assay (Kapitel 2.2.11)
12. *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.15)
13. DNase Verdau (Kapitel 2.2.19)
14. Nukleinsäureextraktion mit Ethanol-fällung (Kapitel 2.2.14)
15. Qubit BR RNA Assay (Kapitel 2.2.11)
16. Kontrolle mit Gel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.12)
17. Transfektion (Kapitel 2.2.20)
18. Zelllyse (Kapitel 2.2.21)
19. Totale RNA Extraktion (Kapitel 2.2.22)
20. DNase Verdau (Kapitel 2.2.19)
21. RNA Cleanup and Concentration Kit (Kapitel 2.2.23)
22. Qubit BR RNA Assay (Kapitel 2.2.11)
23. Reverse Transkription (Kapitel 2.2.24)
24. qPCR (Kapitel 2.2.26)

Die einzelnen Methoden werden im Folgenden genauer erklärt.

2.2.2 Auftauen von Zellen

Für den Start einer neuen Zellkultur wurden die Zellen aus ihrem Flüssigstickstofflager geholt und in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml 10 % DMEM versetzt, in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und im Brutschrank

inkubiert. Ein Mediumswechsel erfolgte nach 6 Stunden. Sobald die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 90 % aufwiesen wurden sie in die nächst größere Zellkulturflasche überführt. Nach zweiwöchiger Kultivierung und mehrfachem Passagieren wurden die Zellen dann für Experimente verwendet.

2.2.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie Huh-7.5 verwendet. Diese ist eine adhärent wachsende Zelllinie, welche von der Zelllinie Huh-7.0 abstammt. Die Huh-7.0 Zellen wurden aus einer Leberbiopsie gewonnen und sind eine humane Hepatokarzinoma-Zelllinie. Die Zellen wurden mit einem HCV-Replikon infiziert und anschließend durch eine IFN-alpha Therapie wieder geheilt. Dadurch ist die Zelllinie Huh-7.5 entstanden, welche sich aufgrund einer Mutation im RIG-Gen besonders gut mit HCV infizieren lässt.

Die Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche kultiviert, welche in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit gelagert wurde. Als Kulturmedium kam DMEM, versetzt mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin, zum Einsatz. Die Zellen wurden stets passagiert, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern. Hierzu wurde zunächst das alte Medium abpipettiert, um die Zellen mit 5 ml 1 x PBS zu waschen. Danach wurden die Zellen mit 4 ml 0,5 % Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert und im Brutschrank inkubiert, bis sich die adhärenen Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben. Anschließend wurde das Trypsin mit 6 ml Kulturmedium inaktiviert und die Zellen in einem Verhältnis von wahlweise 1:2 bis 1:10 erneut ausgesät und mit 25 ml Kulturmedium versorgt und wieder im Brutschrank gelagert.

2.2.4 Zellzahlbestimmung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung ist erforderlich, um beim Aussäen der Zellen (Kapitel 2.2.20) bei jedem Experiment möglichst die gleiche Zellzahl zu benutzen. Die Zählkammer besteht aus 3 x 3 Großquadraten mit einer Abmessung von jeweils 1 x 1 mm. Die Eckquadrate der Kammer werden weiter in 16 gleichgroße Kleinquadrate unterteilt. Durch das Auflegen eines Deckglases entsteht ein dreidimensionaler Raum mit einer Kammertiefe von 0,1 mm.

Zur Bestimmung der Zellzahl der Huh-7.5 wurde eine 10 µl Zellsuspension in die Kammer pipettiert. Danach wurde mit einem Mikroskop jeweils die Zellzahl der vier Eckquadrate bestimmt. Die Kleinquadrate dienen hierbei nur als Orientierungshilfe. Aus den

Zellzahlen der vier Eckquadrate wurde dann der Mittelwert gebildet und als Zelldichte in $x * 10^4$ Zellen/ml verwendet, da ein Eckquadrat ein Volumen von 0,1 μ l fasst.

2.2.5 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

In dieser Arbeit wurde die Calciumchlorid-Methode angewandt, um chemisch-kompetente Bakterien herzustellen. Man möchte durch dieses Verfahren die Zellwand permeabel machen, damit die Bakterien die DNA im Rahmen einer Transformation effektiv aufnehmen können. Zu Beginn wurden die bei -40 °C gelagerten *E. coli* TOP 10F['] aufgetaut und dann 150 μ l von diesen in einen Kolben mit 250 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C auf einem Schüttler bis zu einer OD600 von maximal 0,4 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolben zunächst für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C und 4.000 rpm für 10 min zentrifugiert, um diese zu pelletieren. Nun wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 75 ml Transformations-Puffer 1 resuspendiert. Es folgte erneutes Zentrifugieren bei 4 °C und 4.000 rpm für 10 min. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Transformations-Puffer 2 resuspendiert und nach dem Aliquotieren bei -40 °C gelagert.

2.2.6 Kultivierung von Bakterien

Die chemisch-kompetenten Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Das Medium wurde vor der Nutzung mit 3 μ l/ml Ampicillin aus einer Stammlösung (50 mg/ml) versetzt. Die Bakterien, welche im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden, hatten eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum und konnten daher selektiv kultiviert werden. Zur Kultivierung kamen sowohl LB-Agarplatten als auch LB-Flüssigmedium zum Einsatz.

2.2.7 Transformation

Zur Transformation wurde in dieser Arbeit die Hitzeschock-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird eine kalziumreiche Umgebung benötigt, um die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen der Plasmid-DNA und der bakteriellen Zellmembran zu mindern. Durch einen herbeigeführten Temperaturanstieg entstehen Poren in der Zellmembran des Bakteriums, was die Aufnahme von Plasmid-DNA erleichtert.

Zu Beginn wurden 100 ng Plasmid mit 100 μ l chemisch-kompetenten Zellen zusammen in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Außerdem wurde für jedes Plasmid eine Negativ-DNA-Kontrolle aliquotiert, welche kein Plasmid enthält. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock auf einem Heizblock

bei 42 °C für 2 min und schließlich eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurde jedes Reaktionsgefäß mit 1 ml Medium versetzt und weitere 30 min auf einem Heizblock bei 37 °C geschüttelt.

In den nächsten Schritten wurde zum Plattieren der Zellen auf einer LB-Agarplatte stets neben einer Flamme gearbeitet und eine Impföse zum Ausstreichen genutzt. Je Plasmid wurde eine Platte verwendet, die in drei Bereiche unterteilt wurde. In den ersten Teil wurden 100 µl der Probe pipettiert und ausgestrichen. Für den zweiten Teil wurde der Rest der Probe im Reaktionsgefäß bei 8000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann vom Überstand so viel abgenommen, bis noch ein Zehntel des Ausgangsvolumens vorhanden war. Von der konzentrierten Probe wurden dann ebenfalls 100 µl auf die Platte pipettiert und mit einer Impföse ausgestrichen. Für den dritten Teil wurde auch die Negativ-DNA-Kontrolle für 3 min bei 8000 rpm und Raumtemperatur 10-fach konzentriert und dann 50 µl auf der Platte ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten kurz zum Trocknen liegen gelassen und mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation der Platten erfolgte abschließend bei 32 °C über Nacht. Die Inkubation erfolgte hier nur bei 32 °C statt bei 37 °C, da die verwendeten Plasmide recht große Inserts haben und die Bakterien bei starkem Wachstumsdruck (37 °C) dazu neigen würden Deletionen in den Inserts zu selektieren, da sie dann weniger Plasmid-DNA replizieren müssten und so schneller wachsen könnten.

2.2.8 Isolation einer Einzelkolonie und Ansetzen einer Vorkultur

Nach der Transformation wurde aus einer der kultivierten Kolonien eine Kultur angesetzt. Hierzu wurde eine Kolonie unter sterilen Bedingungen mit einem Zahnstocher in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml LB-Flüssigmedium und 150 µg/ml Ampicillin überführt. Die Kultur wurde anschließend für 6 – 8 h bei 33 °C auf einem Schüttler inkubiert.

2.2.9 Ansetzen einer Hauptkultur

Die Hauptkultur dient der weiteren Kultivierung der Bakterien. Für die Hauptkultur wurden 250 µl der Vorkultur in einen Kolben mit 250 ml LB-Medium und 3 µl/ml Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml) gegeben. Der Kolben wurde dann für 12 - 16 h bei 33 °C auf einem Schüttler bis zu einer OD600 von 2 - 3 inkubiert.

2.2.10 Plasmidpräparation

Zur Vervielfältigung der zu untersuchenden Konstrukte eignet sich die Verwendung von Plasmiden und deren präparative Gewinnung aus transformierten Bakterien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „GeneJet Plasmid Maxiprep Kit“ mit dem Protokoll „Plasmid DNA purification using high speed centrifuges“ nach Herstellerangaben (Thermo Scientific) verwendet. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Hierbei werden die kultivierten Bakterien zunächst pelletiert und anschließend in einer Lösung resuspendiert, welche RNase enthält. Es folgt die Lyse der Bakterien mittels einer Lösung aus SDS und Natriumhydroxid. Danach wird das alkalische Lysat durch eine Lösung aus Essigsäure und Kaliumacetat wieder neutralisiert. Dadurch fällt die genomische DNA zusammen mit dem Zelldebris aus und kann von der schneller renaturierenden Plasmid-DNA durch Zentrifugieren getrennt werden, da diese im Überstand verbleibt. Vor dem Zentrifugieren wird die Lösung noch mit Endotoxin Binding Reagent versetzt, um mögliche Endotoxinkontaminationen der Plasmid-DNA zu verhindern. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand durch mehrere Waschschriffe mithilfe einer Silica Membran gereinigt und anschließend mit Elution Buffer eluiert. Da wegen der schlechten Pufferbedingungen für die RNase A, die die bakterielle RNA aber möglichst weitgehend verdauen soll, vom Hersteller der Kits sehr viel RNase A in der ersten Lösung eingesetzt wird, sollte diese RNase A irgendwann vor einer späteren Transkriptionsreaktion noch mit Proteinase K sicher vollständig inaktiviert werden.

Für die Plasmidpräparation mit diesem Kit wurde die gesamte 250 ml Hauptkultur mit einer OD600 von 2 - 3 verwendet.

2.2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit dem Qubit®

Für viele Reaktionen in dieser Arbeit mussten möglichst genaue Mengen von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Zur Messung der Konzentrationen von Nukleinsäuren wurde ein Qubit® verwendet. Das Gerät misst die Fluoreszenz eines Farbstoffes der sich an die entsprechende Art von Nukleinsäure anlagert und jene emittiert. Für jede Art von Nukleinsäure gibt es ein entsprechendes Assay Kit, welches für Messungen im Rahmen dieser Arbeit nach Herstellerangaben verwendet wurde.

2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht dem Anwender das Auftrennen von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Die Proben werden in Geltaschen geladen und wandern bei einer

angelegten elektrischen Spannung in Richtung Anode, da sie ein negativ geladenes Phosphat-Rückgrat besitzen. Das polymerisierte Agarosegel besitzt Poren, deren Größe in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration variiert. Dieses hat einen Einfluss auf die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen großen Nukleinsäuren durch das Gel wandern. Des Weiteren ist die Ladung der Nukleinsäurestränge direkt proportional zu ihrer Länge, da jede Base eine Phosphatgruppe mit sich bringt. Das führt dazu, dass sich die Nukleinsäuren im Molekularsieb des Gels allein entsprechend ihrer Größe auftrennen.

Zunächst wurde die Agarose (0,8 %) in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde die Agarose in einen Gelschlitten, der mit einem Kamm versehen war, gegossen und zum Polymerisieren 20 – 30 min stehen gelassen. Danach wurde der Kamm gezogen und die Kammer mit 1 x TBE-Puffer gefüllt. Dann wurden die Proben mit einem Ladepuffer versetzt, damit diese sich gleichmäßig in den Taschen absetzen und man die Laufhöhe anhand des Bromphenolblau und Xylencyanol abschätzen kann. Beim folgenden Beladen des Gels wurde zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen, um die Größenbestimmung der Banden zu erleichtern. Nun wurde das Gel mit einer Spannung von 120 V laufen gelassen und danach in einem Ethidiumbromidbad (1:10.000 in 1 x TAE gelöst) für 20 min gefärbt. Durch dieses Prozedere konnten die Banden nun mit dem Gel Doc unter UV-Licht detektiert und dokumentiert werden.

2.2.13 Restriktionsverdau

Der präparative Verdau von Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym dient der Linearisierung des Plasmides. Die Linearisierung führt dazu, dass bei der *in vitro* Transkription Nukleinsäurestränge definierter Größe entstehen.

Die Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI*®-HF präparativ nach untenstehendem Reaktionsansatz (Tabelle 2-14) bei 37 °C für 60 min verdaut.

Tabelle 2-14: Zusammensetzung Einfach-Restriktionsverdau

Komponente	Menge
DNA	20 µg
10 x CutSmart Buffer	20 µl
<i>EcoRI</i> ®-HF	200 U
ddH ₂ O	auf 200 µl auffüllen
Gesamtvolumen	200 µl

Neben dem Einfach-Restriktionsverdau wurde auch ein analytischer Doppel-Restriktionsverdau angewandt, um die Länge des Plasmides zu kontrollieren. Hierbei kamen die Restriktionsenzyme *EcoRI*-HF und *KpnI*-HF zum Einsatz. Der Ansatz wurde nach der untenstehenden Tabelle (Tabelle 2-15) pipettiert und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung Doppel-Restriktionsverdau

Komponente	Menge
DNA	10 µg
10 x CutSmart Buffer	10 µl
<i>EcoRI</i> ®-HF	100 U
<i>KpnI</i> ®-HF	100 U
ddH ₂ O	auf 100 µl auffüllen
Gesamtvolumen	200 µl

2.2.14 Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäureaufreinigung dient dazu, eine Nukleinsäurelösung von unerwünschten Proteinen zu befreien. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol verwendet. Phenol und Chloroform führen zu einer Denaturierung der Proteine und Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und inaktiviert temporär RNasen. Hierbei ist anzumerken, dass die Inaktivierung nicht immer vollständig gewährleistet ist, da eine RNase A beispielsweise auch wieder renaturieren kann. Zur Beseitigung von eventuell verbliebenen organischen Rückständen wurde anschließend eine Alkoholfällung durchgeführt. Dabei wird die Probe mit einem sauren Salz versetzt, was dazu führt, dass die Nukleinsäuren protoniert und damit neutralisiert werden und durch die folglich verringerte Löslichkeit aggregieren und ausfallen können.

Zu Beginn wurde die Probe mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 400 µl gebracht. Anschließend wurde die Probe mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und gevortext. Danach wurden die Proben, nach vorherigem Auf- und Abpipettieren in ein Phase Lock Gel™ Tube überführt und für 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei wandert die Phenol/Chloroform-Phase durch die Wachsschicht nach unten, und die obere wässrige Phase mit der Nukleinsäure kann leicht abgenommen werden. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort mit 40 µl 3 M Natriumacetat und 1 ml reinem Ethanol versetzt, kurz aber gründlich gevortext und für 1 h oder über Nacht bei -20 °C gelagert. Alternativ zum Ethanol konnten

bei diesem Schritt auch 500 µl Isopropanol verwendet werden. Wenn nur sehr geringe Mengen RNA aufgereinigt werden sollten, wurde die Probe mit 1 µl Co-Präzipitat (GlycoBlue) versetzt, um das Pellet besser sichtbar zu machen und somit ein möglichst sauberes Abpipettieren des Überstandes zu gewährleisten, ohne das Pellet zu berühren.

Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm. Nach dem Zentrifugieren folgten zwei Waschschrte, in denen der Überstand abgenommen, 700 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Abschließend wurde das Pellet in ddH₂O resuspendiert.

Als alternatives Verfahren kam in dieser Arbeit auch eine Aufreinigung zur Anwendung, in der die Fällung mit Lithiumchlorid gemacht wurde. Dazu wurde die obere Phase aus dem Phase Lock Gel™ Tube mit 0,5 Volumen 7 M Lithiumchlorid versetzt, sodass sie eine Endkonzentration von 2,5 M ergab. Das wurde durch gründliches Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 4 °C über Nacht (mind. 1 h) inkubiert. Das restliche Verfahren gleicht dem Standardprotokoll wie oben bereits beschrieben.

2.2.15 Standard *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription dient dazu, die linearisierte DNA in RNA umzuschreiben, damit man diese für eine Transfektion benutzen kann. Für die *in vitro*-Transkription wurde die T7-Polymerase verwendet. Der Promoter und die Stoppssequenz flankieren das zu untersuchende Konstrukt in dem Plasmid. Die Reaktion wurde nach dem Schema der folgenden Tabelle (Tabelle 2-16) angesetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde nach der Hälfte der Zeit erneut 50 U Polymerase hinzugegeben.

Tabelle 2-16: Zusammensetzung Standard *in vitro*-Transkription

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
DNA Template	variabel	25 µg / ml
Transkriptionspuffer	10 x	1 x
rNTPs (jeweils)	25 mM	3500 µM
DTT	1000 mM	10 mM
MgCl ₂	25 mM	5 mM
T7-RNA-Polymerase	50 U / µl	1 U / µl
RNase Inhibitor	40 U / µl	0,8 U / µl
ddH ₂ O	variabel	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen		50 µl

2.2.16 Hi-T7 *in vitro*-Transkription

Dieses Protokoll wurde als Abänderung der Standard *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.15) entwickelt, um eine geringere Menge an Nebenprodukten zu erhalten. Die höhere Temperatur soll dem Rückfalten des RNA-Produkts am 3'-Ende der HCV 3'UTR und dem damit verbundenen *self-priming* (Schenborn & Mierendorf Jr, 1985) vorbeugen. In diesem Protokoll wurde statt der gewöhnlichen T7-Polymerase die Hi-T7-Polymerase von New England Biolabs verwendet. Der Unterschied liegt darin, dass die Hi-T7-Polymerase bei Temperaturen von 37 – 56 °C arbeiten kann und ihr optimaler Arbeitsbereich zwischen 50 – 52 °C liegt. Durch eine Transkription bei diesen Temperaturen verspricht man sich eine Reduktion der Bildung von dsRNA-Nebenprodukten durch *self-priming* in der RNA. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist der Tabelle zu entnehmen (Tabelle 2-17). Die Transkriptionsansätze wurden für 1 h bei 50 °C inkubiert.

Tabelle 2-17: Zusammensetzung Hi-T7 *in vitro*-Transkription

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
DNA Template	variabel	25 µg / ml
Transkriptionspuffer	10 x	1 x
rNTPs (jeweils)	25 mM	500 µM
Hi-T7-RNA-Polymerase	50 U / µl	5 U / µl
RNase Inhibitor	40 U / µl	0,4 U / µl
ddH ₂ O	variabel	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen		50 µl

2.2.17 Blocker-Oligonukleotide in der *in vitro*-Transkription

Dieses Protokoll wurde als Abänderung der Standard *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.15) entwickelt, um eine geringere Menge an Nebenprodukten zu erhalten. Die Blockade des 3'-Endes der entstandenen RNA mittels eines Blocker-Oligonukleotides soll das Rückfalten und *self-priming* der RNA verhindern. Ein Capture-Oligonukleotid soll anschließend den Blocker selbst binden und damit kompetitiv aus seiner Bindung an die HCV-RNA lösen und damit das 3'-Ende der RNA wieder freigeben, um dessen Funktion während des folgenden Experimentes nicht einzuschränken.

Die Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes ist der Tabelle zu entnehmen (Tabelle 2-18). Der Ansatz wurde bei 37 °C für 3 h inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurden

erneut 25 U Polymerase zugegeben. Nach der Inkubation wurden 22 pmol des Capture-Oligonukleotides dazu gegeben und für weitere 10 min bei 54 °C inkubiert.

Bei diesem experimentellen Verfahren wurden zwei Varianten ausprobiert. Variante 1 wurde pipettiert wie oben beschrieben, und bei Variante 2 wurde die Reihenfolge der Zugabe von Blocker- und Capture-Oligonukleotid miteinander vertauscht.

Tabelle 2-18: Zusammensetzung Blocker *in vitro*-Transkription

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
DNA Template	variabel	25 µg / ml
Transkriptionspuffer	10 x	1 x
rNTPs (jeweils)	25 mM	3500 µM
DTT	1000 mM	10 mM
MgCl ₂	25 mM	5 mM
T7-RNA-Polymerase	50 U / µl	1 U / µl
RNase Inhibitor	40 U / µl	0,4 U / µl
Blocker Oligonukleotid	10 pmol / µl	22 pmol
ddH ₂ O	variabel	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen		50 µl

2.2.18 Nukleinsäureextraktion aus einem Agarose-Gel

Um gezielt RNA-Banden aus einem Gel zu gewinnen, wurden die Proben auf einem 0,8 % Agarose-Gel geladen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das Agarose-Gel wurde hierbei mit *SYBR™ Gold Nucleid Acid Gel Stain* im Verhältnis 1:10.000 versetzt und die Banden mithilfe eines Blaulicht-Illuminators sichtbar gemacht und gezielt mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „*Zymoclean Gel RNA Recovery Kit*“ nach Herstellerangaben (Zymo Research).

2.2.19 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau dient dazu das DNA-Template aus der fertigen *in vitro*-Transkription (ca. 50 µl) zu entfernen. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Enzyme verwendet.

Für den DNase-Verdau mit der TURBO DNase wurden 6 U des Enzyms in den fertigen Transkriptionsansatz pipettiert und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für den DNase Verdau mit der DNase I wurden 5 µl des 10 x Reaktionspuffers und 6 U der DNase I in den fertigen Transkriptionsansatz pipettiert und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.20 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zur Einbringung von genetischem Material in die Zelle. Im Falle dieser Arbeit wurde die Transfektion mit kationischen Lipiden durchgeführt. Das Prinzip besteht daraus, dass die kationischen Lipide in der wässrigen Phase Liposomen bilden, die in Gegenwart von Nukleinsäuren Nukleinsäure-Lipid-Komplexe bilden. Diese Komplexe können dann von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden. Folgend werden die endosomalen Strukturen vermutlich durch osmotischen Druck oder einen anderen Mechanismus zerstört, wodurch die RNA in das Zytosol der Zelle freigesetzt werden kann.

Alle Arbeiten dieser Methode wurden auf einer Sterilbank durchgeführt, um das Risiko möglicher Kontamination zu minimieren. Am Tag vor der Transfektion wurden in einer 6-Well-Platte pro *well* $2,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml DMEM (10 % FBS) und in einer 12-Well-Platte pro *well* $0,75 \times 10^5$ Zellen in 1 ml DMEM (10 %) ausgesät. Für die Lipofektion wurde für jede zu transfizierende Probe ein separater Ansatz nach folgendem Schema hergestellt. Zunächst wurden 500 µl DMEM (0 %) mit Lipofektamin 2000 (3 µl Lipofektamin pro 1 µg RNA) gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,3 pmol RNA dazugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe in das entsprechende *well* pipettiert und die Zellkulturplatte im Brutschrank bis zur Lyse gelagert.

2.2.21 Zellyse

Um die Veränderungen in der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion zu analysieren wurden die Zellen an ausgewählten Zeitpunkten nach der Transfektion mithilfe von TRIzol® lysiert. TRIzol® ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyant, welche nach Zugabe in das Well die Probe homogenisiert, Proteine denaturiert und die nachfolgende Fällung von RNA ermöglicht.

Für die spätere Verwendung der Probe in einer qPCR wurden die 6-Well-Zellkulturplatten zunächst aus dem Brutschrank genommen, das Medium abpipettiert und die *wells* anschließend mit 1 ml PBS (1 x) gewaschen. Danach wurde TRIzol® (1 ml / *well*) auf die Zellen gegeben und die Platte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurde die Probe durch Auf- und Abpipettieren gemischt und in ein entsprechend beschriftetes Reaktionsgefäß überführt.

Für die spätere Verwendung der Probe in einem Western Blot wurden die 12-Well-Zellkulturplatten 48 Stunden nach der Transfektion aus dem Brutschrank genommen, das Medium abpipettiert und die Wells anschließend mit 0,5 ml PBS (1 x) gewaschen. Danach wurden 150 µl Western Blot Lysepuffer (1 x) pro Well auf die Zellen gegeben, die Platte bei 4 °C für 20 min inkubiert und danach bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.22 Totale RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion dient dazu, die RNA aus der mit TRIzol® homogenisierten Probe zu extrahieren und anschließend aufzureinigen. Grundlegend funktioniert das durch Zentrifugieren des Lysates, da sich die RNA dann in der oberen, klaren Phase anreichert und sich somit von der DNA und den Proteinen trennt. Die RNA kann mit Isopropanol aus diesem Überstand gefällt und folgend gereinigt werden.

Zu dem Zelllysat wurde zunächst Chloroform (0,2 ml pro 1 ml TRIzol®) hinzugegeben, anschließend auf- und abpipettiert, kurz gevortext und die Probe bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Danach wurde die Probe für 15 min bei 4 °C mit 16.000 rpm zentrifugiert. Dabei bildet sich eine klare obere Phase mit der RNA, eine Interphase und eine rote untere Phase. Die klare obere Phase wurde ohne Irritation der Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol und 1 µl Glycoblu (15 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde die Probe durch Auf- und Abpipettieren und kurzes Vortexen gut gemischt und dann für mindestens 1 Stunde, oder auch über Nacht, bei -20 °C gelagert. Nach dem Präzipitieren wurden die Proben zum Pelletieren für 20 min bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zwei Mal mit 80 % Ethanol gewaschen, indem der Überstand abpipettiert, 700 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und dann für 5 min bei 16.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Abschließend wurde der restliche Überstand entfernt, das Pellet für kurze Zeit an der Luft getrocknet und in 45 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.23 Aufreinigung mittels RNA Cleanup und Concentration Kit

Für die später folgende RT-qPCR soll die RNA möglichst frei von Verunreinigungen sein, deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit das „*GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit*“ für die finale Aufreinigung der Probe gewählt. Das Kit basiert auf

dem Prinzip die RNA an eine Silica Membran zu binden, in mehreren Schritten zu waschen und letztlich mit ddH₂O die RNA zu eluieren. Das Kit wurde entsprechend der Herstellerangaben (Thermo Scientific) verwendet.

2.2.24 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) dient dem Zweck, die zu analysierende RNA spezifisch in cDNA umzuschreiben, um diese in einer quantitativen qPCR zu verwenden. Für diese Reaktion wurden die Komponenten des „*qScript Flex cDNA Synthesis Kit*“ (Quanta Bioscience) nach dem folgend beschriebenen Protokoll verwendet. Die Reverse Transkriptase besitzt zusätzlich eine RNase H-Aktivität, welche die mehrfache Verwendung desselben RNA Stranges als Template durch direkten Abbau nach der Synthese der cDNA verhindert. Dieses soll eine bessere relative Quantifizierung der RNA in unterschiedlichen Proben erlauben, wohingegen Reverse Transkriptase mit mutierter RNase H-Aktivität Unterschiede in den unterschiedlichen Ausgangsmengen eher nivellieren würde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem spezifische Primer verwendet, die sich gegen die EMCV-Region des Plusstranges, die Spinach-Region des Minusstranges und die zelluläre Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mRNA richten.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde entsprechend der Tabelle (Tabelle 2-19) pipettiert und dann zur Hybridisierung der Primer in den Thermocycler gestellt.

