

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Klinik für Innere Medizin II / Gastroenterologie und Hepatologie  
Direktor Prof. Dr. med. W. F. Caspary

**Generierung von Konsensusklonen für die Etablierung  
eines Replikonsystems nach Amplifikation klinisch  
charakterisierter Hepatitis C Virus Isolate**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des  
Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

**Markus Bruckner**

aus Istanbul

Frankfurt am Main 2005

Dekan: Professor Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent: Privatdozent Dr. med. C. Sarrazin

Koreferent: Professor Dr. med. W. F. Caspary

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2005

*Meinen Eltern in Dankbarkeit*



<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Historie .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Molekularbiologie des Hepatitis C Virus .....</b>	<b>1</b>
1.2.1. Taxonomie .....	1
1.2.2. HCV Genotypen und geographisches Verteilungsmuster .....	2
1.2.3. Morphologie .....	3
1.2.4. Molekularer Aufbau .....	3
1.2.4.1. Strukturelle Proteine .....	4
1.2.4.2. Nichtstrukturelle Proteine.....	6
<b>1.3. Infektion und Krankheit.....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Natürlicher Verlauf.....	8
1.3.2. Therapie der chronischen Hepatitis C Infektion.....	9
<b>1.4. Möglichkeiten der in vitro Untersuchung von HCV .....</b>	<b>10</b>
1.4.1. Tiermodelle.....	10
1.4.2. Zellkulturmodelle .....	10
<b>2. FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>3. PATIENTEN .....</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAL .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Reagenzien.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Enzyme .....</b>	<b>14</b>
4.2.1. Restriktionsendonukleasen .....	14
4.2.2. Andere Enzyme .....	15
<b>4.3. Fertige Reagenzien-Sets .....</b>	<b>15</b>
<b>4.4. Bakterienstämme .....</b>	<b>16</b>
<b>4.5. Vektoren .....</b>	<b>16</b>
<b>4.6. Geräte .....</b>	<b>18</b>
<b>4.7. Lösungen .....</b>	<b>19</b>

<b>4.8. Oligonukleotide.....</b>	<b>21</b>
4.8.1. Primer für PCR und Sequenzierung .....	21
4.8.2. Primer für die Mutagenese .....	24
<b>5. METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. HCV-RNA-Extraktion aus Patientenserum.....</b>	<b>26</b>
5.1.1. Prinzip.....	26
5.1.2. Durchführung .....	27
<b>5.2. Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) .....</b>	<b>28</b>
5.2.1. Prinzip der Reversen Transkription.....	28
5.2.2. Prinzip der PCR.....	29
5.2.3. Durchführung .....	33
5.2.3.1. RT-PCR für kurze DNA-Abschnitte .....	33
5.2.3.2. Lange RT-PCR (> 6000 Basenpaare).....	35
<b>5.3. Aufreinigung von PCR-Produkten .....</b>	<b>37</b>
5.3.1. Prinzip.....	37
5.3.2. Durchführung .....	38
<b>5.4. Elektrophorese.....</b>	<b>40</b>
5.4.1. Prinzip.....	40
5.4.2. Durchführung .....	42
<b>5.5. Sequenz-PCR und Sequenzierung .....</b>	<b>43</b>
5.5.1. Prinzip.....	43
5.5.2. Durchführung .....	45
5.5.2.1. Sequenz-PCR.....	45
5.5.2.2. Sequenzierung .....	46
<b>5.6. Transformation und Klonierung von PCR Produkten.....</b>	<b>47</b>
5.6.1. Prinzip.....	47
5.6.2. Durchführung .....	49
<b>5.7. Isolierung von Plasmiden aus E. coli .....</b>	<b>51</b>
5.7.1. Prinzip.....	51

5.7.2.	Durchführung .....	51
5.7.2.1.	Miniprep .....	51
5.7.2.2.	Maxiprep.....	52
<b>5.8.</b>	<b>Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in einer Lösung.....</b>	<b>53</b>
5.8.1.	Prinzip.....	53
5.8.2.	Durchführung .....	53
<b>5.9.</b>	<b>Erstellung einer Konsensussequenz.....</b>	<b>55</b>
5.9.1.	Prinzip.....	55
5.9.2.	Durchführung .....	55
<b>5.10.</b>	<b>Mutagenese.....</b>	<b>57</b>
5.10.1.	Prinzip.....	57
5.10.2.	Durchführung .....	61
<b>5.11.</b>	<b>Restriktionsverdau und Ligation .....</b>	<b>63</b>
5.11.1.	Prinzip.....	63
5.11.2.	Durchführung .....	65
<b>5.12.</b>	<b>Umklonierung der Konsensusklone in den pFK1 Vektor zur Replikation in Hepatomazelllinien.....</b>	<b>66</b>
5.12.1.	Prinzip.....	66
5.12.2.	Durchführung .....	68
5.12.2.1.	Erstellung des fertigen Konsensusklons zur Einbringung in den pFK1 Vektor .....	68
5.12.2.2.	Umklonierung in pFK mit Elimination der Mut7.....	73
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1.</b>	<b>Herstellung von Primern für die lange PCR.....</b>	<b>77</b>
6.1.1.	Amplifikation der HCV 1b NS2 / NS3 und NS5B / 3' NTR Übergangsregionen.....	77
6.1.2.	Klonierung und Sequenzierung der HCV 1b NS2 / NS3 und NS5B / 3' NTR Übergangsregionen .....	83
<b>6.2.</b>	<b>Lange PCR .....</b>	<b>87</b>
6.2.1.	Entwicklung eines PCR Protokolls für die lange HCV 1b PCR.....	87

6.2.2.	Erstellung von Amplifikaten der nichtstrukturellen HCV 1b Gene von ausgewählten Patientenseren .....	92
<b>6.3.</b>	<b>Erstellung der Konsensusklone .....</b>	<b>93</b>
6.3.1.	Klonierung der Lang-PCR Produkte .....	93
6.3.2.	Sequenzierung der Klone und Erstellung der Konsensussequenzen .....	95
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>97</b>
<b>7.1.</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>97</b>
7.1.1.	Lange RT