Tabelle 2-19: Zusammensetzung Reverse Transkription

Komponente	Menge
RNA Probe	1 µg
Primer (20 µM)	0,5 µl
GSP Enhancer (10 x)	1 µl
ddH ₂ O	auf 7,5 µl auffüllen
Gesamtvolumen	7,5 µl

Die Hybridisierung wurde entweder bei 65 °C für 5 min oder nach einem Touch-Down-RT-Protokoll startend bei 70 °C mit Reduzierung der Temperatur um 1 °C pro Minute auf 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur gestellt und jeder Ansatz mit 2 µl qScript Flex Reaction Mix (5 x) und 0,5 µl qScript Reverse Transkriptase gemischt und wieder in den Thermocycler gestellt und für

8 – 15 min bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 5 min bei 85 °C. Nun wurden die Proben entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die qPCR benutzt.

Für die Experimente wurde zusätzlich bei der RT eine Kontrollprobe eingeführt („No RT“, NRT), welche entsprechend der anderen Proben behandelt wurde mit dem Unterschied, dass in diesen Ansatz keine qScript Reverse Transkriptase pipettiert wurde. Das Enzym fehlt also in diesem Ansatz, dadurch dient dieser Ansatz in der qPCR als Negativkontrolle.

2.2.25 Blocker-Oligonukleotide in der Reverse Transkription

Dieses Protokoll wurde als Abänderung der Standard Reverse Transkription (Kapitel 2.2.24) entwickelt, um eine geringere Menge an Nebenprodukten zu erhalten. Hierzu wurde von M. Niepmann ein Spinach-Blocker-Oligonukleotid entworfen, welches *downstream* des Spinach-Amplikons auf dem Plusstrang paaren soll. Das Ziel war es, dadurch die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte in der qPCR-Amplikon-Region durch ein Rückfalten und *self-priming* des 3'-Endes und der möglichen Primerfunktion von unverdauten DNA-Templaterückständen zu verhindern.

Die geänderte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist der Tabelle zu entnehmen (Tabelle 2-20). Ansonsten gleicht die Durchführung dem Touch-Down-RT-Protokoll.

Tabelle 2-20: Zusammensetzung Blocker Reverse Transkription

Komponente	Menge
RNA Probe	1 µg
Primer (20 µM)	0,5 µl
RT_Spinach_Blocker (10 µM)	1 µl
GSP Enhancer (10 x)	1 µl
ddH ₂ O	auf 7,5 µl auffüllen
Gesamtvolumen	7,5 µl

2.2.26 Quantitative PCR

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung einer Nukleinsäure während des Ablaufs einer Polymerase-Kettenreaktion. Das in dieser Arbeit verwendete DNA-Erkennungssystem ist die SYBR Green Farbstoffchemie. Der Farbstoff kann hochspezifisch an jede doppelsträngige DNA binden und dient damit dem

Nachweis von PCR-Sequenzen, welche sich im Laufe der Reaktionen anreichern. Je mehr Material von der Zielsequenz im Ausgangsmaterial vorhanden ist, desto früher ist ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz in der Detektion zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die qPCR eine Dauer von 40 Zyklen gewählt. Das Fluoreszenzsignal der Zielsequenzen wurde nach jedem Zyklus gemessen und ergab einen sigmoidalen Kurvenlauf. Als numerischen Parameter nutzt man zur Auswertung den Schwellenwertzyklus (Ct-Wert), welcher den Wert (entsprechend der Zyklusanzahl) auf der ansteigenden Kurve beschreibt, wo das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert steigt. Folglich steht ein niedriger Ct-Wert für eine größere Menge an eingesetzter cDNA als ein hoher Ct-Wert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix von Biorad mit Primern für die EMCV IRES-kodierende Region des HCV Plusstrangs, die Spinach-Region des HCV Minusstrangs und als Kontrolle zusätzlich für die GAPDH-mRNA verwendet (Tabelle 2-9). Die genaue Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes ist der Tabelle (Tabelle 2-21) zu entnehmen. Die Messung erfolgte in einer 96-Well Platte mit dem CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System von Biorad. Das Temperaturprofil für die Messungen ist ebenfalls der entsprechenden Tabelle (Tabelle 2-22) zu entnehmen.

Tabelle 2-21: Zusammensetzung qPCR Ansatz

Komponente	Menge
RT Reaction Sample	2 µl
SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix	10 µl
Forward Primer [20 µM]	1,5 µl
Reverse Primer [20 µM]	1,5 µl
ddH2O	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2-22: Temperaturprofil der qPCR Reaktion

	Phase	Dauer	Temperatur
1 x	Einmalige Denaturierung	2 min	95 °C
40 x	Zyklische Denaturierung	15 s	95 °C
	Zyklische Primer Anlagerung und Verlängerung	30 s	60 °C

2.2.27 Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Der gesamte Prozess lässt sich in vier Teilschritte unterteilen und besteht aus der Vorbereitung der Probe durch Lyse der Zellproben, dem Auftrennen der Proteine mittels Gelelektrophorese, dem Transfer der Proteine von einem Gel auf eine Membran und der Detektion mittels spezifischen enzymgebundenen Antikörpern.

2.2.27.1 Probengewinnung

Zu Beginn eines Experimentes wurden für einen Western Blot $0,75 \times 10^5$ Zellen pro *well* in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach dem Experiment wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 150 μ l WB-Lysepuffer pro *well* bei 4 °C für 20 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert, wenn es nicht direkt weiterverarbeitet werden konnte. Die Proben wurden dann für 15 min bei 4 °C und 16.000 rpm zentrifugiert, damit sich die Kerne und Zelltrümmer absetzen. Folgend wurden 30 μ l des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 μ l 2 x PPCP versetzt. Der Rest des Überstandes wurde wieder eingefroren, um für eine Wiederholung des Western Blots zur Verfügung zu stehen. Die Proteine wurden nun auf einem Heizblock bei 96 °C für 10 min denaturiert und standen nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur für die Proteinauftrennung zur Verfügung. Der Prozess des Denaturierens wird von Mercaptoethanol, welches im 2 x PPCP-Puffer enthalten ist, unterstützt, indem es die Disulfidbrücken reduziert. Des Weiteren enthält der Puffer Glycerin, um die Proben später besser auf das Gel laden zu können.

2.2.27.2 Auftrennung der Proteine

Für die Auftrennung der Proteine kam das Verfahren der Natrium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli zum Einsatz. Bei dieser Methode werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine Schlüsselsubstanz für dieses Verfahren ist das im 2 x PPCP-Puffer enthaltene anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS lagert sich an die Aminosäurekette des Proteins, entfaltet dieses und sorgt für eine negative Ladung, die in der Regel in proportionalem Verhältnis zur Länge der Polypeptidkette und damit der Masse des Proteins steht.

Zur Auftrennung der denaturierten Proteine wird ein diskontinuierliches, zweigeteiltes Polyacrylamidgel benötigt. Das gesamte Gel besteht grundsätzlich aus einem Polyacrylamidnetzwerk, das durch die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid nach der Zugabe von N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) entsteht. Das Sammelgel (oberer Teil) dient der Konzentration der Proben und das Trenngel (unterer Teil) dient der sauberen Auftrennung der Proben. Die unterschiedlichen Eigenschaften sind der jeweiligen Zusammensetzung der Gele zuzuschreiben, welche weiter unten im Text beschrieben wird (Tabelle 2-23). Die Proben wandern also nach dem Anlegen einer Spannung durch das Polyacrylamidnetzwerk und werden im Trenngel durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit, die von der Menge der negativen Ladung abhängig ist, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Proteine mit einem kleinen Molekulargewicht wandern folglich schneller durch das Gel und legen eine längere Laufstrecke zurück, die sich etwa umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse verhält.

Zu Beginn wurden die Glasplatten und Abstandhalter gereinigt und in die Halteapparatur eingespannt. Dann wurden beide Geltypen nach untenstehender Tabelle (Tabelle 2-23) in jeweils einem 15 ml Reaktionsgefäß vorbereitet. Anschließend wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit einer kleinen Schicht Isopropanol benetzt. Das Isopropanol soll in diesem Fall für eine glatte Oberfläche des Gels sorgen. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wurde das Isopropanol wieder mithilfe eines Filterpapiers entfernt. Nun konnte das Sammelgel oben darauf gegossen und ein Kamm eingesetzt werden. Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und das Gel war zum Beladen bereit. Die gesamte Halteapparatur wurde in eine SDS-Gelelektrophorese-Kammer überführt und die Kammer mit SDS-Laufpuffer (1 x) gefüllt.

Tabelle 2-23: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
40 % Bisacrylamid (29:1)	375 µl	1800 µl
Trizin-Gelpuffer	750 µl	2000 µl
Glycerin	0 µl	650 µl
H ₂ O	1842 µl	1484 µl
TEMED	3 µl	6 µl
APS	30 µl	60 µl
Gesamtvolumen	3 ml	6 ml

Zum Beladen des Gels wurden 4 µl eines Proteingrößenstandards und jeweils 20 µl der Proben verwendet. Dann wurde die Elektrophorese bei 80 V gestartet, bis die Proben die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht haben, und anschließend bei 140 V fortgeführt.

2.2.27.3 Transfer der Proteine

Die Proteinbanden sollen in diesem Schritt von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich für die *semi-dry* Variante im horizontalen Aufbau und dem Grundprinzip der elektrophoretischen Übertragung entschieden. Hierbei werden die negativ geladenen Proteine durch Anlegen einer Spannung dazu gebracht in Richtung Anode zu wandern und sich dann durch hydrophobe Wechselwirkungen an der PVDF-Membran zu fixieren.

Zur Vorbereitung des Elektroblobs wurde die PVDF-Membran zunächst für mindestens eine Minute in Methanol (100 %) eingelegt, um die Hydrophobie der Membran etwas zu mindern und diese so zu *aktivieren*. Des Weiteren wurden zurechtgeschnittene Chromatographie-Papiere in Größe der Gele in Transferpuffer eingelegt. Nun wurden die fertig gelaufenen Gele aus der Halteapparatur geholt, das Sammelgel sauber vom Trenngel abgetrennt und das Trenngel mit den anderen Materialien in folgender Reihenfolge auf der Elektroblob-Apparatur aufgeschichtet: Anode, 2 x Chromatographie Papier, PVDF-Membran, Trenngel, 2 x Chromatographie Papier, Kathodendeckel. Anschließend wurde der Elektroblob bei 42 mA pro Trenngel für 1,5 Stunden laufen gelassen.

2.2.27.4 Detektion der Proteine

Zur spezifischen Detektion der Proteine wurde anschließend ein Immunoblot durchgeführt. Diese Methode dient dem indirekten immunochemischen Nachweis eines Antigens. Das Prinzip der Methode beruht auf Sekundärantikörpern, welche an einen Primärantikörper binden, der spezifisch für die gesuchten Antigene ist. Der Sekundärantikörper trägt eine Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP), welche den späteren Nachweis über Chemilumineszenz ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PVDF-Membran zu Beginn in einer 7,5 %-Blocklösung aus Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor dem nächsten Schritt mussten die Primärantikörper in einer 7,5 %-Blocklösung aus Milchpulver verdünnt werden (Tabelle 2-8). Nun wurde 1 ml der

Primärantikörperlösung gleichmäßig auf der PVDF-Membran verteilt und diese luftdicht in Plastikfolie eingeschlagen, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Dann wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal mit PBS-T (1 x) gewaschen. Hierzu wurde die PVDF-Membran in eine Wanne gelegt, mit PBS-T (1 x) bedeckt, 10 min auf einen Schüttler gestellt und dann wieder aus der Wanne genommen. Nach drei Waschgängen wurde dann auch der Sekundärantikörper in 7,5 %-Blocklösung mit Milchpulver verdünnt (Tabelle 2-8) und 25 ml der Verdünnung auf die Membran aufgetragen. Mit der Sekundärantikörperlösung wurde die Membran nun eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in der Wanne inkubiert und anschließend nach demselben Protokoll mit PBS-T gewaschen wie bereits zuvor. Zur Detektion wurde schlussendlich das „*SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit*“ von Thermo Scientific nach Herstellerangaben in Kombination mit dem ChemiDocTM Imaging System von Bio-Rad benutzt. Das Chemilumineszenzsignal entsteht dabei aufgrund der Umsetzung des Luminols durch die Peroxidase.

2.2.28 Biotin-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, mit der sich ein von Primern begrenzter Abschnitt eines DNA-Template schnell *in vitro* vervielfältigen lässt. Der gewünschte DNA-Abschnitt wird hier durch den Ablauf mehrerer Zyklen dieser Reaktion näherungsweise exponentiell vermehrt. Jeder Zyklus besteht aus den drei Phasen Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die Einzelheiten der Reaktion sind den untenstehenden Tabellen (Tabelle 2-24; Tabelle 2-25) zu entnehmen. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden besondere Primer verwendet. Beide Primer besitzen ein Biotin mit einem Linker (TEG) am 5'-Ende. Der *forward* Primer bindet oberhalb des T7-Promotors. Der *reverse* Primer bindet am 3'-Ende der HCV Sequenz und besitzt zusätzlich zwei O-methylierte 5'-Nukleotide um die T7-Polymerase abfallen zu lassen. Diese Modifikationen wurden gewählt, um ein möglichst restloses Entfernen des so biotinylierten DNA-Templates nach der *in vitro*-Transkription durch die Bindung der Matrizen-DNA an Streptavidin-gekoppelte Beads zu ermöglichen.

Tabelle 2-24: Zusammensetzung der Biotin-PCR

Komponente	Menge
DNA Template	50 ng
Q5 Reaction Buffer (5 x)	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Forward Primer [10 µM]	2,5 µl
Reverse Primer [10 µM]	2,5 µl
Q5 HF DNA Polymerase	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 2-25: Temperaturprofil der Biotin-PCR

	Phase	Dauer	Temperatur
1 x	Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
28 x	Zyklische Denaturierung	10 s	98 °C
	Zyklische Hybridisierung	20 s	64 °C
	Zyklische Elongation	10 s	72 °C
1 x	Finale Elongation	2 min	72 °C

2.2.29 Aufreinigung mit Streptavidin Magnetic Beads

Die Aufreinigungsmethode wurde in dieser Arbeit verwendet, um das während einer PCR biotinylierte DNA-Template nach der *in vitro*-Transkription (Kapitel 2.2.28; Kapitel 2.2.15) möglichst vollständig aus der RNA-Probe zu entfernen.

Zu Beginn wurden die mit dem Biotin-bindenden Protein Streptavidin bedeckten Beads (Plastik-Kügelchen) nach Herstellerangaben gewaschen, um sie für den Einsatz in der Aufreinigung vorzubereiten. Hierfür wurden die Beads durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und anschließend [50 µl + 25 µl * Anzahl der Proben] in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 150 µl 1 x SSC-Puffer (oder 1 x PBS) hinzugefügt und leicht gevortext. Nun wurde das Reaktionsgefäß in ein magnetisches Rack gestellt, um die Beads an den Rand des Reaktionsgefäßes zu ziehen und den Überstand abpipettieren.

Anschließend wurden die Beads wieder in 150 µl 1 x SSC-Puffer resuspendiert, in das Rack gestellt und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Beim dritten Mal Waschen wurden die Beads am Ende allerdings in

[50 µl + 50 µl * Anzahl der Proben] 2 x SSC-Puffer resuspendiert. Von diesem Gemisch wurden dann jeweils 50 µl in die RNA Proben überführt und mit diesen durch leichtes Vortexen gemischt. Danach wurden die Proben für 15 min bei 37 °C inkubiert, wobei sie während dieser Zeit regelmäßig mit dem Finger angeschnippt wurden, damit sich die Beads in dieser Zeit nicht absetzen konnten. Nach der Inkubation wurden die Proben in das magnetische Rack gestellt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Abschluss wurde die RNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert (Kapitel 2.2.14).

2.2.30 Auswertung der qPCR

Die Aufzeichnung der qPCR erfolgte in Form von Amplifikationskurven und Ct-Werten mit dem Programm CFX Maestro von Bio-Rad. Ein Ct-Wert stellt dabei einen numerischen Parameter dar, welcher den Wert (entsprechend der Zyklusanzahl) auf der Amplifikationskurve beschreibt, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über den Hintergrundwert steigt. Die Ct-Werte wurden dann anschließend in das Programm Microsoft Excel 2013 exportiert und dort jeweils auf eine dem Experiment und der Fragestellung angepasste Weise ausgewertet. Zu Beginn wurden alle Daten invertiert (40 minus den jeweiligen Ct-Wert), um einen Überblick zu bekommen und das Verständnis zu erleichtern. Bei *Troubleshooting*-Experimenten wurden die Minusstrang-Ct-Werte auf die Plusstrang-Ct-Werte normalisiert. Bei *time course*-Experimenten wurden sämtliche Minusstrang-Werte auf den Referenz-Minusstrang-Wert des 48 h Zeitpunkt vom I-III_wt Konstrukt normalisiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte nach folgender Formel.

$$\text{Relative Strangabundanz} = \text{Amplifikationseffizienz}^{(\text{Probe} - \text{Referenz})}$$

Die Amplifikationseffizienz wurde bei den Berechnungen näherungsweise als 2 angenommen. „Probe“ meint in dieser Formel den Ct-Wert, welcher auf den Referenzwert normalisiert werden soll und „Referenz“ entspricht dem Referenz-Ct-Wert, wie bereits oben im Text beschrieben.

Des Weiteren wurden Mittelwerte und Standardabweichungen sowohl von den invertierten als auch den normalisierten Daten gebildet. Die Signifikanzen wurden mithilfe eines zweiseitigen T-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) vom Typ 3 errechnet und alle Werte mit p > 0,05 wurden als nicht signifikant angesehen. Die Zweiseitigkeit wurde gewählt, da zunächst nicht ersichtlich war, in welche Richtung die Ergebnisse der

Experimente gehen würden. Typ 3 wurde gewählt, da dem Datensatz unterschiedliche Varianzen zu Grunde liegen und es sich um eine heteroskedastische Verteilung (also mit je nach Größe der Variablen unterschiedlich großen Störungen) handelt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Verbesserung oder Fehlerbehebung (ein „*Troubleshooting*“) des bereits etablierten Protokolls zur Minusstrangdetektion von HCV durchgeführt werden. Anschließend sollte das modifizierte Protokoll in einem *in vivo*-Experiment angewendet werden. Für eine strukturierte Darstellung wurden die Ergebnisse dieser Arbeit in drei Teile aufgeteilt. Der erste Teil (Kapitel 3.1) besteht aus der Präsentation von Kontrollversuchen. Der zweite Teil (Kapitel 3.2; Kapitel 3.3) ist ein *Troubleshooting* des von L. Shalamova etablierten Protokolls zur Detektion der HCV-Minusstränge mittels der RT-qPCR (Shalamova, 2018). Die Durchführung der Versuche in diesem Teil der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Anna-Lena Hell, um eine breit aufgestellte Fehleranalyse zu gewährleisten (Hell, 2020). Der dritte Teil (Kapitel 3.4) ist ein *in vivo*-Experiment unter Anwendung des modifizierten Versuchsprotokolls, um die Auswirkungen der Modifikationen im Kontext zu betrachten. Außerdem lieferte das Experiment Informationen über die Replikationsfähigkeit verschiedener HCV-Konstrukte.

3.1 Kontrolle der Rahmenbedingungen

3.1.1 Kontrolle der hergestellten HCV-Konstrukte

Zur Herstellung der HCV-Konstrukte, die in den Versuchen verwendet werden sollten, wurden die Schritte 1 - 16 aus dem Methoden-Überblick (Kapitel 2.2.1) mit den Konstrukten hp_wt, hp_GND, I-II_wt, I-III_wt, I-III_GND, 5'UTR_wt und Core_wt (Kapitel 2.1.7) durchgeführt. Die Plasmide wurden in Bakterien vermehrt, durch Restriktionsenzyme linearisiert und in einer *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben. Die Abbildung 3-1 zeigt das Ergebnis dieses Prozesses.

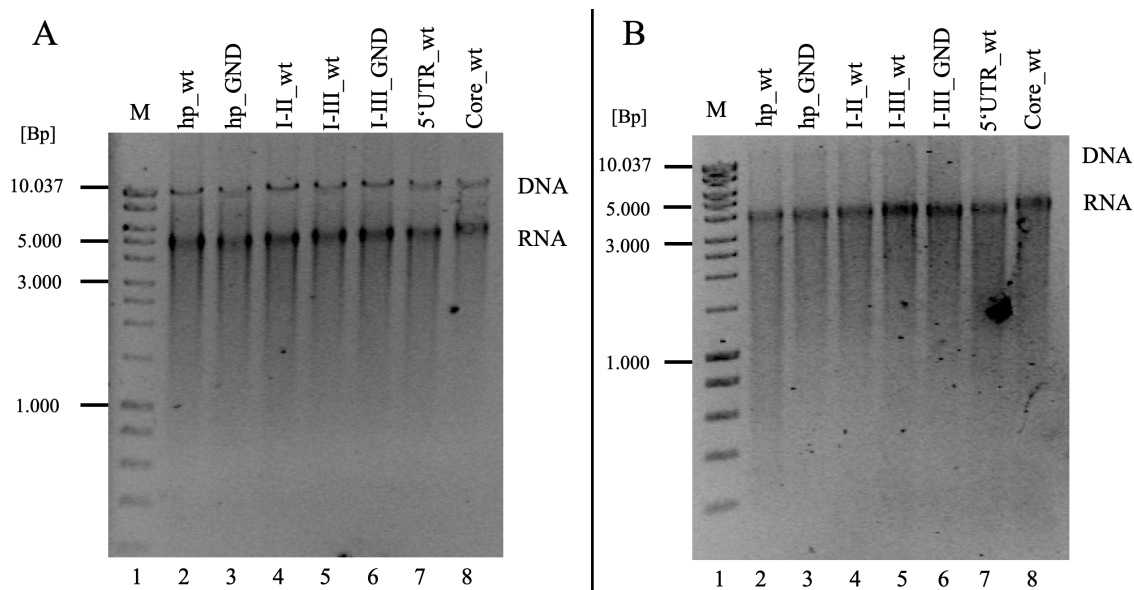


Abbildung 3-1: Kontroll-Gel einer Standard *in vitro*-Transkription.

Die Abbildung zeigt die Produkte der *in vitro*-Transkriptionen vor (A) und nach (B) dem Entfernen der DNA-Templates. Die Gelelektrophorese wurde mit 0,8 % Agarose durchgeführt. Als Größenmarker M wurde die Hyper Ladder I als DNA Marker aufgetragen (1, in A und B). Die Länge ist in Basenpaaren (bp) angegeben. A Das DNA-Template der verschiedenen Konstrukte wurde auf einer Höhe von ca. 9900 - 10200 bp detektiert. Die RNA-Konstrukte wurden auf einer Höhe von ca. 4.000 – 4.800 bp detektiert (entsprechend einer RNA Länge von 7100 – 7900 nt). B Dieses Bild wurde nach einem DNase-Verdau und anschließender Nukleinsäureextraktion und -fällung erstellt. Die RNA-Banden wurden auch hier auf einer Höhe von ca. 4.000 – 4.800 bp detektiert, wohingegen die DNA als weitgehend verdaut erscheint.

In der obenstehenden Abbildung 3-1 ist zu erkennen, dass die RNA sowohl vor (A) als auch nach (B) dem DNase-Verdau und der Nukleinsäureextraktion und -fällung intakt und nicht degradiert ist, da sich die RNA bei allen Konstrukten als scharf abgrenzbare Bande mit der richtigen Länge darstellt (2 – 8).

Schlussfolgerung: Die Herstellung der RNA-HCV-Konstrukte war erfolgreich. Die Konstrukte können für die Transfektion genutzt werden.

3.1.2 Kontrolle der HCV Proteinexpression

Mit Hilfe eines Western Blots sollte kontrolliert werden, ob es nach der Transfektion der HCV-Konstrukte aus Abbildung 3-1 zur Produktion von viralen Proteinen in den Zellen kommt. Hierzu wurden die RNA-Konstrukte hp_wt, hp_GND, I-II_wt, I-III_wt, I-III_GND, 5'UTR_wt und Core_wt (Kapitel 2.1.7) in Huh-7.5 Zellen transfiziert, wobei stets eine Negativkontrolle (Mock) mitgeführt wurde, bei der keine RNA transfiziert

Ergebnisse

wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion und die Proben wurden anschließend mit einem Western Blot (Kapitel 2.2.27) analysiert.

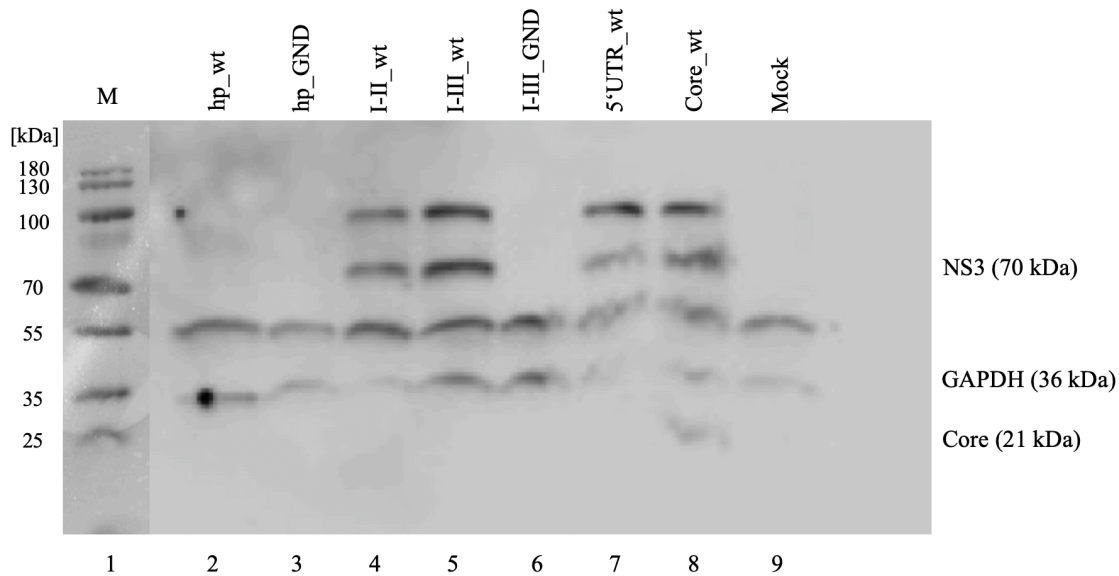


Abbildung 3-2: Western Blot 48 h nach Transfektion.

Der Western Blot erfolgte mit Proben, die 48 h nach Transfektion aus Huh-7.5 Zellen gewonnen wurden. Die primären Antikörper wurden so gewählt, dass die Proteine NS3, Core und GAPDH nachgewiesen werden konnten (2 - 7). Als Größenstandard M wurde Page Ruler Prestained Protein Ladder aufgetragen (1). Das NS3 Protein wurde auf der Höhe von ca. 70 kDa detektiert (4, 5, 7, 8), GAPDH bei ca. 36 kDa (2 - 9) und Core bei ca. 21 kDa (8). Dieser Western Blot weist bei allen Proben Doppelbanden auf.

In der Abbildung 3-2 kann man erkennen, dass alle transfizierten Zellen das zelluläre Protein GAPDH exprimiert haben, welches zur Kontrolle auf einer Höhe von ca. 36 kDa detektiert wurde. Das NS3 Protein wurde in den Zellen, die mit I-II_wt, I-III_wt, 5'UTR_wt oder Core_wt transfiziert wurden, exprimiert und auf einer Höhe von ca. 70 kDa detektiert. Das Core Protein wurde nur von dem Konstrukt Core_wt kodiert und auf einer Höhe von ca. 21 kDa detektiert. Folglich wurden nur von Konstrukten virale Proteine gebildet, die auch zur Replikation fähig sind. Die Konstrukte hp_wt, hp_GND und I-III_GND sind nicht replikationsfähig und haben, wie im Western Blot zu erkennen ist, keine viralen Proteine exprimiert. Mock hat als Negativkontrolle ebenfalls nur das Kontrollprotein GAPDH exprimiert.

Schlussfolgerung: Die Konstrukte führen in den Zellen zu den erwarteten Proteinexpressionen der viralen Proteine. Es ist somit anzunehmen, dass die Transfektion der Zellen erfolgreich war.

3.1.3 Kontrolle der PCR-Produkte

Mit diesem Kontroll-Gel sollte sichergestellt werden, dass die RT-PCR-Produkte, unter Verwendung der Spinach-Primer, dem Spinach-Amplikon entsprechen, mit welchem der Minusstrang der HCV Konstrukte detektiert werden sollte. Ziel der Primer war hierbei die Spinachsequenz auf dem Minusstrang (134 bp). Auf der Abbildung 3-3 sieht man, dass alle Konstrukte eine Bande bei der erwarteten Länge (134 bp) aufweisen. Die Kontrollprobe (Mock), bei der keine Transkripte transfiziert wurden, zeigt sich negativ. Die Banden der nicht replizierenden Konstrukte hp_wt, hp_GND und I-III_GND (2, 3, 6) sind schwächer als die der replizierenden Konstrukte I-II_wt, I-III_wt, 5'UTR_wt und Core_wt.

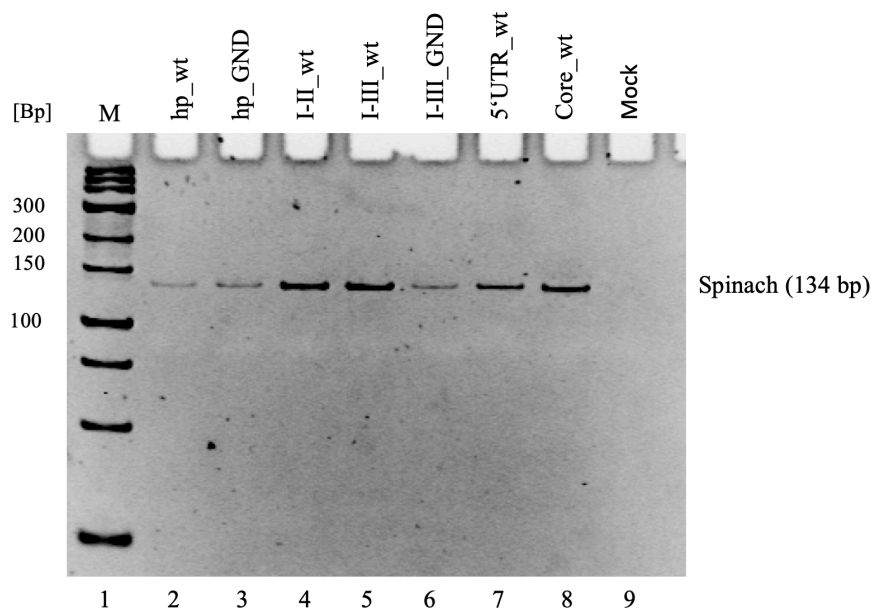


Abbildung 3-3: Visualisierung der Minusstrangamplikons nach RT-PCR.

Die Proben wurden 48 h nach Transfektion von Huh-7.5 Zellen gewonnen und nach einer RT-PCR auf ein 8 % PAA-Gel aufgetragen. Die Proben aller Konstrukte zeigen das Spinach-Amplikon (2 - 8), wobei die Bande bei den Proben der nicht replizierenden Konstrukten deutlich schwächer ist (2, 3, 6). Bei der Negativkontrolle (Mock) ist kein primerspezifischer Hintergrund erkennbar (9). Als Größenstandard M wurde GeneRuler Low Range DNA Ladder verwendet (1).

Schlussfolgerung: Die RT-PCR-Produkte weisen die erwartete Länge des Spinach-Amplikon (134 bp) auf. Die spezifische Detektion der Spinachsequenz auf dem Minusstrang war erfolgreich. Aufgrund der Banden bei den Proben der nicht replizierenden Konstrukte ist von einem Hintergrundsignal in den transfizierten Proben auszugehen.

3.2 Bildung artifizierlicher Minusstränge verhindern

Eine Vermutung, die versucht das Hintergrundsignal in der qPCR zu erklären, stützt sich darauf, dass die RNA während der *in vitro*-Transkription am 3'-Ende durch Rückfalten eine Haarnadelstruktur ausbildet. Diese Haarnadelstruktur dient dann der Polymerase als Primer für eine fortlaufende Transkription. Durch diese fortlaufende Transkription entsteht doppelsträngige RNA, welche in der qPCR Minusstrangsignale erzeugt, die normalerweise erst durch die Replikation des Virus in der Zelle gebildet werden (Abbildung 1-4). Mit der folgenden Versuchsreihe wurde versucht, diesem Problem entgegenzuwirken. Dabei wurden verschiedene Ansatzpunkte ausprobiert, die in den einzelnen Kapiteln näher erläutert werden.

3.2.1 Hi-T7 Polymerase

Die Verwendung der Hi-T7-Polymerase (Kapitel 2.2.16) ist ein Versuch, die Entstehung von Nebenprodukten durch eine höhere Temperatur während der *in vitro*-Transkription zu mindern. Durch die höhere Temperatur (50 °C) während der Reaktion erhoffte man sich hierbei eine Instabilität der sich am 3'-Ende bildenden Haarnadelstruktur während der *in vitro*-Transkription.

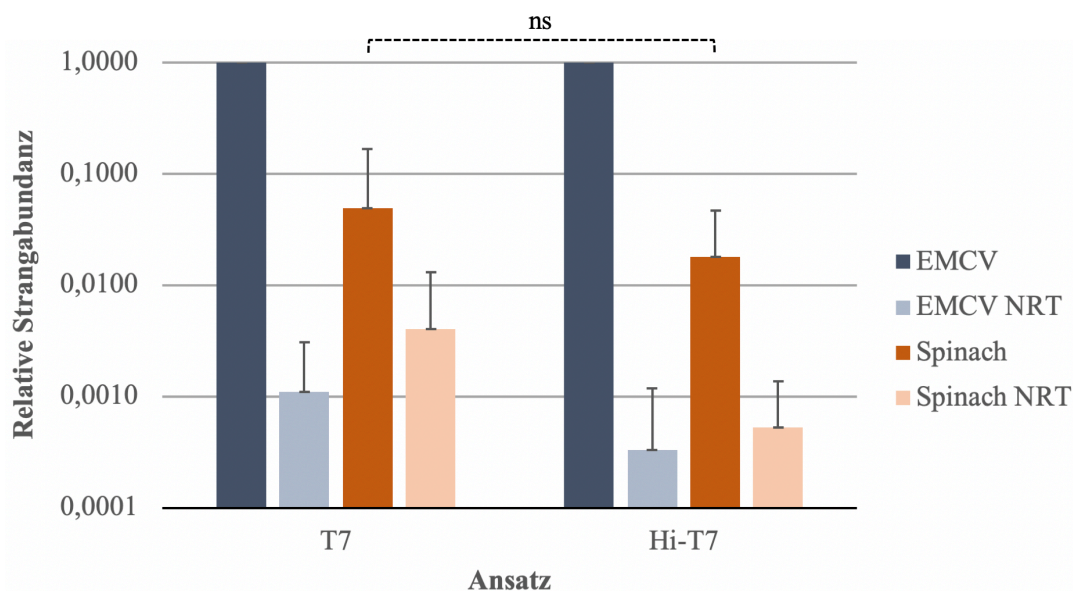


Abbildung 3-4: Verbesserungsversuch mit Hi-T7-Polymerase.

Die Proben stammen aus *in vitro*-Experimenten ($n = 4$), wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **T7** Bei diesem Ansatz wurde die T7-RNA-Polymerase von NEB für die *in vitro*-Transkription verwendet. **Hi-T7** Bei diesem Ansatz wurde die Hi-T7-Polymerase von NEB für die *in vitro*-Transkription verwendet. Der Unterschied in der Minusstrangdetektion (Spinach) ist nicht signifikant (ns). Die beiden NRT Proben (EMCV NRT, Spinach NRT) sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde. Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-4 zeigt die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit einer temperaturstabilen T7-Polymerase. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Proben (EMCV NRT, Spinach NRT) sind Kontrollen, bei denen keine reverse Transkriptase zur RT-Reaktion gegeben wurde (NRT für „no RT“). Dadurch zeigen diese Ansätze den durch residuale Plasmid-DNA induzierten Hintergrund der qPCR bei den Plus- und Minussträngen. Augenscheinlich zeigt sich ein verringerter Minusstrang-Hintergrund (Spinach-Säule bei Hi-T7 im Vergleich zu T7), welcher sich aber als nicht signifikant (ns) herausstellt. Außerdem stellte sich während der Experimente heraus, dass die RNA-Ausbeute einer solchen Hi-T7-Transkription nicht für *in vivo*-Experimente ausreichend war.

Schlussfolgerung: Der Einsatz einer Hi-T7-Polymerase bringt keine signifikante Verbesserung des Minusstranghintergrundes mit sich und erweist sich in der Praxis als wenig ergiebig. Der Ansatz wurde maßgeblich wegen der geringen Ausbeute nicht weiterverfolgt.

3.2.2 Blocker-Oligonukleotid

Die Verwendung eines Blocker-Oligonukleotides während der *in vitro*-Transkription ist ein Versuch, die Entstehung von Nebenprodukten durch die Blockade der Bildung einer Haarnadelstruktur am 3'-Ende der RNA, zu verhindern. Als Vorbereitung auf diesen Versuch wurde ein Oligonukleotid entworfen, welches an das 3'-Ende des HCV-Konstruktes binden kann.

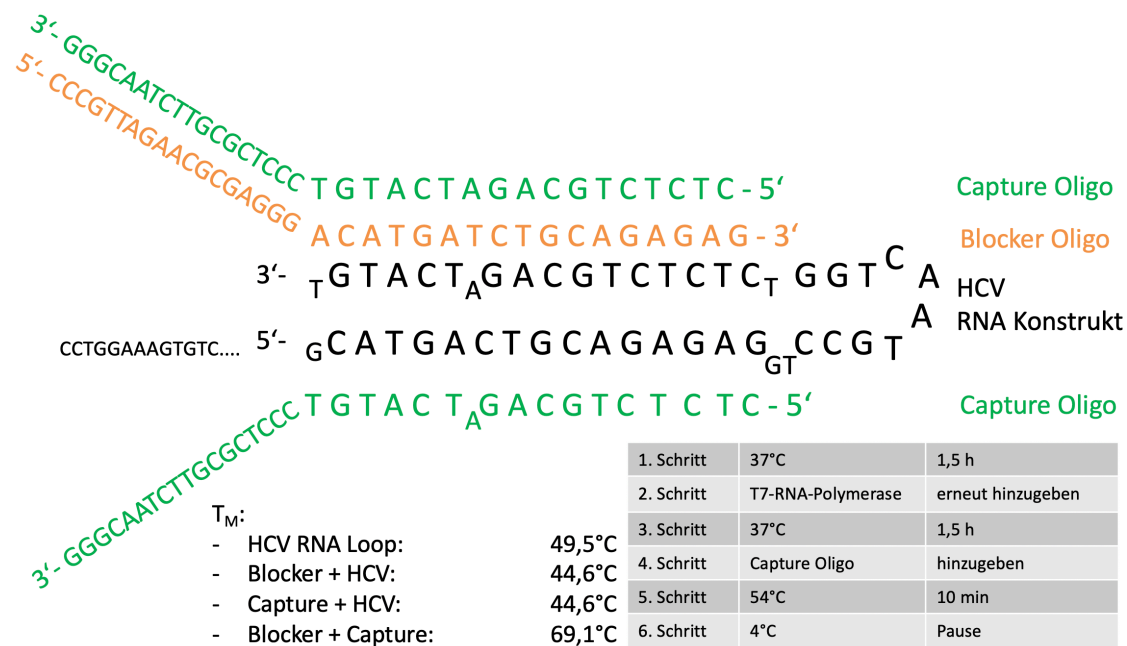


Abbildung 3-5: Übersicht Blocker-Oligonukleotid.

Die schwarze Sequenz zeigt die Sekundärstruktur der 3'UTR des HCV Konstrukt (**HCV RNA Konstrukt**). Die orange Sequenz zeigt das Blocker-Oligonukleotid und seine Bindungsstelle am HCV Konstrukt (**Blocker Oligo**). Die grüne Sequenz zeigt das Capture-Oligonukleotid, seine Paarungsstelle am Blocker-Oligonukleotid und seine Bindungsstelle am HCV Konstrukt (**Capture Oligo**). Zusätzlich werden in der Abbildung die Schmelztemperaturen (T_M) der verschiedenen Bindungen (Berechnung mit OligoCalc) und das Temperaturprofil der *in vitro*-Transkription angegeben (Tabelle unten rechts in der Abbildung). Quelle: Eigene Darstellung.

In der Abbildung 3-5 ist die Paarung des Blocker-Oligonukleotides und seine anschließende Bindung an das Capture-Oligonukleotid illustriert. Der Blocker (grüne Sequenz) wurde direkt in die *in vitro*-Transkription gegeben, um das 3'-Ende zu binden und seine Rückfaltung zu blockieren (Kapitel 2.2.17). Dadurch sollte dort keine Polymerase mehr ansetzen können und artifizielle Minusstränge produzieren. Nach der Inkubationszeit der *in vitro*-Transkription wurde zusätzlich das Capture-Oligonukleotid hinzugegeben und die Probe auf 54 °C erhitzt, da dort die Schmelztemperatur der HCV-3'UTR überschritten wurde, aber die Bindung zwischen Blocker- und Capture-Oligonukleotid noch stabil ist (siehe Temperaturprofil und T_M ²). Die beiden Oligonukleotide können daher eine feste Bindung eingehen. Das Capture-Oligonukleotid sollte das Blocker-Oligonukleotid komplett binden, damit es sich vom HCV-RNA-Ende ablöst und das 3'-Ende nicht mehr blockiert ist. Dadurch sollten Funktionseinschränkungen des Konstrukt in weiterführenden Versuchen vermieden werden. Dieses Prozedere wäre auch mit dem Capture-Oligonukleotid beginnend (Reihenfolge Blocker- und Capture-Oligonukleotid vertauscht) denkbar

² Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

und wurde entsprechend getestet. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser experimentellen Ansätze präsentiert.

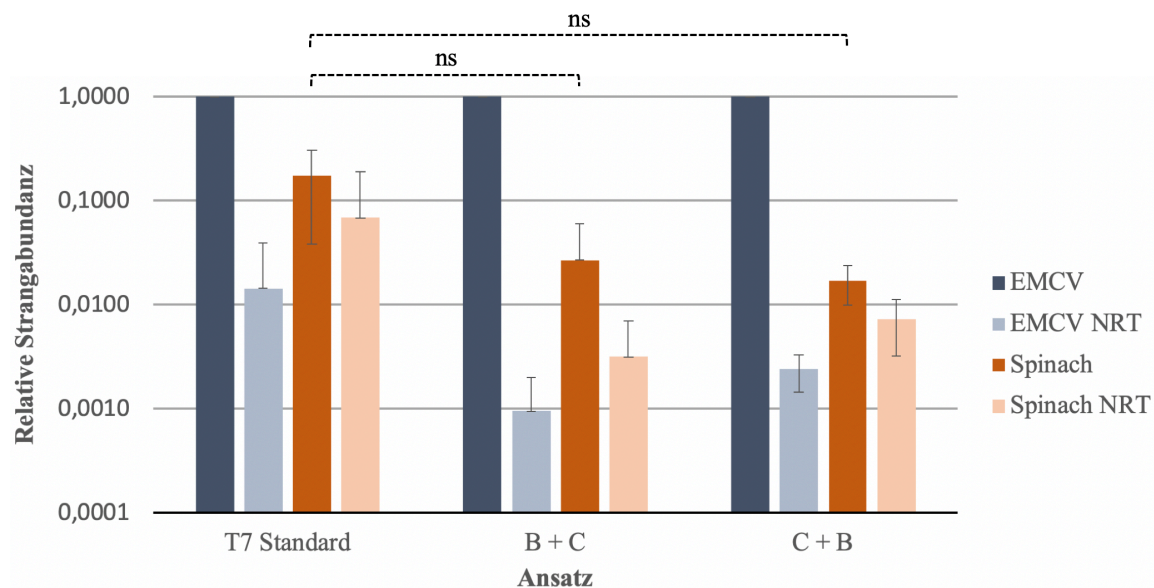


Abbildung 3-6: Verbesserungsversuch mit Blocker-Oligonukleotid.

Die Proben stammen aus *in vitro*-Experimenten ($n = 2$), wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **T7 Standard** Dieser Ansatz wurde nach dem Standardprotokoll behandelt. **B + C** Bei diesem Ansatz wurde der *in vitro*-Transkription ein Blocker-Oligonukleotid hinzugefügt, der später durch die Bindung an ein Capture-Oligonukleotid wieder entfernt wurde. **C + B** Dieser Ansatz entspricht dem B + C, mit dem Unterschied, dass die Reihenfolge von Blocker- und Capture-Oligonukleotid vertauscht wurde. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Minusstrangdetektion (ns). Die NRT Proben sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde (EMCV NRT, Spinach NRT). Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-6 stellt die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit einem Blocker-Oligonukleotid dar. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Proben (EMCV NRT, Spinach NRT) sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde, wodurch sie den durch residuale Plasmid-DNA induzierten Hintergrund der qPCR anzeigen. Hier zeigt sich scheinbar eine Verbesserung des Minusstrang-Hintergrundes (Spinach-Säulen bei B + C und C + B niedriger), welche sich bei statistischer Auswertung als nicht signifikant (ns) herausstellt. Die Reihenfolge, in der man die beiden Oligonukleotide verwendet, scheint das Ergebnis nicht maßgebend zu beeinflussen, da sich die beiden Ansätze B + C und C + B in ihrem Ergebnis nahezu entsprechen.

Schlussfolgerung: Die Anwendung eines Blocker-Oligonukleotides bringt keine signifikante Verbesserung des Minusstranghintergrundes. Die Reihenfolge in der die beiden Oligonukleotide verwendet werden scheint keinen Einfluss auf das Ergebnis zu haben. Dieser Ansatz wurde nicht weiterverfolgt.

3.2.3 SNAP Spinach Primer und Touch-Down-RT-Protokoll

Ein weiterer Versuch den Hintergrund zu verringern war die Verwendung eines anderen Primers für die die Minusstrang-Detektion. Die Sequenzen der Primer für diesen Versuchskomplex lauten wie folgt.

Standard Spinach Primer (No-SNAP):

5'- CCG TCC TTC ACC ATT TCA TT -3' $T_M: 49,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ³

SNAP Spinach Primer (SNAP):

5'- CTG AAT GAA ATG CCG TCC TTC ACC ATT TCA TTC AG -3' $T_M: 63,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁴

Der neue Primer hat eine von uns sogenannte „SNAP“-Funktion. Die beiden unterstrichenen Teile der Sequenz können aneinander paaren und eine Stammschleife bilden (engl. „*snap back*“). Dadurch soll gewährleistet sein, dass der Primer unterhalb der Schmelztemperatur dieses paarenden Bereichs insbesondere mit seinem 3'-Ende keine unspezifischen Bindungen mit RNA eingeht, da er in diesem Fall präferentiell in *cis* eine intramolekulare Bindung eingeht. Aufgrund der höheren Schmelztemperatur (T_M) des neuen Primers wurde das Protokoll der RT-Reaktion entsprechend angepasst und ein Touch-Down-RT-Protokoll (TD-Protokoll) verwendet (Kapitel 2.2.24). Hierbei wurde die Hybridisierung bei 70 °C gestartet und dann um 1 °C pro Minute auf 60 °C gesenkt. Die Abänderung soll eine spezifischere Hybridisierung des Primers gewährleisten. Der Rest des Protokolls entsprach dem Standard (Kapitel 2.2.24) und wurde als *in vitro*-Experiment durchgeführt.

³ Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

⁴ Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

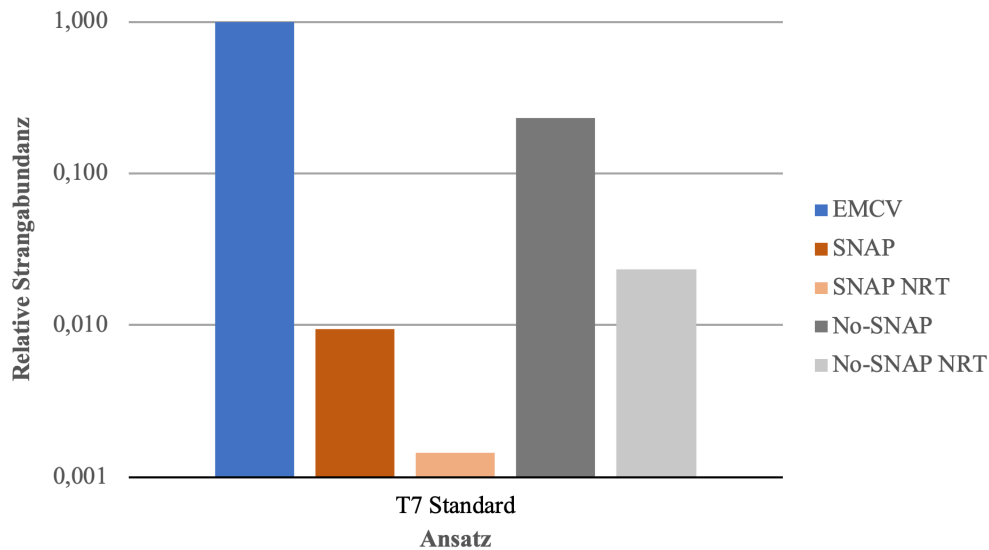


Abbildung 3-7: Verbesserungsversuch Spinach Primer mit SNAP-Funktion.

Die Proben stammen aus einem *in vitro*-Experiment ($n = 1$), wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **T7 Standard** Der Ansatz wurde mit einer Standard *in vitro*-Transkription, aber unterschiedlichen Primern (SNAP und No-SNAP), durchgeführt. **SNAP** ist der neue Spinach Primer mit SNAP-Funktion. **No-SNAP** ist der alter Spinach Primer ohne SNAP Funktion. Für beide Primer wurde das Touch-Down-RT-Protokoll verwendet. Die **NRT** Proben sind Kontrollproben, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde. Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

In der Abbildung 3-7 ist die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit dem neuen Spinach Primer dargestellt. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Proben (SNAP NRT, No-SNAP NRT) sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde, wodurch sie den Plasmid-DNA-induzierten Hintergrund der qPCR anzeigen. Der SNAP-Primer (SNAP) zeigt im Verhältnis zu den Plussträngen (EMCV) einen deutlich geringeren Minusstrang-Hintergrund als der Standard Spinach-Primer (No-SNAP). Auch der Plasmid-DNA-induzierte Hintergrund in der Kontrollprobe (SNAP NRT) weist hier eine Verbesserung gegenüber des Standard Spinach Primer (No-SNAP NRT) auf.

Schlussfolgerung: Die Verwendung des Spinach-Primers mit SNAP-Funktion in Kombination mit dem TD-Protokoll weist eine Verbesserung des Minusstrang-Hintergrundsignals auf und wurde bei allen folgenden Experimenten verwendet.

3.2.4 Neuer EMCV Primer

Aufgrund der Abänderungen im RT-Protokoll wurde im folgenden Versuchskomplex geprüft, ob eine Anpassung des EMCV Primers notwendig ist. Im Folgenden sind die Sequenzen, der für diesen Versuch verwendeten EMCV Primer, aufgeführt.

Standard EMCV Primer (EMCV):

5'- CCC CTT GTT GAA TAC GCT TG -3' T_M : 51,8 °C⁵

Neuer EMCV Primer (EMCV_neu):

5'- CCC TTG TTG AAT ACG CTT GAG GA -3' T_M : 55,3 °C⁶

Der Standard EMCV Primer wurde am 5'-Ende um ein Nukleotid verkürzt und am 3'-Ende um vier Nukleotide verlängert. Die Schmelztemperatur (T_M) erhöht sich damit auf 55,3 °C. Um die beiden Primer miteinander zu vergleichen wurde ein *in vivo*-Experiment durchgeführt, bei dem die Konstrukte hp_wt und I-II_wt transfiziert wurden. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels RT-qPCR analysiert.

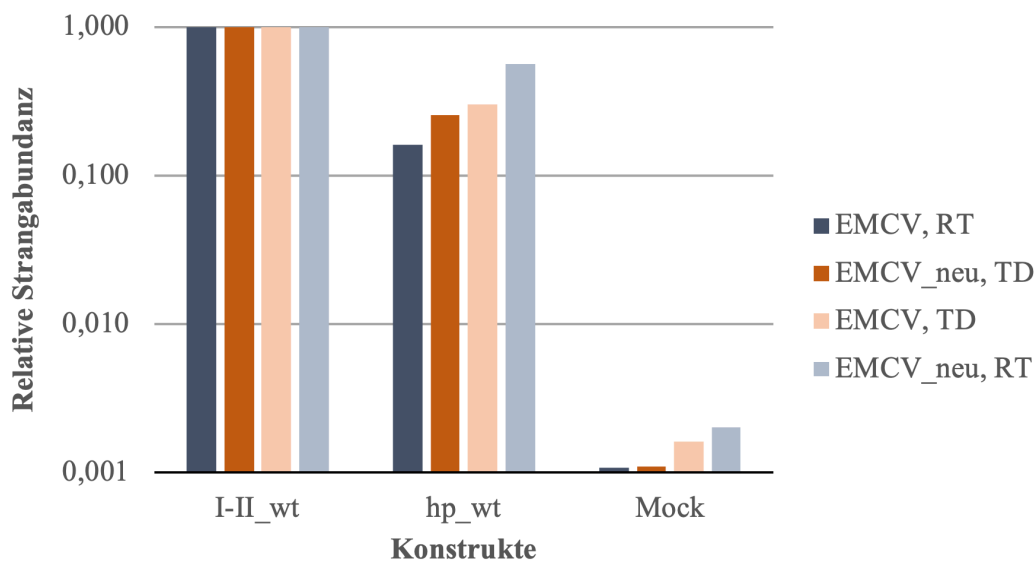


Abbildung 3-8: Verbesserungsversuch mit einem neuen EMCV Primer.

Die Proben stammen aus einem *in vivo*-Experiment (n = 1) 48 h nach der Transfektion, wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. Es wurden das replizierende Konstrukt **I-II_wt** und das nicht replizierende Konstrukt **hp_wt** transfiziert. **Mock** ist eine Negativkontrolle, bei der keine RNA transfiziert wurde. **EMCV, RT** Verwendung des Standard EMCV Primers und Standard-RT-Protokolls. **EMCV_neu, TD** Verwendung des neuen EMCV Primers und TD-Protokolls. **EMCV, TD** Verwendung des Standard EMCV Primers und TD-Protokolls. **EMCV_neu, RT** Verwendung des neuen EMCV Primers und Standard-RT-Protokolls. Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

⁵ Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

⁶ Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

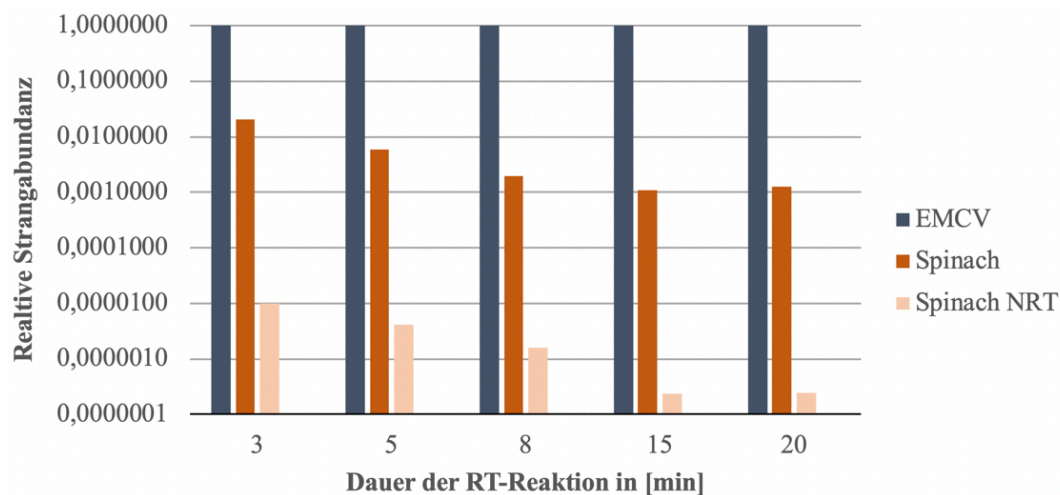
Die Abbildung 3-8 zeigt die Auswertung des Verbesserungsversuchs unter der Verwendung des neuen EMCV Primers (EMCV_neu) im Vergleich zum Standard EMCV Primer (EMCV). Des Weiteren wurden beide Primer sowohl mit dem Touch-Down-RT-Protokoll (TD) als auch mit dem Standard-RT-Protokoll (RT) getestet. Das Konstrukt hp_wt ist nicht replikationsfähig und gibt deshalb in Relation zu der Plusstrang-Abundanz des I-II_wt Konstrukt möglicherweise einen Hinweis auf ein Hintergrundsignal an. Unter diesem Gesichtspunkt hat, in diesem Versuch, die Kombination Standard EMCV Primer mit Standard-RT-Protokoll am besten funktioniert (EMCV, RT). Das zweitbeste Signal liefert der neue Primer in Kombination mit dem TD-RT-Protokoll (EMCV_neu, TD). Die Ergebnisse führten letztlich zu der Entscheidung den neuen EMCV Primer zu verwenden, obwohl er nur das zweitbeste Signal liefert, da man in diesem Fall die Primer für Plus- und Minusstrang-Detektion in derselben RT-Reaktion nach TD-Protokoll mit denselben Temperaturen benutzen kann und dieser Weg somit für die Praxis die beste Lösung darstellt.

Schlussfolgerung: Mit der Anwendung des neuen EMCV-Primers können Plus- und Minusstränge nach dem gleichen RT-Protokoll detektiert werden. Der neue EMCV-Primer wurde nun in allen folgenden Experimenten verwendet.

3.2.5 RT-Dauer

Abgesehen von der Änderung der Hybridisierungstemperatur wurde noch ein weiterer Versuch unternommen, das Hintergrundsignal in der qPCR durch Veränderung des RT-Protokolls zu verringern. In diesem Versuch wurde die Dauer der Reaktion von 3 min bis 20 min variiert. Diese Änderung stützt sich auf die Theorie, dass nach der Bildung der Haarnadelstruktur am 3'-Ende der HCV-Sequenz die Polymerase nicht genug Zeit haben soll, den artifiziellen Minusstrang bis zum sehr weit entfernt liegenden Spinach-Amplikon zu replizieren und damit ein höheres Hintergrund-Signal zu verursachen.

A



B

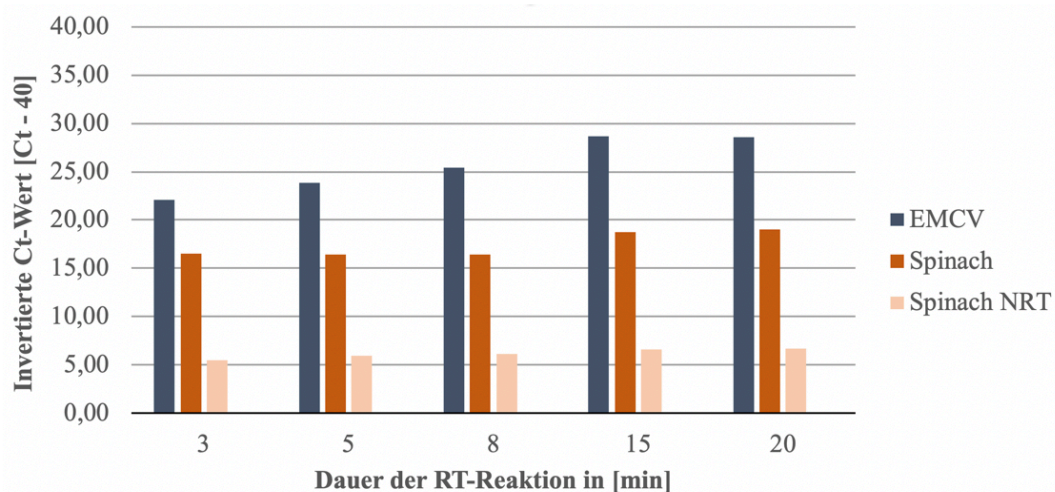


Abbildung 3-9: Verbesserungsversuch durch Verkürzung der RT-Dauer.

Die Proben stammen aus einem *in vitro*-Experiment (n = 1), wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten in **A** auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert und in **B** als invertierte Ct-Rohdaten dargestellt. **Spinach** Primer für Minusstrang-Detektion. **Spinach NRT** Kontrollprobe ohne Enzym in der RT-Reaktion. Die Dauer der RT-Reaktion in [min] wurde zwischen den Ansätzen variiert (3, 5, 8, 15, 20). Für das Diagramm **A** wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-9 veranschaulicht die Auswertung des Verbesserungsversuchs durch die Verkürzung der Dauer der RT-Reaktion. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei im Diagramm A auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Probe (Spinach NRT) ist eine Kontrolle, bei der kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde,

wodurch sie den Plasmid-DNA-induzierten Hintergrund der qPCR anzeigt. Das niedrigste Spinach-Minusstrang-Hintergrundsignal in Relation zu den Plussträngen zeigt sich in diesem Versuch bei einer RT-Dauer von 15 min (15). Eine drastische Verkürzung der Reaktionsdauer scheint sich negativ auf das Hintergrundsignal auszuwirken (3, 5), vermutlich durch eine drastische Reduzierung der Gesamt-Ausbeute der RT-Reaktion. Diese Vermutung wird durch eine invertierte Darstellung der Rohdaten verstärkt (Diagramm B), in der sich ein mit der Reaktionsdauer zunehmendes Plusstrangsignal zeigt (EMCV). Außerdem ist zu vermuten, dass die Gesamt-Ausbeute der RT-Produktion in Relation zur residualen kontaminierenden Plasmid-DNA steigt, was sich in den normalisierten Auswertungen an den (relativ betrachtet) niedrigeren Werten bei den NRT-Kontrollen ablesen lässt (deutlich zu sehen in Abbildung 3-9). Bei einer moderaten Verkürzung lässt sich eine Verbesserung allerdings nicht ausschließen (8). Aufgrund der Ergebnisse sollte ein weiterer Versuch zu diesem Versuchskomplex durchgeführt werden, der die Reaktionsdauern 8 min und 15 min genauer untersucht. Die Ergebnisse daraus werden in Abbildung 3-10 dargestellt.

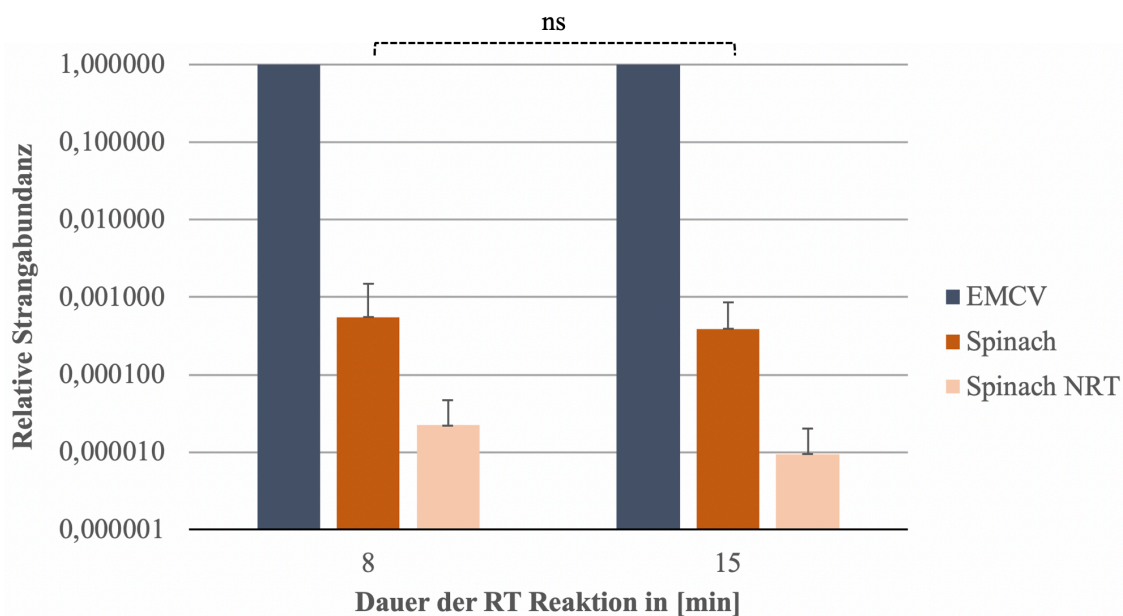


Abbildung 3-10: Genauere Betrachtung der RT-Dauern von 8 min und 15 min.

Die Proben stammen aus *in vitro*-Experimenten (n = 4) und wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **Spinach** Primer für die Minusstrangdetektion. **Spinach NRT** Kontrollprobe ohne Enzym in der RT-Reaktion. Die Dauer der RT-Reaktion betrug in einem Ansatz 8 min (8) und in dem anderen 15 min (15). Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in dem Signal der Minusstränge (ns). Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-10 zeigt die Auswertung des Wiederholungsversuchs, bei dem die Reaktionsdauern der RT-Reaktion von 8 min und 15 min im direkten Vergleich betrachtet werden sollten. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Probe (Spinach NRT) ist eine Kontrolle, bei der kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde, wodurch sie den Plasmid-DNA-induzierten Hintergrund der qPCR anzeigt. Vergleicht man das Minusstrang-Signal der Proben in Relation zu den Plussträngen zwischen den beiden Ansätzen miteinander, ergibt sich ein minimal besseres Ergebnis für die Dauer von 15 min (15), was sich in der Auswertung als nicht signifikant erweist.

Schlussfolgerung: Es konnte keine Verbesserung des Hintergrundsignals durch eine Verkürzung der Reaktionsdauer erreicht werden. Für die Dauer der RT-Reaktion wurde daher in den folgenden Experimenten weiterhin 15 min gewählt.

3.2.6 Spinach-Amplikon Blocker

Dieser Versuchskomplex verfolgt weiterhin den Ansatz, die Replikation des Spinach-Amplikons durch die Polymerase in der RT-Reaktion zu verhindern. Dafür wurde ein Blocker-Oligonukleotid entworfen (Spinach-Blocker), der stromabwärts („*downstream*“) des Spinach-Amplikons auf dem Plusstrang bindet und ein deaktiviertes 3'-Ende (C₃-Linker) besitzt. Damit soll das Spinach-Amplikon auf dem Plusstrang, beim Starten der Polymerase auf einer Haarnadelstruktur als Primer, von der Replikation ausgeschlossen werden und somit kein artifizielles Minusstrangsignal in der qPCR entstehen. Die anschließende Entfernung des Spinach-Blockers ist in diesem Versuch nicht notwendig, da für die folgende qPCR kein funktionelles 3'-Ende mehr benötigt wird. Ein Schema der Funktionsweise dieses neu entworfenen Spinach-Blockers ist in der Abbildung 3-11 dargestellt.

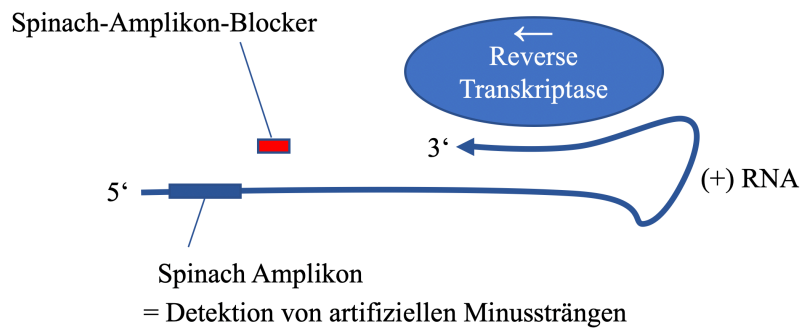


Abbildung 3-11: Schema Spinach-Amplikon-Blocker.

Die Abbildung zeigt ein Schema des Mechanismus, der für die Entstehung von artifiziellen Minussträngen denkbar ist. Das 3'-Ende der Plusstrang-RNA bildet über einen *hairpin* einen Primer für die reverse Transkriptase, welche dann fortlaufend die Minusstrangsequenz synthetisieren kann und damit für ein unerwünschtes Hintergrundsignal in der qPCR sorgen würde, wenn das Spinach Amplikon von der Synthese betroffen ist (**Spinach Amplikon**). Diese fortlaufende Transkription des Spinach Amplikons soll durch einen Blocker verhindert werden, der downstream des Amplikons auf dem Plusstrang bindet und ein deaktiviertes 3'-Ende besitzt (**Spinach-Amplikon-Blocker**).

Quelle: Eigene Darstellung.

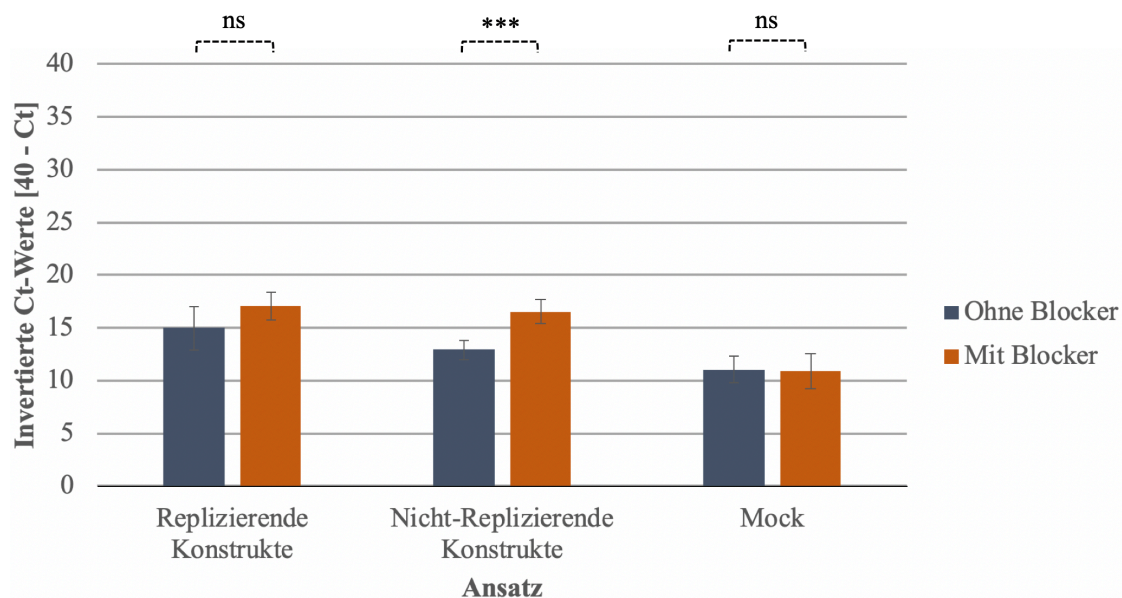


Abbildung 3-12: Spinach Blocker in der RT-Reaktion.

Die Proben stammen aus einem *in vivo*-Experiment ($n = 6$), bei dem die Minusstränge mit einer qPCR analysiert und die Ct-Werte anschließend invertiert wurden. **Replizierende Konstrukte** Hier wurden alle transfizierten Proben zusammengefasst, die replikationsfähig sind. **Nicht-Replizierende Konstrukte** Hier wurden alle transfizierten Proben zusammengefasst, die nicht replikationsfähig sind. **Mock** Kontrollprobe, bei der keine RNA transfiziert wurde. Die RT-Reaktionen der verschiedenen Ansätze wurden sowohl mit als auch ohne Blocker durchgeführt (**Ohne Blocker**, **Mit Blocker**). Bei den nicht replizierenden Konstrukten ergibt sich eine Signifikanz von $p < 0,001$ (***) bei den restlichen Proben ist der Unterschied nicht signifikant (ns).

In der Abbildung 3-12 ist die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit einem Spinach-Blocker in der RT-Reaktion im Vergleich zu der Standardreaktion ohne den Blocker dargestellt. Bei diesem Experiment wurden nur die Minusstränge analysiert und zwischen

den replizierenden Konstrukten und den nicht replizierenden Konstrukten unterschieden. Bei allen Ansätzen wurde die RT-Reaktion sowohl mit als auch ohne Spinach-Blocker durchgeführt. Anschließend wurden die erhobenen Ct-Werte invertiert (Invertierter Ct-Wert = $40 - \text{Ct-Wert}$). In der Abbildung stehen hohe Ct-Werte folglich für eine hohe Anzahl an detektierten Strängen. Die Auswertung zeigt, dass es bei den nicht replizierenden Konstrukten bei der Durchführung der RT-Reaktion durch den Spinach-Blocker zu einem signifikant höheren Minusstrangsignal kommt (***) . Dieses Signal soll bei nicht replizierenden Konstrukten aber möglichst gering sein, folglich zeigt sich ein erhöhtes Hintergrundsignal in der Minusstrang-Detektion. Im Ansatz der replizierenden Konstrukte zeigt sich kein signifikanter Unterschied, allerdings eine Tendenz zu einem stärkeren Signal (ns). Die Kontrollprobe zeigt sich unauffällig (ns).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass der Spinach-Blocker das Hintergrundsignal in der Minusstrangdetektion signifikant verstärkt. Die Gründe dafür sind unklar. Der Spinach-Blocker wurde deshalb nicht weiterverwendet.

3.3 DNA-induzierter qPCR-Hintergrund

Der zweite grundsätzliche Ansatzpunkt für die Verbesserung des Minusstrang-Hintergrundsignals liegt in der Verringerung des Plasmid-DNA-induzierten Signals in der qPCR. Als Grund wird hierbei ein unvollständiger Verdau der Template-DNA durch die DNase vermutet. Die folgenden Versuche haben das Ziel, die Template-DNA möglichst vollständig aus der Probe zu entfernen.

3.3.1 Turbo DNase

Die Vermutung eines unvollständigen DNase-Verdaus legt die Verwendung einer möglichst effizienten DNase nahe. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die DNase I (NEB) verwendet, die im weiteren Verlauf durch die TURBO DNase (Invitrogen) ersetzt wurde. Diese DNase besitzt laut Hersteller eine 50-fach höhere Aktivität und eine 350 % höhere katalytische Effizienz.

Schlussfolgerung: Da ein unvollständiger DNase-Verdau durch mangelnde Effizienz der DNase ausgeschlossen werden soll, wurde bei allen folgenden Experimenten die TURBO DNase verwendet.

3.3.2 Gel Extraktion

Dieser Versuchskomplex versucht das Problem des DNA-induzierten Hintergrundes in der qPCR zu lösen, indem auf den DNase-Verdau verzichtet wird. Als Alternative Methode wurde hier eine Nukleinsäureextraktion aus einem Agarose-Gel gewählt (Kapitel 2.2.18). Im Folgenden sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt.

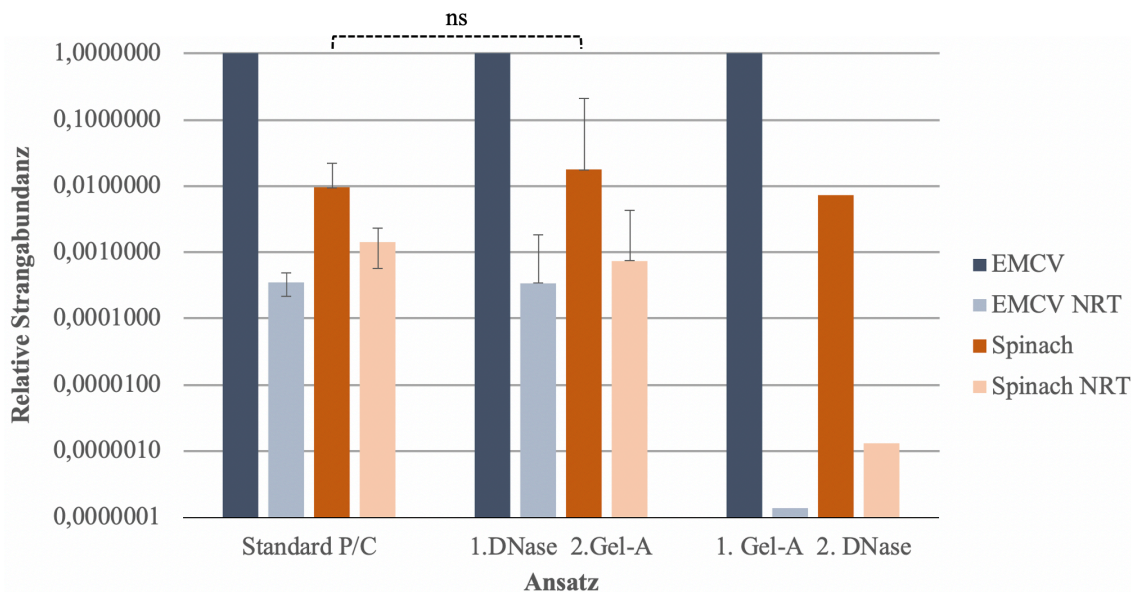


Abbildung 3-13: Verbesserungsversuch mit einer Gel-Aufreinigung.

Die Proben stammen aus *in vitro*-Experimenten, wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **Standard P/C** Diese Probe wurde nach dem Standardprotokoll mit Phenol/Chloroform aufgereinigt (n = 2). Die anderen beiden Ansätze wurden entweder zuerst mit einer DNase verdaut und dann aus einem Gel extrahiert (**1. DNase 2. Gel-A**; n = 2) oder in umgekehrter Reihenfolge (**1. Gel-A 2. DNase**; n = 1). Der Unterschied zwischen dem Standard und 1. DNase 2. Gel-A ist nicht signifikant (**ns**). Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-13 veranschaulicht die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit einer Nukleinsäureextraktion aus einem Agarose-Gel. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT-Proben (EMCV NRT, Spinach NRT) sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde, wodurch sie den DNA-induzierten Hintergrund der qPCR anzeigen. Bei der Anwendung einer Gel-Aufreinigung nach einem DNase-Verdau (1. DNase 2. Gel-A) zeigt sich keine signifikante Veränderung der Werte im Vergleich zum Standardprotokoll (Standard P/C). Betrachtet man allerdings die Variante, bei der die Gel-Aufreinigung vor

dem DNase-Verdau durchgeführt wurde, fällt auf, dass die Kontrollproben (EMCV NRT, Spinach NRT) ein sehr geringes DNA-Hintergrundsignal anzeigen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse durch den Tausch der Reihenfolge ist, dass bei einem DNase-Verdau Oligonukleotide entstehen, die dann im Gel durch die RNA-Probe laufen und diese kontaminieren, oder sogar auf die RNA hybridisieren und später als ungewünschte RT-Primer dienen können. Die Versuchszahl ist mit $n = 1$ sehr gering, was der geringen Ausbeute der RNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel geschuldet ist. Es wurden mehrere Anläufe benötigt, um eine ausreichende Ausbeute für ein *in vitro*-Experiment zu gewinnen. Aufgrund der geringen Ausbeute gelang es nach mehreren Versuchen nicht ein sinnvolles *in vivo*-Experiment durchzuführen.

Weiterhin ist anzumerken, dass sich, trotz der geringeren DNA-Kontamination im Ansatz „1. Gel-A 2. DNase“, die Spinach-Säule im Vergleich zur Standarduntersuchung kaum verändert hat. Dieses kann ein Hinweis darauf sein, dass das Hintergrund-Signal überwiegend nicht durch eine DNA-Kontamination verursacht wird, sondern auch durch „*copy back*“-Transkription oder reverse Transkription an umgefalteten 3'-Enden der RNA.

Schlussfolgerung: Aufgrund der geringen Ausbeute bei der RNA-Extraktion aus dem Gel erweist sich die Methode trotz der offensichtlichen Verringerung des DNA-Hintergrund-Signals als nicht praktikabel für *in vivo*-Versuche und wurde deshalb nicht weiterverwendet. Allerdings lässt sich aus diesen Ergebnissen der Hinweis ziehen, dass die, nach der *in vitro*-Transkription und dem DNase-Verdau, noch vorhandene kontaminierende Plasmid-DNA nicht das einzige Problem für das Hintergrund-Signal bei der Minusstrang-Detektion darstellt, sondern vermutlich auch „*copy back*“-Transkription oder reverse Transkription an umgefalteten 3'-Enden der RNA eine wichtige Rolle spielen.

3.3.3 LiCl Fällung

In diesem Versuchskomplex wurde ausprobiert, ob sich die RNA im Rahmen der Experimente dieser Arbeit mit Lithiumchlorid (LiCl) besser fällen lässt. LiCl soll selektiv RNA, nicht aber DNA fällen, sodass dabei die kontaminierende Plasmid-DNA angereichert werden sollte. Das Standardprotokoll sieht eine Fällung mit Ethanol vor, welche in dieser Versuchsreihe bei Schritt 14 (Überblick 2.2.1) durch eine LiCl-Fällung ersetzt wurde (1x LiCl). In einem anderen Ansatz wurde ebenfalls die Ethanolfällung bei

Schritt 14 und zusätzlich die Aufreinigung mit Kit bei Schritt 21 (Überblick 2.2.1) durch eine LiCl-Fällung ersetzt (2x LiCl).

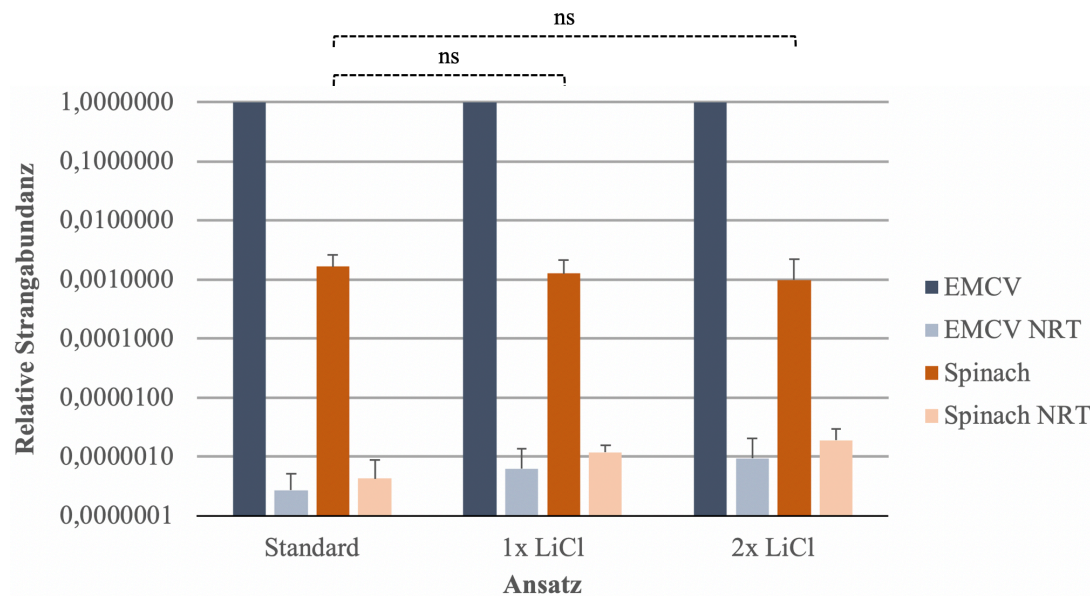


Abbildung 3-14: Verbesserungsversuch mit LiCl-Fällung.

Die Proben stammen aus *in vitro*-Experimenten (n = 2), wurde mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf den Plusstrang (EMCV) normalisiert. **Standard** Die Proben wurden nach dem Standardprotokoll mit Ethanol gefällt. **1x LiCl** Die Ethanol-fällung nach der Transkription wurde durch eine LiCl-Fällung ersetzt (siehe Überblick 2.2.1). **2x LiCl** Zusätzlich zur Ethanol-fällung nach der Transkription wurde auch die Aufreinigung mit dem Kit vor der RT-qPCR durch eine LiCl-Fällung ersetzt. Beide Ansätze zeigen keine signifikante Veränderung im Minusstrang-Hintergrundsignal (ns). Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Die Abbildung 3-14 zeigt die Auswertung des Verbesserungsversuchs mit einer LiCl-Fällung. Die Ct-Werte der Minusstränge (Spinach) wurden hierbei auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert, um eine bessere Darstellung der Relation von Minus- zu Plussträngen zu bekommen. Die NRT Proben (EMCV NRT, Spinach NRT) sind Kontrollen, bei denen kein Enzym zur RT-Reaktion gegeben wurde, wodurch sie den durch residuale Plasmid-DNA induzierten Hintergrund bei der qPCR anzeigen. Es zeigt sich keine signifikante Verbesserung des Minusstrang-Hintergrundsignals (ns). Die Tendenz zeigt eher eine Verschlechterung des DNA-induzierten Hintergrundes, wenn man die Kontrollproben (Spinach NRT) vom Standardprotokoll (Standard) mit denen der anderen beiden Versuchsansätzen vergleicht (1x LiCl, 2x LiCl).

Schlussfolgerung: Eine LiCl-Fällung anstatt einer Ethanol-fällung bringt keine Verringerung des Minusstrang-Hintergrundes mit sich und wurde deswegen nicht weiterverwendet.

3.3.4 Streptavidin-Beads Aufreinigung

In diesem Versuchskomplex sollte ebenfalls versucht werden das DNA-Template ohne einen DNase-Verdau aus der Probe zu entfernen. Hier wurde der Ansatz verfolgt, dass das Template mit einer PCR hergestellt wird, bei der biotinylierte Primer zum Einsatz kommen (Kapitel 2.2.28). Dadurch war es möglich das Template in Folgeschritten an Streptavidin-Beads zu binden und auf diese Weise aus der Probe zu entfernen (Kapitel 2.2.29).

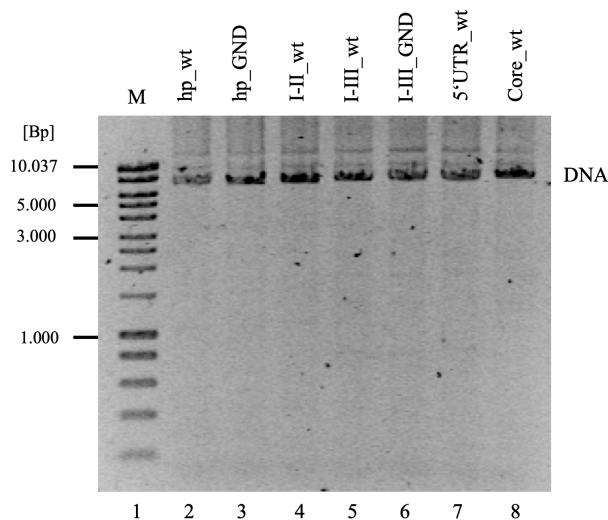


Abbildung 3-15: Agarose-Gel der PCR mit biotinylierten Primern.

Die Abbildung zeigt eine 0,8 %-Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte unter Verwendung von biotinylierten Primern. Als Größenstandard **M** wurde der Hyper Ladder I aufgetragen (**1**). Die PCR wurde mit allen HCV-Konstrukten durchgeführt (**2 – 8**). Die PCR-Produkte (**2 – 8**) laufen auf einer Höhe von ca. 9000 – 10.000 Basenpaaren (**bp**).

Eine Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte ist in Abbildung 3-15 dargestellt. Die Banden (**2 – 8**) sind scharf abgrenzbar, und das Template hat die richtige Länge (ca. 9.000 - 10.000 bp).

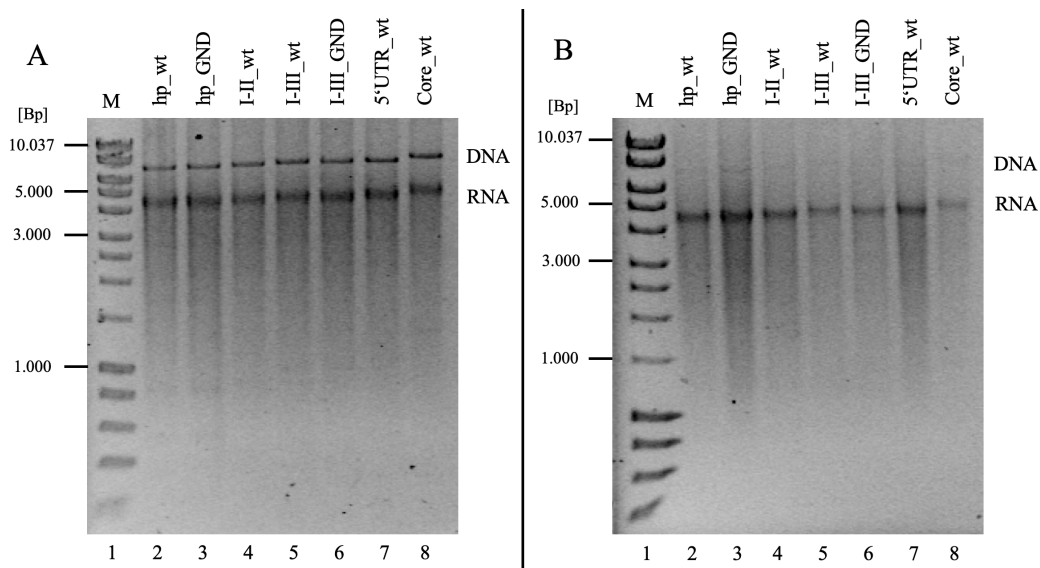


Abbildung 3-16: Agarose-Gel der *in vitro*-Transkription von den biotinylierten Templates.

Die Abbildung zeigt eine 0,8 %-Agarose-Gelelektrophorese der Produkte einer *in vitro*-Transkription mit biotinyliertem Template vor (A) und nach (B) Entfernung der DNA. Es wurde jeweils die Hyper Ladder I als Größenstandard M aufgetragen (1). Die Gelelektrophorese wurde jeweils mit allen HCV-Konstrukten (2 – 8) durchgeführt. A zeigt die Produkte direkt nach der *in vitro*-Transkription. Das DNA-Template läuft auf einer Höhe von ca. 9.000 – 10.000 Basenpaaren (bp) und die RNA läuft auf einer Höhe von ca. 4.000 – 4.800 bp (entsprechend einer RNA Länge von 7.100 – 7.900 nt). B zeigt dieselben Proben nach einer Aufreinigung mit Streptavidin Beads. Die RNA läuft auch hier auf einer Höhe von ca. 4.000 – 4.800 bp (2 – 8).

Die Abbildung 3-16 zeigt Kontroll-Gele der Produkte einer *in vitro*-Transkription mit den biotinylierten Templates aus Abbildung 3-15. Die entstandene RNA ist gut als Bande abgrenzbar (2 – 8) und läuft auf der erwarteten Höhe. Die in A erkennbare DNA-Bande ist nach der Aufreinigung mit Streptavidin Beads (Kapitel 2.2.29) in B kaum noch zu erkennen. Es lässt sich allerdings bei fast allen Proben eine sehr dezente DNA-Bande (2 – 8) erkennen.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche PCR und eine erfolgreiche *in vitro*-Transkription. Die Streptavidin-Beads Aufreinigung war erfolgreich und die Auswirkungen sollen in einem *in vivo*-Experiment weiter untersucht werden.

In Abbildung 3-17 sind die Ergebnisse des oben genannten *in vivo*-Experimentes dargestellt. Mit dem Versuch sollte untersucht werden, ob die Aufreinigung des biotinylierten Templates mit Streptavidin-Beads eine Verbesserung des DNA-induzierten qPCR-Hintergrundes bringt. Hierzu wurden zum einen Proben nach dem Standardprotokoll (Standard) transfiziert und nach 4 h und 48 h lysiert und zum anderen die Proben aus

Abbildung 3-16 (Biotin). Des Weiteren wurden für beide Ansätze sowohl replizierende als auch nicht replizierende HCV-Konstrukte verwendet. Bei allen Proben wurden mittels qPCR Plusstränge (EMCV) und Minusstränge (Spinach) detektiert. Außerdem gibt es für die Minusstränge eine Kontrollprobe (Spinach NRT), bei der in der RT kein Enzym verwendet wurde und die damit den Plasmid-DNA-induzierten Hintergrund anzeigt. Sämtliche Daten wurden auf die Plusstränge normalisiert. Vergleicht man die Spinach- und Spinach NRT-Säulen miteinander zeigt sich weder bei 4 h (A) noch bei 48 h (B) nach Transfektion eine signifikante Verbesserung des DNA-induzierten Hintergrundes. Es lässt sich lediglich eine Tendenz zur Verbesserung bei den nicht replizierenden Konstrukten 48 h nach der Transfektion erkennen (B, Spinach und Spinach NRT bei nicht replizierend). Es gilt weiterhin anzumerken, dass die Methode der Template-Biotinylierung und Aufreinigung mit Streptavidin-Beads mit hohen Verlusten einher ging und die Ausbeute nur sehr knapp für die Experimente gereicht hat.

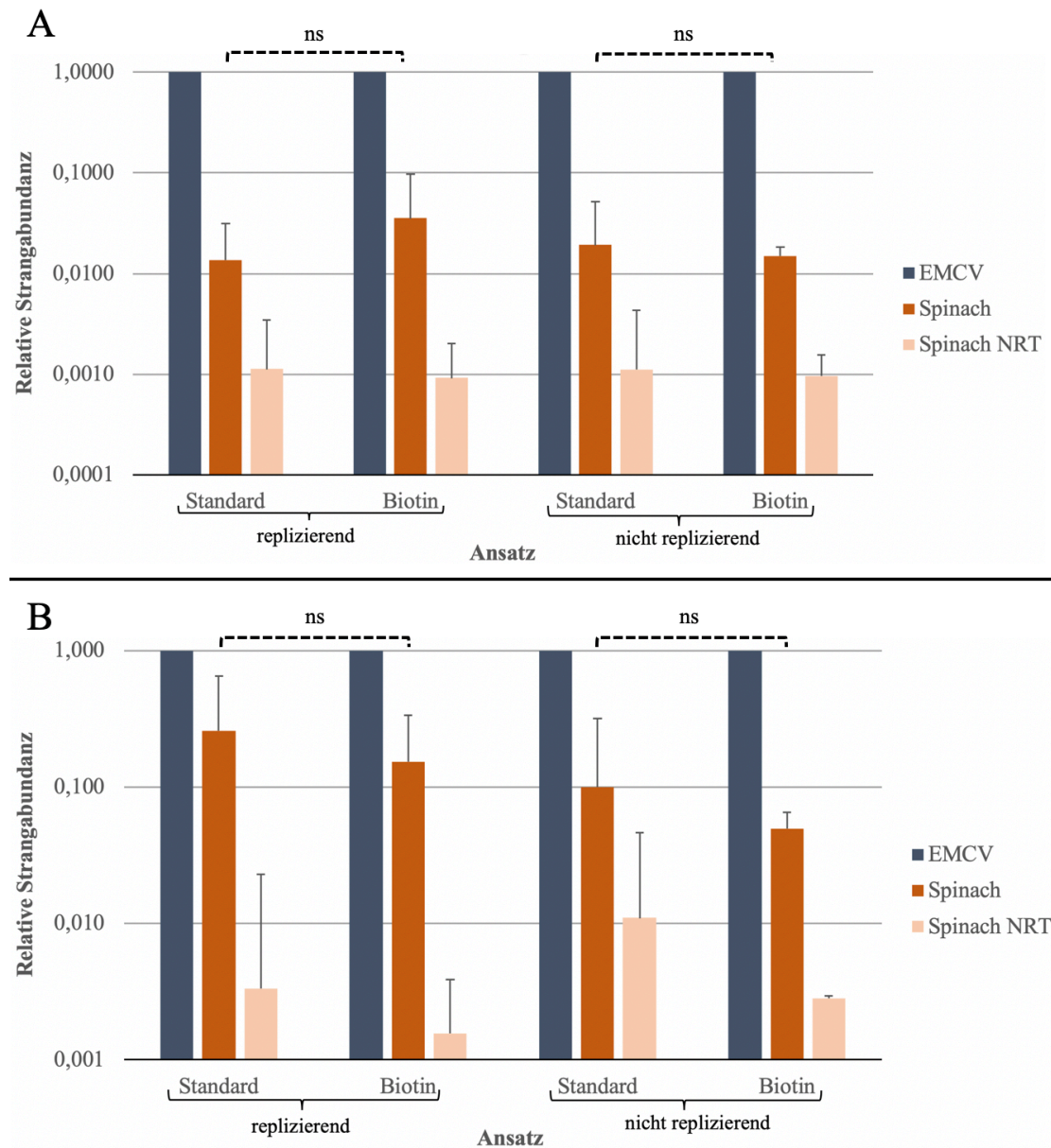


Abbildung 3-17: Verbesserungsversuch mit Biotin-Primern.

Die Proben stammen aus *in vivo*-Experimenten (n = 6; Ausnahme: Biotin Spinach NRT mit n = 2) 4 h (A) und 48 h (B) nach Transfektion, wurden mit einer RT-qPCR analysiert und die Daten auf die Plusstränge (EMCV) normalisiert. **Standard** Diese Proben wurden nach dem Standardprotokoll behandelt. **Biotin** Bei diesen Proben wurde das Template der *in vitro*-Transkription mit einer PCR hergestellt und anschließend mit Streptavidin Beads aufgereinigt. Für beide Versuchsansätze (Standard, Biotin) wurden jeweils replizierenden und nicht replizierenden HCV-Konstrukte transfiziert (**replizierend**, **nicht replizierend**). Der statistische Unterschied im Minusstranghintergrundsignal ist nicht signifikant (**ns**). Für das Diagramm wurde eine logarithmische Skalierung verwendet.

Schlussfolgerung: Die Biotinylierung des Template mit anschließender Aufreinigung durch Streptavidin-Beads brachte keine signifikante Verbesserung des DNA-induzierten Hintergrundes. Die Ausbeute der *in vitro*-Transkription bei diesem Versuchsablauf war für die Routineanwendung zu gering. Dieser Ansatz wurde nicht weiterverfolgt.

3.4 qPCR-Analyse der HCV-Minusstrangsynthese

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der abschließenden *in vivo*-Experimente dargestellt. Mit diesen Experimenten sollten die Auswirkungen der Modifikationen des Protokolls im Kontext und die Fähigkeit der unterschiedlichen Konstrukte zur Minusstrangsynthese erfasst werden. Für die Versuchsreihe wurde das etablierte Protokoll von L. Shalamova (Shalamova, 2018) nach den Ergebnissen des *Troubleshooting* (Kapitel 3.2; Kapitel 3.3) modifiziert. Es wurde die TURBO-DNase statt der DNase I (Kapitel 3.3.1), der Spinach-Primer mit SNAP-Funktion statt des normalen Primers (Kapitel 3.2.3), der verlängerte EMCV-Primer statt des alten Primers (Kapitel 3.2.4) und das TD-Protokoll statt des Standard-RT-Protokoll (Kapitel 3.2.3) verwendet. Es wurden replizierende (I-II_wt, I-III_wt, 5'UTR_wt und Core_wt) und nicht replizierende Konstrukte (hp_wt, hp_GND, I-III_GND) transfiziert und die Zellen dann zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion) lysiert. Die qPCR-Daten wurden dann auf den 48 h Wert des I-III_wt Konstruktes normalisiert, da zu diesem Zeitpunkt der Höhepunkt der Minusstrang-Abundanz angenommen wird und das I-III_wt Konstrukt im Rahmen der durchgeführten Experimente am besten replizierte. Die Abbildung 3-18 zeigt die Auswertung dieses Experimentes.

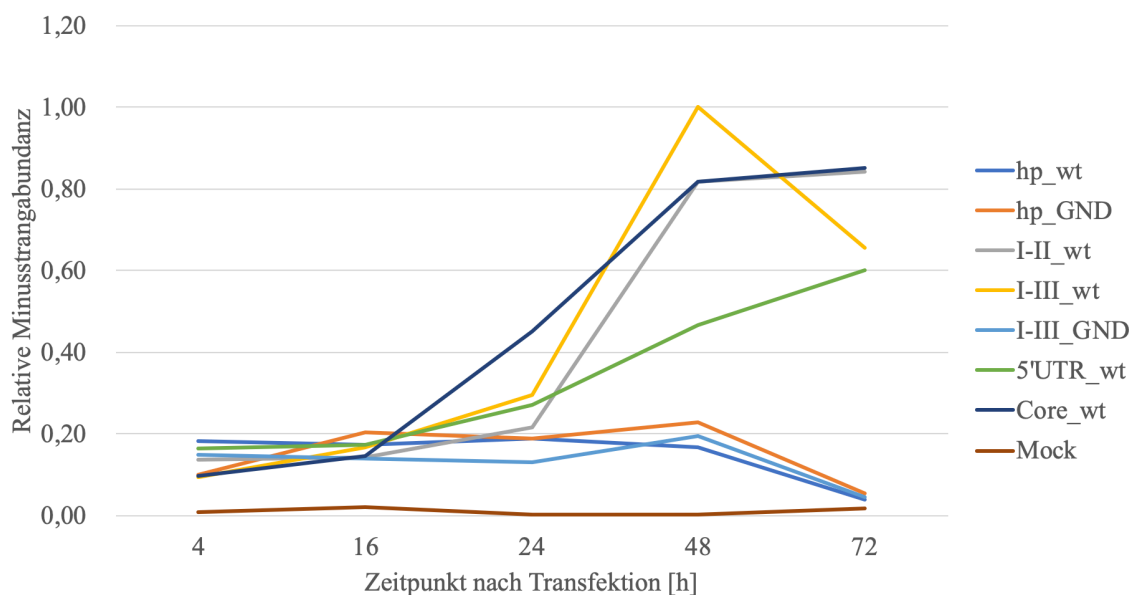


Abbildung 3-18: Relative Minusstrang-Abundanz verschiedener HCV-Konstrukte in einem 4 - 72 h Zeitverlauf.

Die Proben stammen aus *in vivo*-Experimenten (n = 4), wurden mit einer RTqPCR analysiert und die Daten auf den 48 h Ct-Wert von I-III_wt normalisiert. Das Experiment wurde mit 7 verschiedenen HCV-Konstrukten durchgeführt. Mock ist eine Kontrollprobe, bei der keine RNA transfiziert wurde. Standardabweichungen sind in dieser Abbildung aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt.

In der Abbildung 3-18 sind die relativen Minusstrang-Abundanzen in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt nach Transfektion dargestellt. Die Konstrukte I-II_wt, I-III_wt, 5'UTR_wt und Core_wt zeigen zwischen den Zeitpunkten 4 h und 48 h eine steigende Replikation der Minusstränge. Die Effizienz der Replikation unterscheidet sich dabei zwischen den unterschiedlichen Konstrukten, wobei I-III_wt das stärkste Signal zum Zeitpunkt 48 h aufweist. Die Konstrukte hp_wt, hp_GND und I-III_GND zeigen keine Minusstrang-Replikation, ihre relative Minusstrang-Abundanz fällt bis 72 h auf Mock-Level. Die Mock Probe ist eine Kontrolle bei der keine RNA transfiziert wurde und zeigt sich in dieser Abbildung über alle Zeitpunkte hinweg als negativ. Des Weiteren ist das Hintergrundsignal bei 4 h nach Transfektion auffällig, es stellt einen Anteil von ca. 10 - 20 % vom maximalen Signal bei 48 h dar. Im Vergleich zum vorherigen Protokoll nach L. Shalamova, wo der Hintergrund auch bei ca. 10 - 20 % lag, wurde das Hintergrundsignal nicht gesenkt und ist noch viel zu hoch. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Daten von L. Shalamova auf das Konstrukt I-II_wt normalisiert wurden. In dieser Arbeit wurde eine Normalisierung auf I-III_wt gewählt, weil es das am besten replizierenden Konstrukt zu sein scheint. Für eine bessere Vergleichbarkeit werden im Folgenden die gleichen Daten aus Abbildung 3-18 auf I-II_wt normalisiert dargestellt.

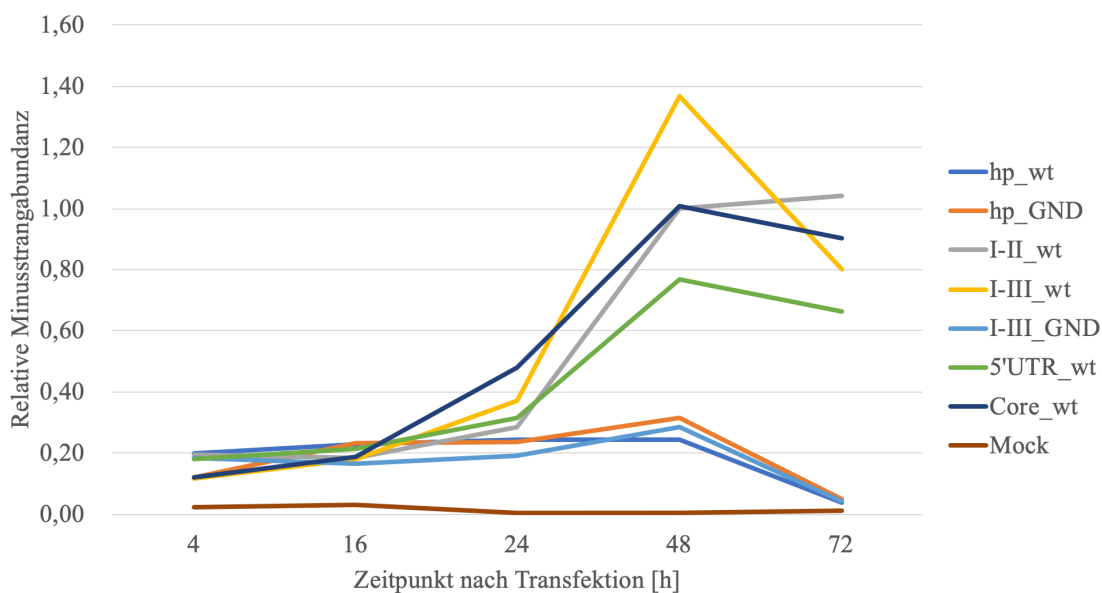


Abbildung 3-19: 4 – 72 h Zeitverlauf-Experiment mit einer Normalisierung auf das I-II_wt Konstrukt.

Dargestellt sind die relativen Minusstrang-Abundanzen verschiedener HCV Konstrukte in einem 4 – 72 h Zeitverlauf. Die Proben stammen aus *in vivo*-Experimenten (n = 4), wurden mit einer RTqPCR analysiert und die Daten auf den 48 h Ct-Wert von I-II_wt normalisiert. Das Experiment wurde mit 7 verschiedenen HCV-Konstrukten durchgeführt. Mock ist eine Kontrollprobe, bei der keine RNA transfiziert wurde. Standardabweichungen sind in dieser Abbildung aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt.

In der Abbildung 3-19 zeigen sich, im Vergleich zu Abbildung 3-18, leicht erhöhte relative Minusstrang-Abundanzen der nicht replizierenden Konstrukte. Des Weiteren zeigt sich auch ein erhöhtes Maximum des I-III_wt Konstruktes bei 48 h. Vergleicht man nun den Anteil des Hintergrund-Signals am Maximum-Signal zwischen der Datenreihe von L. Shalamova und der in dieser Arbeit erhobenen, so zeigt sich kein wesentlicher Unterschied. Es wurden die Daten von L. Shalamova, welche auf I-II normalisiert wurden, mit den Datenreihen aus der Abbildung 3-19 (die Ergebnisse dieser Arbeit auf I-II_wt normalisiert) und Abbildung 3-18 (die Ergebnisse dieser Arbeit auf I-III_wt normalisiert) verglichen. Das Verhältnis wurde hierbei aus dem durchschnittlichen 4 h-Wert der nicht replizierenden Konstrukte (hp_wt, hp_GND, I-III_GND) und dem 48 h-Wert des Konstruktes I-III_wt gebildet, weil dieses in den vorliegenden Daten beider Arbeiten am stärksten repliziert. Bei dieser Rechnung ergaben sich durchschnittliche Hintergrundanteile von ca. 12 % (L. Shalamova Daten normalisiert auf I-II_wt), 12 % (die Ergebnisse dieser Arbeit normalisiert auf I-II_wt) und 12 % (die Ergebnisse dieser Arbeit normalisiert auf I-III_wt).

Schlussfolgerung: Die Veränderungen im Protokoll haben keine Senkung des Hintergrundsignales ergeben.

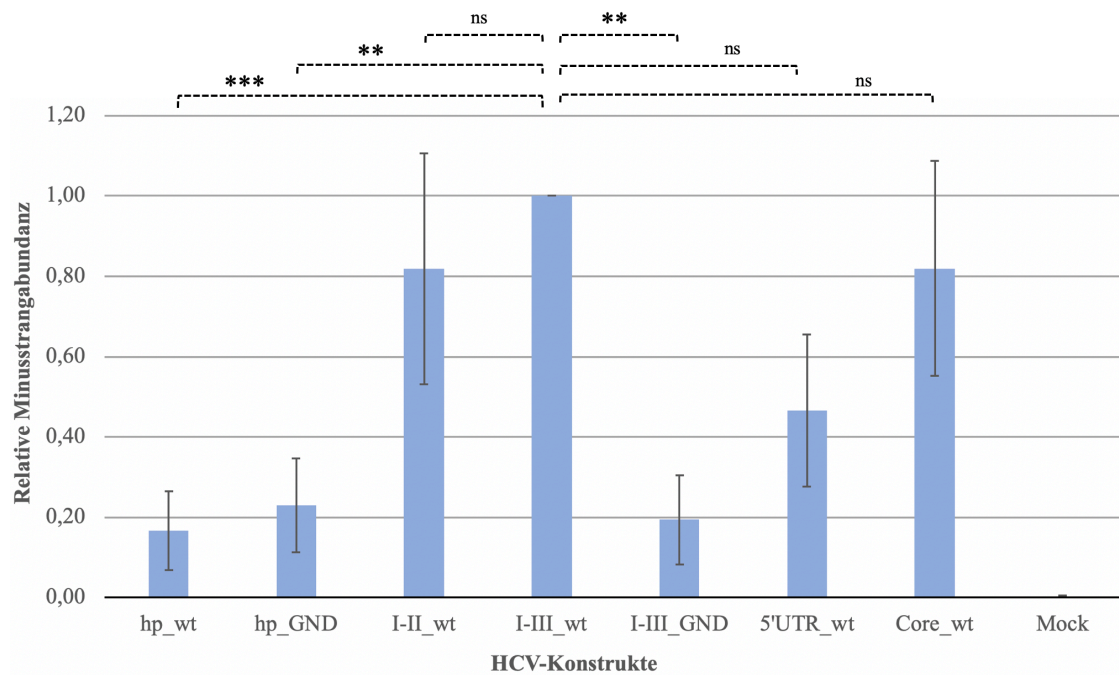


Abbildung 3-20: Relative Minusstrang-Abundanz verschiedener HCV-Konstrukte 48 h nach Transfektion.

Die Proben stammen aus einem *in vivo*-Experiment (n = 4) 48 h nach Transfektion, wurden mit einer qPCR analysiert und die Daten auf den 48 h Ct-Wert von I-III_wt normalisiert. Das Experiment wurde mit 7 verschiedenen HCV-Konstrukten durchgeführt. Mock ist eine Kontrollprobe, bei der keine RNA transfiziert wurde. Die Markierungen über dem Diagramm zeigen die Signifikanzen der Unterschiede (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns = nicht signifikant).

In Abbildung 3-20 wurde der Zeitpunkt 48 h nach der Transfektion als Säulendiagramm dargestellt, um die Unterschiede in der Replikationsfähigkeit genauer zu betrachten. Für die Abbildung wurden die gleichen Daten wie in Abbildung 3-18 verwendet. Die statistische Auswertung zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich des I-III_wt-Konstrukt zu den Konstrukten hp_wt, hp_GND und I-III_GND. Die qPCR Analyse hat damit erfolgreich zwischen replizierenden und nicht replizierenden Konstrukten unterschieden. Die Konstrukte I-II_wt, 5'UTR_wt und Core_wt zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Replikation zu dem Konstrukt I-III_wt. Die Mock Probe ist eine Kontrollprobe, bei der keine RNA transfiziert wurde, und zeigt sich hier negativ.

Schlussfolgerung: Die qPCR Analyse der *in vivo*-Experimente zeigt eine konstruktsspezifische Detektion der Minusstränge. Es bleibt weiterhin ein Hintergrundsignal von ca. 12 %.

4 Diskussion

Die Erforschung von Viren und deren Replikationszyklen ist die Basis für die Entwicklung von Strategien, um die durch sie ausgelösten Krankheiten zu bekämpfen. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines Verfahrens zur spezifischen Detektion der Minusstrang-Replikation von HCV, unabhängig von der Plusstrang-Replikation. L. Shalamova entwarf ein Protokoll, welches konstruktsspezifische Minusstrang-Abundanzen nachweisen kann, aber ein relativ hohes Hintergrundsignal detektiert (Shalamova, 2018). Das Ziel dieser Arbeit war es den Grund für das Hintergrundsignal zu finden und das Protokoll so anzupassen, dass das Hintergrundsignal möglichst weit reduziert wird und keine Einschränkungen für die Aussagekraft hat.

Bevor Versuche zur Modifikation des Versuchsprotokoll mit dem Ziel der Hintergrundreduktion durchgeführt wurden, wurde ein PAA-Gel von den RT-PCR-Produkten gemacht, welches das Vorhandensein von einem Hintergrund zeigt (Kapitel 3.1.3). In der Abbildung 3-3 sind deutlich die erwarteten Minusstrang-Produkte als kräftige Banden bei den replizierenden Konstrukten zu erkennen. Es zeigen sich allerdings auch Banden in den Proben, bei denen nicht-replizierende Konstrukte transfiziert wurden. Dieses ist der Nachweis für ein Hintergrundsignal, welches im Rahmen der qPCR auch als solches detektiert wird (Abbildung 3-18).

Daraufhin wurde das bereits etablierte Protokoll nach ausführlicher Fehleranalyse durch die Verwendung einer anderen DNase und einem geänderten RT-Protokoll modifiziert. Viele weitere Verbesserungsversuche brachten jedoch keine Verbesserung oder erwiesen sich, wegen zu geringer Ausbeute an RNA, in der Praxis als nicht praktikabel für die Routine. Der Verbesserungsversuch mit einer Gel-Aufreinigung brachte beispielsweise den Hinweis hervor, dass sowohl *copy back*-Transkription als auch Plasmid-DNA-Verunreinigung eine Rolle beim Hintergrund-Signal spielen können, konnte aber aufgrund mangelnder RNA-Ausbeute nicht weiterverfolgt werden (Abbildung 3-13).

Ein abschließendes Transfektions-Experiment im 72 h Zeitverlauf mit dem modifizierten Protokoll zeigte eine konstruktsspezifische Detektion der Minusstrangreplikation und keine Verbesserung des Hintergrundsignals (Abbildung 3-18).

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 *in vitro*-Transkription

Eine *in vitro*-Transkription unter *high yield* Konditionen mit einer T7 Polymerase ist gut für die Gewinnung von großen Mengen an RNA und einer folgenden Transfektion mit mehreren Zeitpunkten geeignet. Die Methode hat allerdings auch ihre Limitationen, wenn es innerhalb des Experimentes zum Einsatz einer hochsensitiven qPCR-Analyse kommt. Die *in vitro*-Transkription wurde in den anfänglichen Überlegungen als ein möglicher Ursprung für den Hintergrund in der qPCR identifiziert. Schon vor langer Zeit wurde die Existenz von Nebenprodukten bei einer *in vitro*-Transkription mit T7 RNA Polymerasen beschrieben (Cazenave & Uhlenbeck, 1994; Schenborn & Mierendorf Jr, 1985). In weiteren Untersuchungen wurde beschrieben, dass vor allem eine instabile Sekundärstruktur des 3'-Ende eines Template und eine hohe Konzentration an UTP als allosterischer Cofaktor der Polymerase für die Entstehung von längeren Produkten verantwortlich seien (Nacheva & Berzal-Herranz, 2003; Triana-Alonso et al., 1995). Auch aktuelle Veröffentlichungen beschreiben das Vorhandensein von längeren Nebenprodukten (Gholamalipour et al., 2018). Durch RNASeq wurden die Eigenschaften der Nebenprodukte analysiert und ein Mechanismus für das Zustandekommen vorgeschlagen. Gholamalipour *et al.* vermuten die Ausbildung einer Haarnadelstruktur durch Rückfalten des 3'-Endes des RNA-Produkts. Diese Doppelstrang-Sequenz würde dann von der Polymerase als Primer genutzt und die komplementäre Sequenz verlängert werden. Das Phänomen trete erst bei hohen Konzentrationen an RNA-Produkt auf, da dann das RNA-Produkt mit dem Plasmid um das aktive Zentrum konkurriere.

Als Lösung für das Problem wurde die Verwendung eines DNA-Oligonukleotides vorgeschlagen, welches an das 3'-Ende bindet und das *selfpriming* verhindert (Gholamalipour et al., 2019). Dieses entspricht in den Grundzügen dem Ansatz, der auch in dieser Arbeit bei der *in vitro*-Transkription mit einem Blocker-Oligonukleotid verfolgt wurde (Kapitel 3.2.2). Gholamalipour *et al.* berichtet von einem Erfolg bei der Inhibition des *selfpriming*. Mittels denaturierender Gelelektrophorese wiesen sie nach, dass bei der *in vitro*-Transkription von einer 24 Nukleotid langen RNA mit einer T7-Polymerase unter Verwendung von 400 μ M Capture-DNA kaum verlängerte RNA Produkte mehr entstanden. Die *in vitro*-Transkription unter Einsatz von Blocker-Oligonukleotiden im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 2.2.17) führte jedoch zu keiner signifikanten Verringerung des qPCR-Hintergrundes (Kapitel 3.2.2). Das bedeutet, dass der Hintergrund entweder nicht durch dieses Phänomen verursacht wird oder die verwendete Reaktionszusammensetzung

der *in vitro*-Transkription dieser Arbeit (Tabelle 2-18) anders ist. Gründe für den nicht signifikanten Unterschied im Rahmen dieser Arbeit können sein, dass die transkribierte RNA eine Länge von ca. 9.900 Nukleotiden statt 24 aufweist und nur 20 pmol Blocker-Oligonukleotid statt 400 μ M verwendet wurden. Die augenscheinliche Verbesserung des Hintergrundes in Zusammenschau mit dem Ergebnis aus Kapitel 3.3.2 könnte allerdings ein Hinweis dafür sein, dass die Hypothese eines *copy back*-Mechanismus nicht abzustreiten ist.

Schlussfolgerung: Der Einsatz eines Blocker-Oligonukleotides in der *in vitro*-Transkription führte im Rahmen dieser Arbeit nicht zum Erfolg. Gründe dafür könnten die Länge der RNA und die Konzentration der eingesetzten Blocker-Oligonukleotide sein. Möglichkeiten zur Verbesserung der Methode könnten der Einsatz von einer höheren Konzentration an Blocker-Oligonukleotid und das Herabsetzen der UTP-Konzentration sein.

Als weitere Möglichkeit zur Reduzierung des detektierten Hintergrundes wurde die Nutzung einer anderen Polymerase bei der *in vitro*-Transkription getestet. Die T7 RNA-Polymerase von New England Biolabs (NEB #M0251) wurde durch die Hi-T7-Polymerase von NEB (NEB #M0658) ersetzt und die Reaktionsbedingungen nach Herstellerangaben angepasst (Tabelle 2-17). Die Hi-T7-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei ca. 50 °C. Durch die erhöhte Temperatur während der *in vitro*-Transkription sollen laut Herstellerangaben weniger Nebenprodukte entstehen. Betrachtet man die Erkenntnisse von Gholamalipour *et al.* (Gholamalipour et al., 2018) in Kombination mit der Hi-T7-Polymerase, scheint die *in vitro*-Transkription bei höheren Temperaturen insoweit sinnvoll, dass die Bildung einer Haarnadelstruktur bei den höheren Temperaturen vielleicht nicht stabil genug wäre, um als Primer/Template-Struktur zu fungieren. Die Ergebnisse (Kapitel 3.2.1) zeigen im *in vitro*-Test allerdings keine signifikante Verbesserung des Hintergrundes. Das kann auch hier den Grund haben, dass das *selfpriming* nicht die Ursache für den Hintergrund ist. Es ist aber ebenfalls denkbar, dass der *hairpin* am 3'-Ende des RNA-Produktes auch bei den Temperaturen noch zu stabil ist und das *selfpriming* dennoch stattfinden kann. Mit einer Schmelztemperatur des vermutlich verantwortlichen *hairpins* am 3'-Ende von 49,5 °C⁷ könnte die Reaktionstemperatur von 50 °C vielleicht noch zu gering sein. Des Weiteren gab es während der Experimente das Problem, dass

⁷ Berechnung mit OligoCalc, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, (Kibbe, 2007)

die Ausbeute der Reaktion mit der Hi-T7-Polymerase um ein Vielfaches geringer war als mit der T7-RNA-Polymerase. Dadurch konnten Transfektionen in der Zellkultur nur sehr begrenzt und nicht im gewünschten Ausmaß durchgeführt werden. Ein Grund für die geringe Ausbeute an RNA-Produkt kann in den Bedingungen liegen, die der Hersteller für die Transkription angibt, da diese wahrscheinlich nicht für *high yield* ausgelegt sind. Eine Möglichkeit zur Verbesserung dieser Methode bestünde in der Entwicklung von *high yield* Konditionen, bei der unter anderem auch eine *high concentration* Variante der Hi-T7 (NEB #M0470) verwendet werden könnte. Diese Änderung würde aber auch erheblich höhere Kosten nach sich ziehen. Des Weiteren wäre das Austesten von höheren Temperaturen denkbar, scheint aber in Angesicht der geringen Ausbeute wenig erfolgversprechend und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter getestet.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse legen nahe, dass die Verwendung einer Hi-T7-Polymerase eine zu geringe Ausbeute erzielt. Wollte man diese Methode weiter untersuchen und optimieren, müsste man ein Protokoll für *high yield*-Konditionen und/oder höhere Temperaturen entwerfen und die damit verbundenen erheblich höheren Kosten in Kauf nehmen.

4.1.2 RT-Reaktion

Die RT-Reaktion ist ein essentieller Schritt für die Vorbereitung auf die qPCR, in dem die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die RT-Reaktion wurde zunächst mit dem qScript™ Flex cDNA Kit von Quanta Bioscience nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Erkenntnisse aus Kapitel 4.1.1 legen die Vermutung nahe, dass ein *selfpriming* nicht nur während der *in vitro*-Transkription, sondern auch während der RT-Reaktion stattfinden könnte. Des Weiteren galt es, eine möglichst spezifische RT-Reaktion zu entwickeln, um unerwünschte Nebenprodukte weitgehend auszuschließen.

Zunächst sollte die Primer-Spezifität erhöht werden, indem ein Spinach-Primer eingesetzt wurde, der über eine so genannte „SNAP“-Funktion verfügt. Das bedeutet, dass der Primer länger ist als seine Zielsequenz und die Verlängerung so gewählt wurde, dass der Primer einen intramolekularen *hairpin* bildet, wenn er nicht an seine Zielsequenz bindet. Auf diese Weise sollten bei niedrigeren Temperaturen unspezifische Paarungen des Primers minimiert werden (Sun et al., 2014; Zhou et al., 2008). In Kombination mit dem neuen Primer sollte das Temperaturprofil entsprechend angepasst werden. Die Entscheidung fiel auf ein Touch-Down-Protokoll, welches eine Hybridisierung bei einer

Temperatur von 70 °C vorsieht, die pro Minute um 1 °C auf 60 °C gesenkt wird. Diese Art von Temperaturprofil soll die Spezifität der Primerbindung erhöhen (Korbie & Mattick, 2008). Dieses Konzept wurde bereits (allerdings nur ein einziges Mal) von L. Shalamova ausprobiert und führte zum Erfolg (Shalamova, 2018). Der Erfolg in der Reduktion des Hintergrundes konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden (Kapitel 3.2.3). Aufgrund des geänderten Temperaturprofils wurde nun eine Anpassung auf Seiten der Plusstrangdetektion nötig. Plus- und Minusstränge sollen mit dem gleichen Protokoll detektiert werden, damit es vergleichbarer und pragmatischer ist. Es wurde folglich ein EMCV-Primer entworfen, welcher durch eine Verlängerung, eine angepasste Hybridisierungstemperatur besitzt. Obwohl der alte EMCV-Primer mit dem Standardprotokoll den geringsten Hintergrund aufweist, fiel die Entscheidung auf die Verwendung des neuen EMCV Primers unter Anwendung des Touch-Down-Protokolls (Kapitel 3.2.4). Die Gründe hierfür sind, dass der Unterschied im Hintergrundsignal sehr gering war und die Detektion von Plus- und Minusstrang mit dem gleichen Protokoll erfolgen sollte.

Schlussfolgerung: Eine erhöhte Spezifität der RT-Reaktion durch einen Spinach-Primer mit SNAP-Funktion und angepasstem Temperaturprotokoll führte zu einer Reduktion des Hintergrundsignals. Die Anwendung eines neuen EMCV-Primers stellt einen Kompromiss zwischen Spezifität, Vergleichbarkeit und Pragmatik dar.

Im Folgenden soll der Versuch zur Verhinderung von eventuell stattfindenden *selfpriming* in der RT-Reaktion diskutiert werden. Die Erkenntnis, dass die RT-Reaktion ein Hintergrundsignal in der qPCR verursachen kann, gab es schon vor langer Zeit (Freeh & Peterhans, 1994). Ob das Hintergrundsignal in der qPCR im Rahmen dieser Arbeit überhaupt durch die RT-Reaktion kommt und wenn ja, durch welchen Mechanismus, ist unklar. Die Verwendung von spezifischen Primern erhöht zwar die Spezifität, schließt aber einen Hintergrund durch randomisiertes Paaren von RNA-Stücken oder ein eventuelles Rückfalten und *selfpriming* der RNA nicht vollständig aus (Adrover et al., 2010; Bustin et al., 2005).

Für die RT-Reaktion wurde ein anderer Ansatz verfolgt als für die *in vitro*-Transkription. Die Idee war es, die Synthese eines artifiziellen Minusstrang-Signals mittels eines räumlichen oder zeitlichen Hindernisses zu verhindern. In Kapitel 3.2.5 wurde versucht, die Dauer der RT-Reaktion so zu minimieren, dass die Polymerase beim Start mit dem 3'-*hairpin* als Primer nicht genügend Zeit hätte, das Spinach Amplikon, welches am

anderen Ende des Stranges liegt, zu erreichen. Hierbei ließ sich keine Verbesserung des Hintergrundes bei einer drastischen Verkürzung der Zeit erreichen (Abbildung 3-9). Auch die wiederholte Untersuchung der Reaktionslängen von 8 min und 15 min zeigten keine Verbesserung des Hintergrundes durch eine Reduktion der Reaktionszeit (Abbildung 3-10). Die Gründe hierfür können sehr vielfältig sein. Zum einen kann es sein, dass das Signal allgemein durch eine unzureichende Synthese von cDNA geringer ausfällt oder dass die Transkription der Plusstrang-Sequenzen zu stark beeinträchtigt wird. Zum anderen kann es sein, dass der Hintergrund nicht durch die RT-Reaktion, oder zumindest durch einen anderen Mechanismus, verursacht wird, wie beispielsweise durch die Bindung von kürzeren RNA Stücken oder DNA-Fragmenten an das Template. In Kapitel 3.2.6 wurde ein Blocker eingesetzt, der *downstream* des Spinach-Amplikons auf dem Plusstrang bindet und ein deaktiviertes 3'-Ende (C₃-Linker) besitzt. Auch hiermit sollte eine Synthese von artifiziellen Minusstrang-Signalen verhindert werden. In der Auswertung zeigte sich allerdings eine signifikant frühere Minusstrang-Detektion in den Proben, bei denen ein nicht replikationsfähiges Konstrukt transfiziert wurde (Abbildung 3-12). Daraus lässt sich auf eine Verstärkung des Hintergrundsignals schließen. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass die Reverse Transkriptase den Blocker als Primer benutzen kann. Dieses wäre denkbar, wenn die C₃-Schutzgruppe auf der OH-Gruppe am 3'-Ende des Blockers während der Inkubation abgespalten würde. Es wurde mit diesem Versuch folglich keine Verbesserung des Hintergrundes erreicht.

Wenn in Zukunft weiterhin eine Anpassung der RT-Reaktion getestet werden soll, könnte die Durchführung der RT-Reaktion bei höheren Temperaturen ein weiterer sinnvoller Ansatzpunkt sein.

Schlussfolgerung: Mit keiner der Interventionen (kürzere Reaktionsdauer, Blocker *downstream* des Amplikons) konnte eine Reduzierung des Hintergrundes erreicht werden. Außerdem bringen die Versuche keinen Erkenntnisgewinn darüber, ob die RT-Reaktion den Hintergrund in der qPCR hervorruft. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre eine Reverse Transkription bei einer höheren Reaktionstemperatur.

4.1.3 qPCR

Die qPCR ist eine weit verbreitete und sehr sensitive Methode. Da diese Methode so sensitiv ist, können auch kleine Fehler in der Versuchsplanung die Ergebnisse verfälschen oder ihre Aussagekraft einschränken (Derveaux et al., 2010). Eine mögliche Fehlerquelle

für einen Hintergrund in der qPCR ist die Kontamination der Probe mit Plasmidrückständen (Vandesompele et al., 2002). Die effektivste Vorbeugung sei in diesem Fall die Nutzung eines möglichst effizienten DNase-Verdau (Vandesompele et al., 2002). Aus diesem Anlass wurde für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit eine sehr effiziente DNase ausgewählt, sodass eine mangelhafte Aktivität dieser nahezu ausgeschlossen werden kann (Kapitel 3.3.1). Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit stets eine NRT-Probe in den Versuchen mitgeführt, bei der in der RT-Reaktion keine reverse Transkriptase verwendet wurde. Dadurch zeigt diese Probe den Hintergrund an, welcher durch die DNA-Plasmidrückstände verursacht wird. Es wurden nun unterschiedliche Versuche unternommen, um diesen Hintergrund so gering wie möglich zu halten (Kapitel 3.3).

Die Gel-Extraktion der DNA nach der *in vitro*-Transkription ist ein Versuch, die DNA unter Sicht vollständig zu entfernen. Die Ergebnisse aus Abbildung 3-13 zeigen, dass diese Methode nur eine Veränderung mit sich bringt, wenn man sie vor statt nach dem DNase-Verdau einsetzt. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei dem Verdau des Plasmides Fragmente entstehen, welche bei der Gel-Elektrophorese durch die RNA Bande laufen und diese kontaminieren. Ein weiterer Grund ist möglicherweise, dass im DNase-Verdau entstandene DNA-Oligonukleotide auf die RNA hybridisieren und dann in der nachfolgenden RT-Reaktion als unerwünschter Primer fungieren. Führt man nun aber die Gel-Extraktion vor dem Verdau durch, kann die DNA nahezu vollständig entfernt werden (Kapitel 3.3.2). Des Weiteren liefert das Experiment den Hinweis, dass eine mögliche DNA-Kontamination nicht das einzige Problem ist, sondern vermutlich auch „*copy back*“-Transkription oder reverse Transkription an umgefalteten 3'-Enden der RNA eine wichtige Rolle spielen. Anlass für diese Vermutung ist das kaum veränderte Spinach-Signal aus Abbildung 3-13 im Vergleich zwischen Ansatz „Standard P/C“ und Ansatz „1 Gel-A 2. Dnase“. Die Ergebnisse sind allerdings in Hinsicht auf die Anzahl der abgeschlossenen Experimente für diese Variante (n = 1) unter Vorbehalt zu werten. Der Grund für die niedrige Anzahl an abgeschlossenen Experimenten ist die geringe RNA-Ausbeute bei der Gel-Extraktion. Es war nicht möglich, eine reproduzierbar hohe RNA-Ausbeute zu gewinnen, mit der sich die vorgesehenen Experimente durchführen ließen. Aus diesem Grund wurde die Methode nicht im Protokoll etabliert. Sollte man in Zukunft das Bestreben verfolgen, diese Methode in das Protokoll zu etablieren, müsste man das Versuchsdesign entsprechend anpassen oder die Ausbeute der Extraktion optimieren.

Schlussfolgerung: Die Gel-Extraktion ist in der Lage, den DNA-Hintergrund auf ein Minimum zu reduzieren. Das Spinach-Signal ist trotz des minimierten DNA-Hintergrundes unverändert, was ein Hinweis auf *copy back*-Transkription oder *selfpriming* des Plusstranges in der RT als ein wesentliches Problem sein kann. Die zu geringe Ausbeute an gereinigter RNA machte es aber nicht möglich, diese Methode in das Protokoll für die Experimente dieser Arbeit zu etablieren oder weiter zu verfolgen.

In Kapitel 3.3.3 wurde des Weiteren der Einsatz einer LiCl-Fällung statt einer Ethanol-Fällung getestet. Die LiCl-Fällung soll die RNA spezifischer ausfällen (angeblich ohne DNA zu fällen) und dadurch zu einer Reduktion des DNA-induzierten Hintergrundes in der qPCR und einer Verbesserung der Ausbeute gegenüber der Ethanol-Fällung führen (Cathala et al., 1983). Die Modifikation der Aufreinigung wurde an mehreren Stellen des Versuchsprotokolls durchgeführt (Kapitel 3.3.3), zeigte aber in der Auswertung keine Veränderung des DNA-induzierten Hintergrundes (Abbildung 3-14). Die Tatsache, dass sich der Hintergrund weder zum Schlechten noch zum Besseren verändert hat, legt die Vermutung nahe, dass die Nutzung einer anderen Substanz zum Fällern das Problem des Hintergrundes nicht lösen wird. Die mit dem Qubit® bestimmten RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Aufreinigungsschritten haben sich nicht wesentlich voneinander unterschieden, daher ist auch keine Verbesserung der Effizienz der Aufreinigung im Rahmen dieser Arbeit zu vermerken.

Schlussfolgerung: Die Verwendung von LiCl statt Ethanol in der Aufreinigung von RNA Proben führt zu keiner Verminderung des DNA-induzierten Hintergrundes oder der Ausbeute. Es ergibt sich kein Hinweis, der eine weitere Untersuchung dieser Modifikation rechtfertigen würde.

Die Phenol/Chloroform-Aufreinigung von RNA ist seit vielen Jahren eine bewährte Methode zur Aufreinigung (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006). Dennoch sollte auch dieser Schritt des Protokolls auf mögliche Modifikationen untersucht werden, um das Hintergrundsignal in der qPCR zu reduzieren. Eine alternative Möglichkeit, das DNA Template aus der Probe zu entfernen, ist die Biotinylierung des Templates und eine Aufreinigung mittels Streptavidin Magnetic Beads nach der *in vitro*-Transkription. Auch diese Methode ist eine bewährte Option (Gabrielsen et al., 1989; Haukanes & Kvam, 1993). Aufgrund der sehr starken Bindung von Biotin und Streptavidin sollte mit diesem Verfahren eine

möglichst restlose Entfernung des Templates erfolgen. Ein weiterer denkbarer Vorteil ist, dass das Template nicht bei einem DNA-Verdau zerkleinert wird, sondern im Ganzen aus der Probe entfernt wird. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.4 zeigen, dass die Umsetzung der Methode gelungen ist. Das Template wurde mit einem biotinylierten Primer im Rahmen einer PCR hergestellt (Abbildung 3-15) und anschließend erfolgreich *in vitro* transkribiert (Abbildung 3-16). Die Durchführung der *Time Course*-Experimente zeigte im Verlauf allerdings keine Verbesserung des Hintergrundsignals (Abbildung 3-17). Die Ergebnisse legen nahe, dass entweder die Aufreinigung nicht restlos funktioniert hat und weiterhin ein DNA-induzierter Hintergrund vorhanden ist, oder, dass das DNA-Template nicht für den Hintergrund verantwortlich ist. Die Abbildung 3-16 zeigt bei genauer Betrachtung noch eine sehr dezente DNA-Bande nach der Aufreinigung, was für eine unvollständige Entfernung des DNA-Templates spricht. Ein möglicher Grund hierfür könnte ein Überschreiten der Bindekapazität der Magnetic Beads oder die Länge des Template sein. Würde man diesen Ansatz weiterverfolgen wollen, bedürfte es einer entsprechenden Anpassung des Protokolls. Eine weitere Option, die es zu prüfen gilt, wäre die Optimierung des Protokolls der Phenol/Chloroform-Aufreinigung in Hinblick auf den pH-Wert (Xu et al., 2019). Die Verwendung von streng sauren Reaktionsbedingungen könnte die Spezifität der RNA-Aufreinigung erheblich steigern. Ein weiteres Alternativverfahren, welches man zur spezifischeren Trennung von DNA und RNA testen könne, wäre die Aufreinigung über einen denaturierenden Guanidinium-CsCl-Gradienten (Enea & Zinder, 1975).

Schlussfolgerung: Das Entfernen des DNA-Templates mithilfe von Streptavidin Magnetic Beads als Methode hat funktioniert, allerdings nicht zu einer Reduktion des Hintergrundes geführt. Grund hierfür ist möglicherweise die überschrittene Bindungskapazität der Magnetic Beads.

Die Zusammenschau der Ergebnisse zur Reduktion des DNA-induzierten Hintergrundes in der qPCR lässt vermuten, dass es äußerst schwierig ist, das Protokoll dahingehend weiter zu optimieren. Einzig die Gel-Extraktion hat unter Vorbehalt ($n = 1$) zu einer Verminderung des DNA-induzierten Hintergrundes auf Kosten der Ausbeute und routinemäßigen Durchführbarkeit geführt, kann aber aus diesem Grund nicht in das Protokoll übernommen werden. Für weitere Experimente dahingehend könnten streng saure Reaktionsbedingungen bei der Phenol/Chloroform-Aufreinigung oder die Aufreinigung über einen denaturierenden Guanidinium-CsCl-Gradienten getestet werden.

4.2 Die Minusstrang-Synthese im *Time Course*-Experiment

Die Ergebnisse der Experimente aus Kapitel 3.4 zeigen konstruktsspezifische Unterschiede in der Fähigkeit zur Minusstrang-Replikation. Diese Unterschiede ergeben sich durch die unterschiedlichen Modifikationen, die an den Konstrukten vorgenommen wurden. Die Modifikationen im Einzelnen sind dem Kapitel 1.6 zu entnehmen. Wie in Abbildung 3-18 und Abbildung 3-20 zu sehen ist, zeigen die GND-Plasmidvarianten mit einer Mutation im NS5B-Gen eine sehr geringe relative Minusstrang-Abundanz. Durch die Mutation im katalytischen Zentrum der Polymerase wird die Fähigkeit zur Bildung von Minussträngen auf ein Minimum reduziert. Dieses gelingt ebenfalls durch das Ersetzen der 5'UTR mit einem artifiziellen *hairpin*. Werden Teile der HCV 5'UTR-Sequenz wieder eingesetzt, lässt sich ein signifikanter Anstieg der Minusstrang-Replikation detektieren. Dieser Anstieg fällt für I-II_wt etwas geringer aus als für I-III_wt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Abschnitt I-III_wt für die Initiation der Minusstrang-Replikation sehr wichtig ist. Auch in anderen Studien wurde bereits beschrieben, dass der Abschnitt bis SL II essentiell ist und die Effizienz der Replikation durch den SL III gesteigert wird (Friebe et al., 2001; Kim et al., 2002). Außerdem wurde auch bei anderen Viren, wie dem Pestivirus A, nachgewiesen, dass *cis*-Elemente der 5'UTR für eine effiziente Replikation notwendig sind (Frolov et al., 1998).

Des Weiteren zeigen die Daten, dass die relative Minusstrang-Abundanz wieder abnimmt, wenn die gesamte 5'UTR und/oder die Core-codierende Sequenz *downstream* der HCV IRES zum Konstrukt hinzugefügt wird. Daraus lässt sich vermuten, dass die vollständige 5'UTR einen inhibierenden Effekt auf die Replikation hat und das Gleichgewicht zu Gunsten der Translation verschiebt. Diese Art der Regulation von Replikation und Translation wurde auch schon für das Poliovirus beschrieben (Gamarnik & Andino, 1998).

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von (Shalamova, 2018) und lassen eine Beantwortung der Hypothese 5 aus Kapitel 1.7 zu. Mithilfe der Methode lassen sich die Unterschiede der Konstrukte in der Fähigkeit zur Minusstrangreplikation detektieren.

Das Ziel der Etablierung des neuen Systems zur Detektion der Minusstrang-Synthese ist die Entkoppelung der Minusstrang-Synthese von der Plusstrang-Synthese und Translation, um genauere Aussagen darüber treffen zu können, welche Strukturen für die Initiation der Minusstrang-Synthese essentiell sind. Die signifikanten Unterschiede zwischen replizierenden und nicht-replizierenden Konstrukten im *Time Course*-Experiment zeigen eine funktionierende Minusstrang-Detektion. Eine Einschränkung in der Aussagekraft

wird durch den Hintergrund gegeben, welcher im Rahmen dieser Arbeit bei ca. 12 % vom maximalen Signal liegt (Kapitel 3.4). Mit der aktuellen Datenlage lassen sich die Hypothesen 1 bis 4 aus Kapitel 1.7 weder annehmen noch ablehnen. Es ist nach wie vor nicht ganz klar, wodurch der Hintergrund zu Stande kommt. Es wurden unterschiedlichste Modifikationen ausprobiert, die mögliche Ursachen beheben sollten. Die meisten Modifikationen brachten keinen eindeutigen Hinweis auf den Ursprung des Problems. Allein die Ergebnisse nach der Gel-Aufreinigung (Kapitel 3.3.2) in Zusammenschau mit den Ergebnissen der 3'-Ende-Blockade durch ein Oligonukleotid (Kapitel 3.2.2) erlauben die vorsichtige Annahme, dass sowohl die kontaminierende Plasmid-DNA als auch eine Form von *selfpriming* die Hauptprobleme darstellen könnten. Die Gel-Aufreinigung stellt sich allerdings aufgrund der geringen RNA-Ausbeute als Aufreinigungsmethode ungeeignet dar und die Ergebnisse des Blocker-Oligonukleotides sind nicht signifikant. Außerdem ließ sich der Hintergrund scheinbar durch eine Anpassung des RT-Reaktionsprotokolls verbessern. Der Grund hierfür könnte eine höhere Spezifität der Reaktion durch den SNAP-Primer in Kombination mit dem angepassten Temperaturprofil sein. Ein genauere Vergleich der Verhältnisse von Hintergrundsignal zu Gesamtsignal zwischen den Ergebnissen von L. Shalamova und dieser Arbeit zeigte allerdings, dass es im Endeffekt keine Änderung des Hintergrundsignals gab (Kapitel 3.4).

4.3 Fazit und Ausblick

Die Methode zur Detektion der Mechanismen zur Initiation von Minusstrang-Replikation ist eine sehr sensitive Methode, bei der kleinste Fehler im Protokoll zu einem enormen Verlust an Aussagekraft der Ergebnisse führen. Die Methode von L. Shalamova konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich angewendet und bestätigt werden. Das Hintergrundsignal, welches bei dem bisherigen Protokoll der Methode auftritt, ließ sich trotz einer Vielzahl an Modifikationsversuchen nicht eliminieren. Eine scheinbare Reduktion wurde zusammenfassend durch die Verwendung einer effizienteren DNase und der Anpassung des RT-Protokolls (SNAP-Primer und neues Temperaturprofil) erreicht, ließ sich bei genauer Auswertung durch die Bildung von Verhältnissen allerdings nicht bestätigen. Es lässt sich folglich keine belastbare Aussage darüber treffen, wodurch der Hintergrund zu Stande kommt. Einzig das unveränderte Spinach-Signal nach Minimierung des Plasmid-DNA-Hintergrundes durch eine Gel-Aufreinigung (Abbildung 3-13) und eine augenscheinliche Verbesserung des Hintergrundes durch einen Blocker-Oligonukleotid

(Abbildung 3-5) geben einen Hinweis darauf, dass das Problem vielleicht eher bei einer Form des *selfpriming* zu suchen ist. Die verschiedenen Hypothesen zum Ursprung des Hintergrundsignals (Kapitel 1.7) konnten durch die Ergebnisse der Versuche weder signifikant widerlegt noch angenommen werden. Dennoch gründen die Hypothesen auf schlüssigen Annahmen die in den jeweiligen Ergebnisabschnitten dargestellt wurden, was eine weitere Untersuchung dieser notwendig macht.

Für weiterführende Untersuchungen zu diesem Problem können noch weitere Modifikationen am Protokoll eingesetzt werden, diese sollen hier kurz erwähnt werden. Für die *in vitro*-Transkription wäre eine Version des Hi-T7-Polymerase Ansatzes mit einer höheren Konzentration (NEB #M0470) möglich, um die Ausbeute zu verbessern. Außerdem könnte man für die *in vitro*-Transkription der Konstrukte eine SP6-Polymerase statt der T7-Polymerase verwenden, da diese in der Literatur als weniger anfällig für das von Gholamalipour et al. beschriebene *copy back* gilt (Butler & Chamberlin, 1982; Gholamalipour et al., 2018; Schenborn & Mierendorf Jr, 1985). Des Weiteren könnte der Hintergrund auch über die Verwendung eines RT Kits mit einer höheren Reaktionstemperatur (z.B. Katalognr. EP0751 von Thermo Fischer) verringert werden, da hierbei weniger unerwünschte Nebenprodukte bei komplexen Sekundärstrukturen entstehen. Mögliche alternative Aufreinigungsverfahren zu den bisher getesteten wäre zum einen die Aufreinigung über einen denaturierenden Guanidinium-CsCl-Gradienten (Enea & Zinder, 1975) und zum anderen die Anpassung des pH-Wertes bei der Phenol/Chloroform-Aufreinigung (Xu et al., 2019).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ursache des Hintergrundsignals noch unklar ist, aber die Versuche zur Modifikation des Protokolls noch nicht ausgeschöpft sind. Mögliche nächste Schritte wurden dargestellt und die Notwendigkeit für dieses neue System der Minusstrang-Detektion ist weiterhin gegeben. Dieses gilt nicht nur für die Forschung am Hepatitis C Virus, da diese Methode sich auch auf andere Viren übertragen ließe.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der WHO, die Hepatitis C als Gefahr für die Öffentlichkeit bis 2030 zu eliminieren, zeigt, dass diese Krankheit auch trotz wirksamer Medikamente noch ein globales Problem darstellt. Eine Impfung ist aktuell noch nicht vorhanden. Aufgrund dessen ist es wichtig, die molekularen Mechanismen des Hepatitis C Virus weiter zu untersuchen, obwohl es mit den DAA-Therapieregimen bereits suffiziente Therapiemöglichkeiten gibt.

Die Etablierung eines spezifischen Systems zur Detektion der Minusstrangreplikation von Viren, entkoppelt von der Plusstrangsynthese und Translation, ist ein wichtiges Instrument, um die Mechanismen der Initiation der Minusstrangreplikation zu verstehen und mögliche Therapieansätze zu entwickeln. Ein solches System wurde von L. Shalomo für HCV entworfen, wies aber in den Experimenten ein Hintergrundsignal in der qPCR auf, welches die Aussagekraft einschränkte. Ziel dieser Arbeit war es den Grund für das Hintergrundsignal zu finden und entsprechende Modifikationen am Versuchsprotokoll vorzunehmen, welche das Hintergrundsignal verringern und damit die Aussagekraft verstärken.

Als ein möglicher Grund für das Problem wurde die Bildung artifizieller Minusstränge durch ein Rückfalten des 3'-Ende mit *selfpriming* und fortlaufender Transkription herausgestellt. Dieser Mechanismus ist sowohl für die *in vitro*-Transkription als auch für die RT-Reaktion denkbar. Ein weiterer möglicher Grund wurde in der Bildung von kurzen DNA-Oligonukleotiden beschrieben, die in Folge eines unvollständigen DNase Verdau entstehen und anschließend als Primer in der RT-Reaktion oder qPCR agieren könnten. Trotz unterschiedlicher Modifikationen des Versuchsprotokolls konnte das Hintergrundsignal mit diesen Modifikationen allerdings in Betrachtung der Verhältnisse von Hintergrundsignal zu Gesamtsignal nicht gesenkt werden. Die Versuchsergebnisse lassen keine belastbare Aussage zum Ursprung des Hintergrundes zu, weswegen weitere Untersuchungen in Zukunft notwendig sind, um dieses neue System zur Minusstrangdetektion abschließend zu etablieren. Die Verwendung einer SP6 Polymerase oder die Anpassung des pH-Wertes bei der Phenol/Chloroform-Aufreinigung könnten beispielhaft weitere Schritte sein, um das Hintergrundsignal zu eliminieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine wichtige Grundlage für weitere Experimente zum Ursprung des Hintergrundsignals und der abschließenden Etablierung des neuen Minusstrangdetektionssystems, welches neben HCV auch bei vielen weiteren Viren eingesetzt werden könnte.

6 Summary

The WHO decided to achieve the elimination of Hepatitis C as a public health threat within the year 2030. This, and the absence of a vaccination, shows the importance of Hepatitis C research even though there are efficient drugs available. More molecular mechanisms have to be clarified to develop new treatment methods.

For further research on the initiation of the minus strand replication of HCV it is very important to establish a method that is able to analyze this matter uncoupled from the plus strand replication and translation. This kind of method was earlier designed by L. Shalamova. Unfortunately, the method showed a background signal in the qPCR, which reduced the validity of the results. The aim of this thesis was the identification of the reason for the background signal and to verify the results of the previous experiments.

A possible cause of the background signal could be a self-hybridization of the HCV 3'-end. As a result, artificial minus strands could be produced during the transcription and raise the background signal in the qPCR. This copy back problem could influence the *in vitro* transcription as well as the RT reaction. A second possible cause of the background signal could be an incomplete DNA digest. Originated DNA fragments could function as unspecific primers in the RT reaction or qPCR. At first, the new RT reaction primers and temperature profile and the use of a more efficient DNase seemed to be an improvement. Nevertheless, there was no reduction of the background in qPCR if you compare the relation of the background signal to the maximum signal in L. Shalamova's thesis and the results of this thesis. The results of this thesis do not allow to make any reliable assumptions on the cause of the background signal. That is why future research in this regard is needed. Future modifications to be tested are e.g. the use of a SP6 polymerase or acidic phenol.

This thesis did not succeed in finding the cause of the background signal in L. Shalamova's new method. Nevertheless, the results of this work provide important information for future research regarding this issue. The new method for specific detection of minus strand synthesis initiation would be very useful for further research on HCV and other viruses.

7 Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Erläuterung</u>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BR	eng.: <i>broad range</i>
BX	Bromphenolblau/Xylencyanolblau
c.a.	lat.: <i>circa</i>
C	Cytosin
cDNA	eng.: <i>complementary DNA</i>
CRE	cis-agierendes Replikationselement
Ct	Schwellenwertzyklus, eng.: <i>threshold cycle</i>
DAA	engl.: <i>direct-acting antiviral</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DLS	engl.: <i>dimerization linkage sequenz</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMV	Doppel-Membran-Vesikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
e.g.	engl.: <i>for example</i>
E	Hüllprotein, engl.: <i>envelope</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
EMCV	Enzephalomyokarditis Virus
engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum

Abkürzungsverzeichnis

et al.	und andere, lat.: <i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FBS	Fetales Rinderserum, engl.: fetal bovine serum
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom, engl.: hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HOR	Meerrettichperoxidase, engl.: <i>horse radish peroxidase</i>
hp	Haarnadelstruktur, engl.: <i>hairpin</i>
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
i.e.	engl.: for e
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
l	Liter
lat.	lateinisch
LDL	engl.: <i>low density lipoprotein</i>
LiCl	Lithiumchlorid
log	Logarithmus
LRI	engl.: <i>long-range interactions</i>
LB	Lennox Broth
LVP	Lipoviropartikel
m	Meter
m	Milli (als Präfix)
M	Molar
min	Minute
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Nano
NANBH	eng.: <i>non-A-non-B-hepatitis</i>
NEB	New England Biolabs

NI	Nukleotid Inhibitor
NRT	engl.: <i>no Reverse Transcriptase-Reaction</i>
NS	Nicht-Strukturprotein
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleotidtriphosphat
OD	engl.: <i>optical density</i>
ORF	Offener Leserahmen, engl.: <i>open reading frame</i>
p	Wahrscheinlichkeit, lat.: <i>probabilitas</i>
p(U/C)	Poly Uracil/Cytosin Trakt
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
pH	pH-Wert
PPPC	Proteinprobenpuffer
PVDF	Polyvinylidenflourid
RIG-I	engl.: <i>retinoic acid inducible Gen I</i>
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	engl.: <i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	Stamm Schleife, engl.: <i>stem loop</i>
SMV	Einzel-Membran-Vesikel, engl.: <i>single membrane vesicle</i>
SR-BI	Scavenger-Rezeptor-Klasse B-Typ I
SSC	engl.: <i>saline sodium citrate</i>
SVR	engl.: <i>sustained virologic response</i>
T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur, engl.: <i>melting temperature</i>

Abkürzungsverzeichnis

TAE	Tris-Acetat EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TD	engl.: <i>touch down</i>
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht-translatierte Region, engl.: <i>untranslated region</i>
V	Volt
VR	Variable Region
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Aufbau des HCV als LVP.....	4
Abbildung 1-2: Replikationszyklus des Hepatitis C Virus.....	7
Abbildung 1-3: HCV RNA Genom Replikation.....	11
Abbildung 1-4: Schema des copy back-Mechanismus.....	13
Abbildung 3-1: Kontroll-Gel einer Standard <i>in vitro</i> -Transkription.....	51
Abbildung 3-2: Western Blot 48 h nach Transfektion.....	52
Abbildung 3-3: Visualisierung der Minusstrangamplikons nach RT-PCR.....	53
Abbildung 3-4: Verbesserungsversuch mit Hi-T7-Polymerase.....	54
Abbildung 3-5: Übersicht Blocker-Oligonukleotid.....	56
Abbildung 3-6: Verbesserungsversuch mit Blocker-Oligonukleotid.....	57
Abbildung 3-7: Verbesserungsversuch Spinach Primer mit SNAP-Funktion.....	59
Abbildung 3-8: Verbesserungsversuch mit einem neuen EMCV Primer.....	60
Abbildung 3-9: Verbesserungsversuch durch Verkürzung der RT-Dauer.....	62
Abbildung 3-10: Genauere Betrachtung der RT-Dauern von 8 min und 15 min.....	63
Abbildung 3-11: Schema Spinach-Amplikon-Blocker.....	65
Abbildung 3-12: Spinach Blocker in der RT-Reaktion.....	65
Abbildung 3-13: Verbesserungsversuch mit einer Gel-Aufreinigung.....	67
Abbildung 3-14: Verbesserungsversuch mit LiCl-Fällung.....	69
Abbildung 3-15: Agarose-Gel der PCR mit biotinylierten Primern.....	70
Abbildung 3-16: Agarose-Gel der <i>in vitro</i> -Transkription von den biotinylierten Templates.....	71
Abbildung 3-17: Verbesserungsversuch mit Biotin-Primern.....	73
Abbildung 3-18: Relative Minusstrang-Abundanz verschiedener HCV-Konstrukte in einem 4 - 72 h Zeitverlauf.....	74
Abbildung 3-19: 4 – 72 h Zeitverlauf-Experiment mit einer Normalisierung auf das I- II_wt Konstrukt.....	75
Abbildung 3-20: Relative Minusstrang-Abundanz verschiedener HCV-Konstrukte 48 h nach Transfektion.....	77

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Funktion der strukturbildenden Proteine.....	5
Tabelle 1-2: Funktion der nicht strukturbildenden Proteine.....	6
Tabelle 2-1: Verbrauchsmaterial.....	16
Tabelle 2-2: Geräte.....	16
Tabelle 2-3: Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 2-4: Lösungen und Puffer.....	20
Tabelle 2-5: Enzyme.....	23
Tabelle 2-6: Kit-Systeme.....	23
Tabelle 2-7: Plasmide.....	24
Tabelle 2-8: Antikörper.....	24
Tabelle 2-9: DNA Oligonukleotide.....	25
Tabelle 2-10: Größen- und Längenstandards.....	26
Tabelle 2-11: Bakterienstämme.....	26
Tabelle 2-12: Zelllinien.....	27
Tabelle 2-13: Kulturmedien.....	27
Tabelle 2-14: Zusammensetzung Einfach-Restriktionsverdau.....	33
Tabelle 2-15: Zusammensetzung Doppel-Restriktionsverdau.....	34
Tabelle 2-16: Zusammensetzung Standard <i>in vitro</i> -Transkription.....	35
Tabelle 2-17: Zusammensetzung Hi-T7 <i>in vitro</i> -Transkription.....	36
Tabelle 2-18: Zusammensetzung Blocker <i>in vitro</i> -Transkription.....	37
Tabelle 2-19: Zusammensetzung Reverse Transkription.....	40
Tabelle 2-20: Zusammensetzung Blocker Reverse Transkription.....	41
Tabelle 2-21: Zusammensetzung qPCR Ansatz.....	42
Tabelle 2-22: Temperaturprofil der qPCR Reaktion.....	42
Tabelle 2-23: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.....	44
Tabelle 2-24: Zusammensetzung der Biotin-PCR.....	47
Tabelle 2-25: Temperaturprofil der Biotin-PCR.....	47

10 Literaturverzeichnis

- Adrover, M. F., Muñoz, M. J., Baez, M. V., Thomas, J., Kornblihtt, A. R., Epstein, A. L., & Jerusalinsky, D. A. (2010). Characterization of specific cDNA background synthesis introduced by reverse transcription in RT-PCR assays. *Biochimie*, *92*(12), 1839–1846. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.07.019>
- Aizaki, H., Lee, K. J., Sung, V. M. H., Ishiko, H., & Lai, M. M. C. (2004). Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology*, *324*(2), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.034>
- Alazard-Dany, N., Denolly, S., Boson, B., & Cosset, F. L. (2019). Overview of hcv life cycle with a special focus on current and possible future antiviral targets. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 1, p. 30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v11010030>
- Alter, H. J., Holland, P. V., Morrow, A. G., Purcell, R. H., Feinstone, S. M., & Moritsugu, Y. (1975). CLINICAL AND SEROLOGICAL ANALYSIS OF TRANSFUSION-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet*, *306*(7940), 838–841. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)90234-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)90234-2)
- Alter, H. J., Holland, P. V., Purcell, R. H., & Popper, H. (1978). TRANSMISSIBLE AGENT IN NON-A, NON-B HEPATITIS. *The Lancet*, *311*(8062), 459–463. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90131-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90131-9)
- Bailey, J. R., Barnes, E., & Cox, A. L. (2019). Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology*, *156*(2), 418–430. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
- Bartenschlager, R., Penin, F., Lohmann, V., & André, P. (2011). Assembly of infectious hepatitis C virus particles. In *Trends in Microbiology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 95–103). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.005>
- Blach, S., Terrault, N. A., Tacke, F., Gamkrelidze, I., Craxi, A., Tanaka, J., Waked, I., Dore, G. J., Abbas, Z., Abdallah, A. R., Abdulla, M., Aghemo, A., Aho, I., Akarca, U. S., Alalwan, A. M., Blomé, M. A., Al-Busafi, S. A., Aleman, S., Alghamdi, A. S., ... Razavi, H. A. (2022). Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, *7*(5), 396–415. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00472-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00472-6)
- Blach, S., Zeuzem, S., Manns, M., Altraif, I., Duberg, A.-S., Muljono, D. H., Waked, I., Alavian, S. M., Lee, M.-H., Negro, F., Abaalkhail, F., Abdou, A., Abdulla, M.,

- Rached, A. A., Aho, I., Akarca, U., Ghazzawi, I. Al, Kaabi, S. Al, Lawati, F. Al, ... Razavi, H. (2017). Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 2(3), 161–176. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30181-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9)
- Blight, K. J., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2002). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology*, 76(24), 13001–13014. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.13001-13014.2002>
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 597–601). BioScientifica. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755>
- Butler, E. T., & Chamberlin, M. J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5772–5778. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83846-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83846-2)
- Cacoub, P., Renou, C., Rosenthal, E., Cohen, P., Loury, I., Loustaud-Ratti, V., Yamamoto, A. M., Camproux, A. C., Hausfater, P., Musset, L., Veyssier, P., Raguin, G., Piette, J. C., Amoura, Z., Boissonnas, A., Cacoub, P., Camproux, A. C., Carrat, F., Chapelon-Abric, C., ... Rosenthal, E. (2000). Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: A prospective multicenter study of 321 patients. *Medicine*, 79(1), 47–56. <https://doi.org/10.1097/00005792-200001000-00005>
- Catanese, M. T., & Dorner, M. (2015). Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. In *Virology* (Vols. 479–480, pp. 221–233). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.014>
- Cathala, G., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A., & Baxter, J. D. (1983). A Method for Isolation of Intact, Translationally Active Ribonucleic Acid. *DNA*, 2(4), 329–335. <https://doi.org/10.1089/dna.1983.2.329>
- Cazenave, C., & Uhlenbeck, O. C. (1994). RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 6972–6976. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.6972>
- Chen, S. L., & Morgan, T. R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 3, Issue 2, pp. 47–52). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijms.3.47>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical*

- Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359–362. <https://doi.org/10.1126/science.2523562>
- Coller, K. E., Berger, K. L., Heaton, N. S., Cooper, J. D., Yoon, R., & Randall, G. (2009). RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000702>
- Coller, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L., & Randall, G. (2012). Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathogens*, 8(1), e1002466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002466>
- Cox, A. L. (2020). Challenges and promise of a hepatitis C virus vaccine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(2), a036947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036947>
- De Almeida Pondé, R. A. (2013). Enzyme-linked immunosorbent/chemiluminescence assays, recombinant immunoblot assays and nucleic acid tests in the diagnosis of HCV infection. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 32, Issue 8, pp. 985–988). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1857-1>
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
- Diaz, O., Delers, F., Maynard, M., Demignot, S., Zoulim, F., Chambaz, J., Trépo, C., Lotteau, V., & André, P. (2006). Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Journal of General Virology*, 87(10), 2983–2991. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82033-0>
- 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. *Journal of Virology*, 76(12), 5974–5984. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.5974-5984.2002>

- El-Hage, N., & Luo, G. (2003). Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *Journal of General Virology*, *84*(10), 2761–2769. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19305-0>
- Enea, V., & Zinder, N. D. (1975). Guanidinium-CsCl density gradients for isopycnic analysis of nucleic acids. *Science*, *190*(4214), 584–586. <https://doi.org/10.1126/science.1188358>
- Falade-Nwulia, O., Suarez-Cuervo, C., Nelson, D. R., Fried, M. W., Segal, J. B., & Sulkowski, M. S. (2017). Oral direct-acting agent therapy for hepatitis c virus infection: A systematic review. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 166, Issue 9, pp. 637–648). American College of Physicians. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., & Holland, P. V. (1975). Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine*, *292*(15), 767–770. <https://doi.org/10.1056/NEJM197504102921502>
- Ferrari, E., He, Z., Palermo, R. E., & Huang, H. C. (2008). Hepatitis C virus NS5B polymerase exhibits distinct nucleotide requirements for initiation and elongation. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(49), 33893–33901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803094200>
- Ferraris, P., Blanchard, E., & Roingard, P. (2010). Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *Journal of General Virology*, *91*(9), 2230–2237. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022186-0>
- Freeh, B., & Peterhans, E. (1994). RT-PCR: “background priming” during reverse transcription. *Nucleic Acids Research*, *22*(20), 4342–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/22.20.4342>
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., & Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' Nontranslated Region of Hepatitis C Virus Required for RNA Replication. *Journal of Virology*, *75*(24), 12047–12057. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.24.12047-12057.2001>
- Frolov, I., McBride, M. S., & Rice, C. M. (1998). cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA*, *4*(11), 1418–1435. <https://doi.org/10.1017/S1355838298981031>
- Gabrielsen, O. S., Horns, E., Korsnes, L., Ruet, A., & Øyen, T. B. (1989). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor τ - a new purification principle for

- the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Research*, *17*(15), 6253–6267. <https://doi.org/10.1093/nar/17.15.6253>
- Gamarnik, A. V., & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes and Development*, *12*(15), 2293–2304. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2293>
- Gholamalipour, Y., Johnson, W. C., & Martin, C. T. (2019). Efficient inhibition of RNA self-primed extension by addition of competing 3'-capture DNA-improved RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, *47*(19), e118. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz700>
- Gholamalipour, Y., Karunanayake Mudiyansele, A., & Martin, C. T. (2018). NAR breakthrough article 3 end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character—RNA-Seq analyses. *Nucleic Acids Research*, *46*(18), 9253–9263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky796>
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., & Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *Journal of Virology*, *77*(9), 5487–5492. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5487-5492.2003>
- Gottwein, J. M., Scheel, T. K. H., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M., & Bukh, J. (2009). Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology*, *49*(2), 364–377. <https://doi.org/10.1002/hep.22673>
- Gretch, D. R. (1997). Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology*, *26*(3 SUPPL.), 43S–47S. <https://doi.org/10.1002/hep.510260708>
- Harrus, D., Ahmed-El-Sayed, N., Simister, P. C., Miller, S., Triconnet, M., Hagedorn, C. H., Mahias, K., Rey, F. A., Astier-Gin, T., & Bressanelli, S. (2010). Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(43), 32906–32918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.151316>
- Haukanes, B. I., & Kvam, C. (1993). Application of magnetic beads in bioassays. *Bio/Technology*, *11*(1), 60–63. <https://doi.org/10.1038/nbt0193-60>
- He, L. F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H. J., & Purcell, R. H. (1987). Determining the Size of Non-A, Non-B Hepatitis Virus by Filtration. *Journal of Infectious Diseases*, *156*(4), 636–640. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.4.636>

- Hell, A.-L. (2020). Analyse der Minusstrangsynthese vom Hepatitis C Virus. *Unveröffentlichte Masterarbeit, Fachbereich Biologie Und Chemie*. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H., & Yoshikura, H. (1993). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of Virology*, *67*(4), 1953–1958. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1953-1958.1993>
- Houghton, M. (2019). Hepatitis C virus: 30 years after its discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(12), a037069. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037069>
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2016). *The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature*. 10th Report Online. Letzter Zugriff: 22.12.2022. <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/hepacivirus>
- 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. *Gastroenterology*, *125*(6), 1808–1817. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.023>
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, *35*(SUPPL.2), 43–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H., & Jang, S. K. (2002). Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(1), 105–112. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6167>
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, *277*(5325), 570–574. <https://doi.org/10.1126/science.277.5325.570>
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, *3*(9), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., Tegtmeier, G. E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J. R., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). An assay for circulating antibodies to a

- major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 244(4902), 362–364. <https://doi.org/10.1126/science.2496467>
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., & Rice, C. M. (2005). Virology: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309(5734), 623–626. <https://doi.org/10.1126/science.1114016>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 688–700. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3098>
- Lohmann, V. (2013). Hepatitis C Virus RNA Replication. In *Bartenschlager R. (eds) Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 369, pp. 17–49). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7>
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A., & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology*, 75(3), 1437–1449. <https://doi.org/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. *Journal of Virology*, 71(11), 8416–8428. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8416-8428.1997>
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), 110–113. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.110>
- Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J. M., Razavi, H., Terrault, N., & Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.6>
- Moradpour, D., & Penin, F. (2013). *Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function* (pp. 113–142). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_5
- Nacheva, G. A., & Berzal-Herranz, A. (2003). Preventing undesired RNA-primed RNA extension catalyzed by T7 RNA polymerase. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1458–1465. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03510.x>
- Niepmann, M. (2013). Hepatitis C Virus RNA Translation. In *Bartenschlager R. (eds)*

- Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 143–166). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_6
- Niepmann, M., & Gerresheim, G. K. (2020). Hepatitis C Virus Translation Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2328. <https://doi.org/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. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAR), 395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00395>
- NobelPrize.org. (2020). *Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020*. Nobel Media AB 2020. Letzter Zugriff: 18.10.2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2020/summary/>
- 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. *Journal of Virology*, *85*(14), 6963–6976. <https://doi.org/10.1128/jvi.00502-11>
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., & Bartenschlager, R. (2006). Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(19), 7408–7413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504877103>
- Rice, C. M. (2011). New insights into HCV replication: Potential antiviral targets. *Topics in Antiviral Medicine*, *19*(3), 117–120. [/pmc/articles/PMC6148863/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2148863/)
- Roingard, P., & Beaumont, E. (2020). Hepatitis C Vaccine: 10 Good Reasons for Continuing. In *Hepatology* (Vol. 71, Issue 5, pp. 1845–1850). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hep.31182>
- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLoS Pathogens*, *8*(12), e1003056.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003056>

- Ross, R. S., Viazov, S., Salloum, S., Hilgard, P., Gerken, G., & Roggendorf, M. (2010). Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(4), 1161–1168. <https://doi.org/10.1128/JCM.01640-09>
- Sarrazin, C., Zimmermann, T., Berg, T., Hinrichsen, H., Mauss, S., Wedemeyer, H., Zeuzem, S., Backmund, M., Beckebaum, S., Berg, C., Boesecke, C., Buggisch, P., Christensen, S., Ciesek, S., Cornberg, M., Drebber, U., Ferenci, P., Friedrich-Rust, M., Gerner, P., ... Zimmermann, R. (2020). Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus(HCV)-Infektion. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, *58*(11), 1110–1131. <https://doi.org/10.1055/a-1226-0241>
- Schenborn, E. T., & Mierendorf Jr, R. C. (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Research*, *13*(17), 6223–6236. <https://doi.org/10.1093/nar/13.17.6223>
- Shalamova, L. (2018). *Dissecting the requirements for Hepatitis C Virus RNA synthesis using a minus strand replication system Lyudmila Shalamova* [Doktorarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen]. <https://core.ac.uk/download/pdf/185577572.pdf>
- Shi, S. T., Lee, K.-J., Aizaki, H., Hwang, S. B., & Lai, M. M. C. (2003). Hepatitis C Virus RNA Replication Occurs on a Detergent-Resistant Membrane That Cofractionates with Caveolin-2. *Journal of Virology*, *77*(7), 4160–4168. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.4160-4168.2003>
- Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, *59*(1), 318–327. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S. M., & Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *Journal of Virology*, *79*(5), 2689–2699. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2689-2699.2005>
- Sun, H., Yang, Y., Yang, L., Su, B., Jiang, G., Fei, K., & Lu, D. (2014). Snapback primer mediated clamping PCR for detection of EGFR and KRAS mutations in NSCLC patients by high resolution melting analysis. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/407537>

- Tabata, K., Neufeldt, C. J., & Bartenschlager, R. (2020). Hepatitis C virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *10*(3), a037093. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037093>
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Köchel, H. G., & Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with β -lipoprotein. *Medical Microbiology and Immunology*, *181*(5), 293–300. <https://doi.org/10.1007/BF00198849>
- Triana-Alonso, F. J., Dabrowski, M., Wadzack, J., & Nierhaus, K. H. (1995). Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(11), 6298–6307. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6298>
- Tuplin, A., Struthers, M., Simmonds, P., & Evans, D. J. (2012). A twist in the tail: SHAPE mapping of long-range interactions and structural rearrangements of RNA elements involved in HCV replication. *Nucleic Acids Research*, *40*(14), 6908–6921. <https://doi.org/10.1093/nar/gks370>
- Vandesompele, J., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, *303*(1), 95–98. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5564>
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, *11*(7), 791–796. <https://doi.org/10.1038/nm1268>
- Webster, D. P., Klenerman, P., & Dusheiko, G. M. (2015). Hepatitis C. *The Lancet*, *385*(9973), 1124–1135. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62401-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62401-6)
- WHO. (2018). *Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection*. (WHO (ed.); pp. 4–9). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550345>
- Wolff, G., Melia, C. E., Snijder, E. J., & Bárcena, M. (2020). Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. In *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Issue 12, pp. 1022–1033). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.009>
- Wensch, F., Crouchet, E., Ligat, G., Zeisel, M. B., Keck, Z. Y., Fong, S. K. H., Schuster, C., & Baumert, T. F. (2018). Hepatitis C virus (HCV)-apolipoprotein interactions and immune evasion and their impact on HCV vaccine design. In

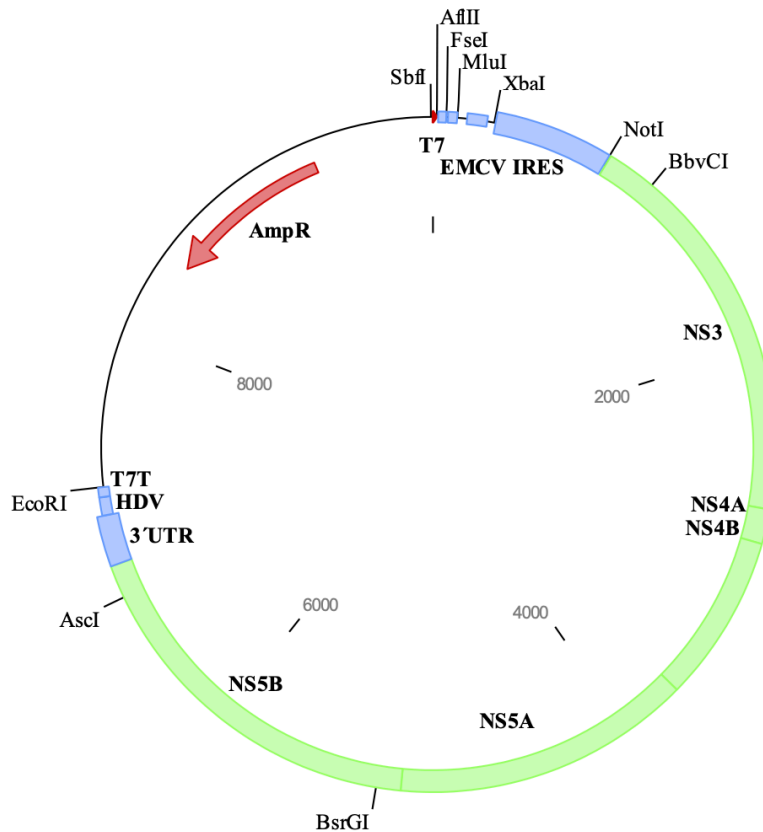
- Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUN, p. 1436). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01436>
- Xu, L., Sun, L., Guan, G., Huang, Q., Lv, J., Yan, L., Ling, L., & Zhang, Y. (2019). The effects of pH and salts on nucleic acid partitioning during phenol extraction. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 38(4), 305–320.
<https://doi.org/10.1080/15257770.2018.1533138>
- Yi, M., & Lemon, S. M. (2003). 3' Nontranslated RNA Signals Required for Replication of Hepatitis C Virus RNA. *Journal of Virology*, 77(6), 3557–3568.
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.6.3557-3568.2003>
- You, S., & Rice, C. M. (2008). 3' RNA Elements in Hepatitis C Virus Replication: Kissing Partners and Long Poly(U). *Journal of Virology*, 82(1), 184–195.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01796-07>
- Zeisel, M. B., Felmlee, D. J., & Baumert, T. F. (2013). Hepatitis C Virus Entry. In *Bartenschlager R. (eds) Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy. Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 87–112). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27340-7_4
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., & Chisari, F. V. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9294–9299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503596102>
- Zhou, L., Errigo, R. J., Lu, H., Poritz, M. A., Seipp, M. T., & Wittwer, C. T. (2008). Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis. *Clinical Chemistry*, 54(10), 1648–1656.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107615>

11 Anhang

11.1 Plasmidkarten

11.1.1 pUC18_P.s_WT_hp_9899

Plasmidkarte der Konstrukte hp_wt und hp_GND.



Feature	Description	Start – Stop (nt)
T7	T7 RNA Polymerase promoter	1-18
Stem-loop	40 nt GC-rich stem-loop sequence	25-64
S1 Aptamer	S1 Streptavidin aptamer sequence	72-116
Spinach aptamer_RC	Reverse complement of Spinach RNA aptamer sequence	163-260
EMCV IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site	300-855
NS3	Wild-type NS3 coding sequence	862-2754
NS4A	Wild-type NS4A coding sequence	2755-2916
NS4B	Wild-type NS4B coding sequence	2917-3699
NS5A	Wild-type NS5A coding sequence	3700-5097
NS5B	Wild-type NS5B coding sequence	5098-6873
3'UTR	HCV 3'-untranslated region	6874-7109
HDV	Hepatitis D Virus genomic ribozyme	7110-7196
T7T	T7 RNA Polymerase terminator	7197-7243
Amp R	Ampicillin resistance gene (RC)	8420-9280

Die Plasmidkarte stammt mit freundlicher Genehmigung von Lyudmila Shalamova.

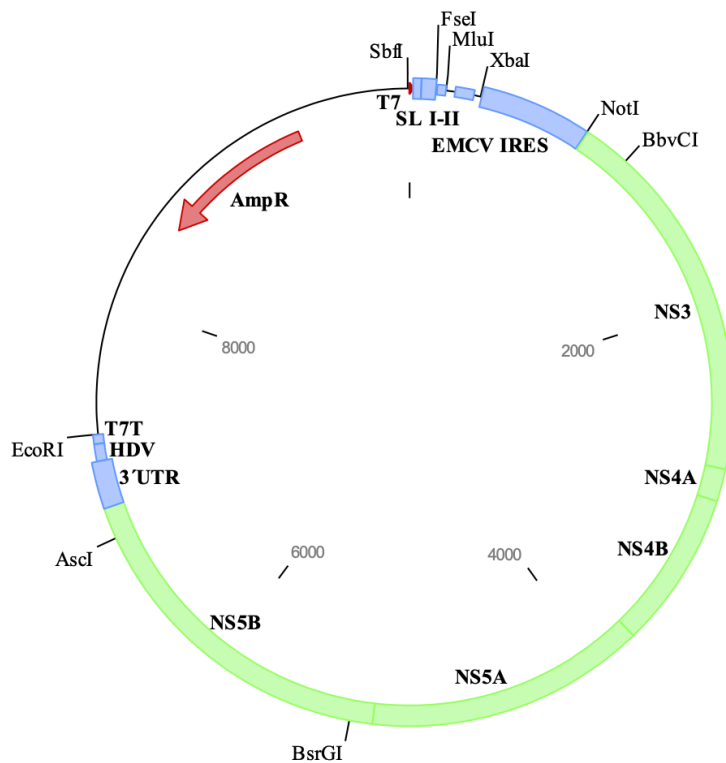
Quelle: Shalamova, 2018

11.1.2 pUC18_P.s_WT_hp_GND_9899

Das Plasmid ist eine Variante von pUC18_P.s_WT_hp_9899 mit einer GND Mutation im NS5B Gen (318D →N), welche zu einem Funktionsverlust der Polymerase führt (Lohmann et al., 1997). Die entsprechende Plasmidkarte ist in Abschnitt 11.1.1 zu finden.

11.1.3 pUC18_P.s_WT_SL I-II_wt_9968

Plasmidkarte des Konstruktes SL I-II_wt.



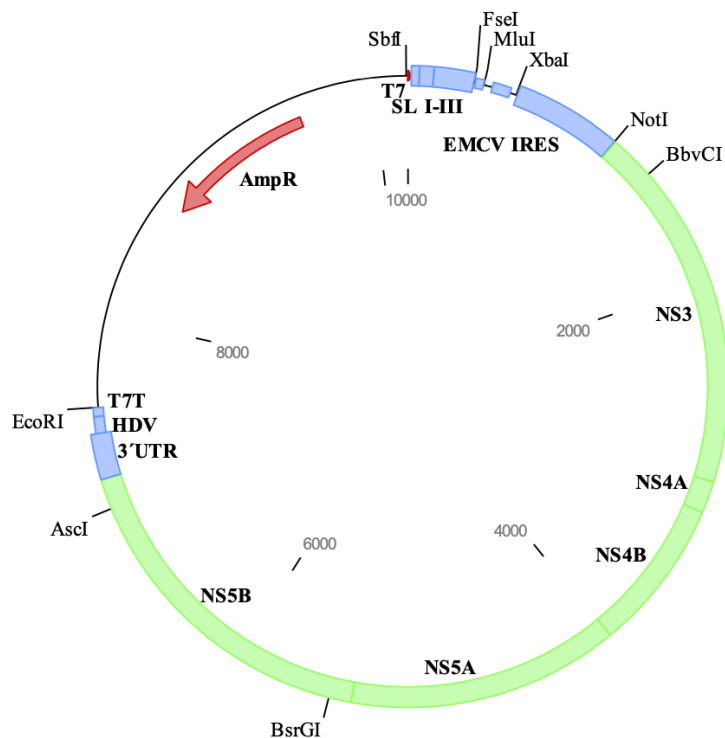
Feature	Description	Start – Stop (nt)
T7	T7 RNA Polymerase promoter	1-18
SL I (wt or S1mS2m miR-122 sites)	HCV SL I sequence (with wild-type or mutated miR-122 binding sites S1 and S2)	18-59 (38-44 and 54-59)
SL II	HCV SL II sequence	60-134
S1 Aptamer	S1 Streptavidin aptamer sequence	141-185
Spinach aptamer_RC	Reverse complement of Spinach RNA aptamer sequence	232-329
EMCV IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site	369-924
NS3	Wild-type NS3 coding sequence	931-2823
NS4A	Wild-type NS4A coding sequence	2824-2985
NS4B	Wild-type NS4B coding sequence	2986-3768
NS5A	Wild-type NS5A coding sequence	3769-5166
NS5B	Wild-type NS5B coding sequence	5167-6942
3'UTR	HCV 3'-untranslated region	6943-7178
HDV	Hepatitis D Virus genomic ribozyme	7179-7265
T7T	T7 RNA Polymerase terminator	7266-7312
Amp R	Ampicillin resistance gene (RC)	8489-9349

Die Plasmidkarte stammt mit freundlicher Genehmigung von Lyudmila Shalamova.

Quelle: Shalamova, 2018

11.1.4 pUC18_P.s_WT_SL I-III_10182

Plasmidkarte der Konstrukte SL I-III_wt und SL I-III_GND.



Feature	Description	Start – Stop (nt)
T7	T7 RNA Polymerase promoter	1-18
SL I (wt miR-122 sites)	HCV SL I sequence (with wild-type miR-122 binding sites 1 and 2)	18-59 (38-44 and 54-59)
SL II	HCV SL II sequence	60-134
SL III (wt or SL III _d mut)	HCV SL III sequence (with wild-type or GGG→CCC mutation in SL III _d)	135-346 (282-284)
S1 Aptamer	S1 Streptavidin aptamer sequence	355-399
Spinach aptamer_RC	Reverse complement of Spinach RNA aptamer sequence	446-543
EMCV IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site	583-1138
NS3	Wild-type NS3 coding sequence	1145-3037
NS4A	Wild-type NS4A coding sequence	3038-3199
NS4B	Wild-type NS4B coding sequence	3200-3982
NS5A	Wild-type NS5A coding sequence	3983-5380
NS5B	Wild-type NS5B coding sequence	5381-7156
3'UTR	HCV 3'-untranslated region	7157-7392
HDV	Hepatitis D Virus genomic ribozyme	7393-7479
T7T	T7 RNA Polymerase terminator	7480-7526
Amp R	Ampicillin resistance gene (RC)	8703-9563

Die Plasmidkarte stammt mit freundlicher Genehmigung von Lyudmila Shalamova.

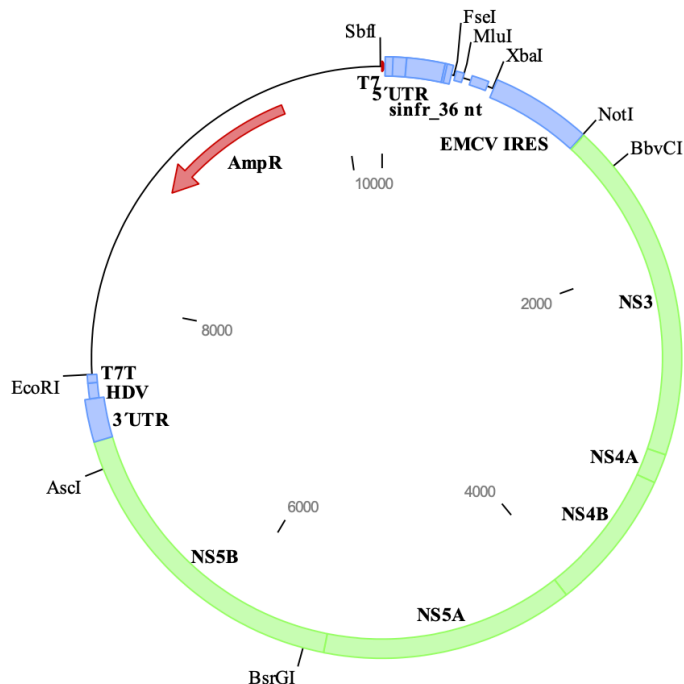
Quelle: Shalamova, 2018

11.1.5 pUC18_P.s_WT_SL I-III_GND_10182

Das Plasmid ist eine Variante von pUC18_P.s_WT_SL I-III_10182 mit einer GND Mutation im NS5B Gen (318D → N), welche zu einem Funktionsverlust der Polymerase führt (Lohmann et al., 1997). Die entsprechende Plasmidkarte ist in Abschnitt 11.1.4 zu finden.

11.1.6 pUC18_P.s_WT_5'UTRsinfr_stop_10242

Plasmidkarte für das Konstrukt 5'UTR_wt.



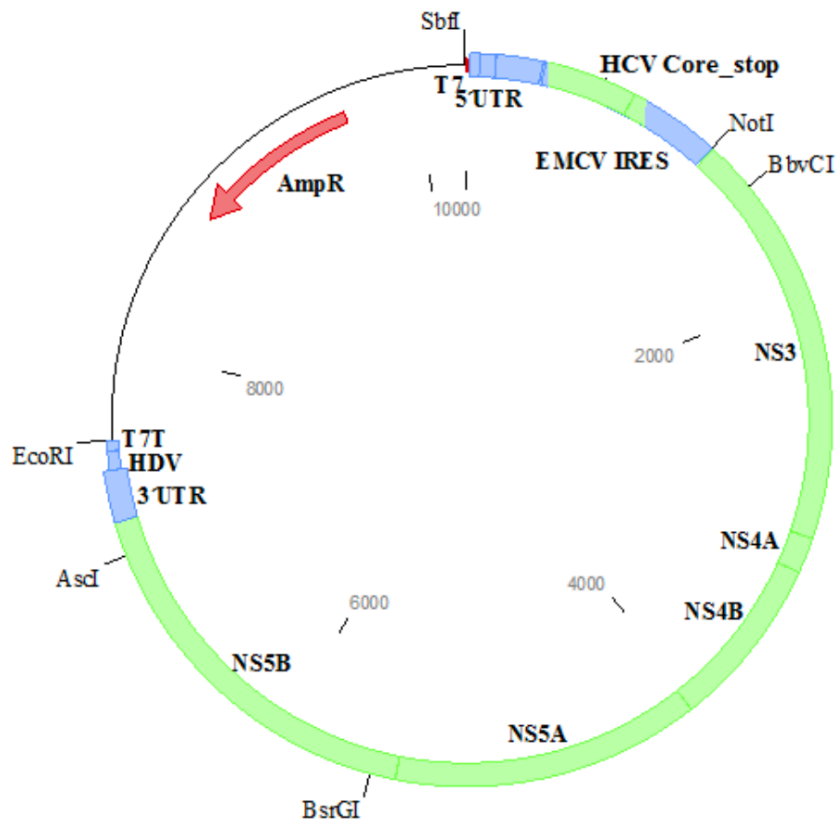
Feature	Description	Start – Stop (nt)
T7	T7 RNA Polymerase promoter	1-18
SL I (wt miR-122 sites)	HCV SL I sequence (with wild-type miR-122 binding sites S1 and S2)	18-59 (38-44 and 54-59)
SL II	HCV SL II sequence	60-134
SL III (wt or SL III _d mut)	HCV SL III sequence (with wild-type or GGG→CCC mutation in SL III _d)	135-346 (282-284)
SL IV	HCV SL IV sequence	347-370
sinfr_36 nt	Short in-frame HCV Core-coding sequence (36 nt) followed by UGA stop codon	358-393
S1 Aptamer	S1 Streptavidin aptamer sequence	415-459
Spinach aptamer_RC	Reverse complement of Spinach RNA aptamer sequence	506-603
EMCV IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site	643-1198
NS3	Wild-type NS3 coding sequence	1205-3097
NS4A	Wild-type NS4A coding sequence	3098-3259
NS4B	Wild-type NS4B coding sequence	3260-4042
NS5A	Wild-type NS5A coding sequence	4043-5440
NS5B	Wild-type NS5B coding sequence	5441-7216
3'UTR	HCV 3'-untranslated region	7217-7452
HDV	Hepatitis D Virus genomic ribozyme	7453-7539
T7T	T7 RNA Polymerase terminator	7540-7586
Amp R	Ampicillin resistance gene (RC)	8763-9623

Die Plasmidkarte stammt mit freundlicher Genehmigung von Lyudmila Shalamova.

Quelle: Shalamova, 2018

11.1.7 pUC18_P.s_WT_5'UTR_Core_10779

Plasmidkarte für das Konstrukt Core_wt.



Feature	Description	Start – Stop (nt)
T7	T7 RNA Polymerase promoter	1-18
SL I (wt miR-122 sites)	HCV SL I sequence (with wild-type miR-122 binding sites S1 and S2)	18-59 (38-44 and 54-59)
SL II	HCV SL II sequence	60-134
SL III	HCV SL III sequence	135-346
SL IV	HCV SL IV sequence	347-370
HCV Core_stop	HCV Core-coding sequence followed by a stop codon	358-930
S1 Aptamer	S1 Streptavidin aptamer sequence	952-996
Spinach aptamer_RC	Reverse complement of Spinach RNA aptamer sequence	1043-1140
EMCV IRES	Encephalomyocarditis Virus Internal Ribosome Entry Site	1180-1735
NS3	Wild-type NS3 coding sequence	1742-3634
NS4A	Wild-type NS4A coding sequence	3635-3796
NS4B	Wild-type NS4B coding sequence	3797-4579
NS5A	Wild-type NS5A coding sequence	4580-5977
NS5B	Wild-type NS5B coding sequence	5978-7753
3'UTR	HCV 3'-untranslated region	7754-7989
HDV	Hepatitis D Virus genomic ribozyme	7990-8076
T7T	T7 RNA Polymerase terminator	8077-8123
Amp R	Ampicillin resistance gene (RC)	9300-10160

Die Plasmidkarte stammt mit freundlicher Genehmigung von Lyudmila Shalamova.

Quelle: Shalamova, 2018

12 Publikationsverzeichnis

12.1.1 Manuskript in Bearbeitung

Shalamova LA *et al.* The Hepatitis C Virus RNA genome 5'-end regulates minus strand RNA synthesis initiation at the genome 3'-end.

13 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„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.“

Gießen, 12.09.2024

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann dafür danken, dass er mir die Mitarbeit an diesem Projekt, und damit auch die Doktorarbeit, ermöglicht hat. Er hat nicht nur den Arbeitsplatz und sämtliche Materialien bereitgestellt, sondern mir auch die Möglichkeit geboten jederzeit meine Probleme mit ihm zu diskutieren. Aus diesen Diskussionen konnte ich sehr viel Lernen und ohne sie wäre mir die Anfertigung dieser Arbeit und das Verständnis für die Laborarbeit sehr viel schwieriger gefallen.

Ein spezieller Dank gilt Prof. Dr. Michael Kracht für die Übernahme der Position des Zweitgutachters und die zügige Erstellung des Gutachtens.

Ein besonderer Dank geht auch an die Mitarbeiter der AG Niepmann, ohne die das Erlernen der ganzen Labormethoden undenkbar gewesen wäre. Frau Dr. Gesche K. Gerresheim danke ich vielmals für die Betreuung dieser Arbeit, die überragende Kompetenz und das offene Ohr welches sie für Probleme jeder Art hatte. Ich bedanke mich auch bei Masterstudentin Anna-Lena Hell für die zuverlässige Unterstützung und wertvollen Diskussionen. Dimitar Nachev danke ich für seinen Einfallsreichtum bei der Problemlösung sowohl bei fachlichen als auch bei allen anderen Dingen.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meiner Freundin, die mich das gesamte Studium über und auch bei dieser Arbeit immer bedingungslos unterstützt haben. Ich konnte mich stets mit meinem Frust an sie wenden und bin auf warmherziges Verständnis getroffen.

Abschließend möchte ich festhalten, dass die Erarbeitung dieser experimentellen Doktorarbeit mich um viele Erfahrungen bereichert hat, welche mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich weitergebracht haben.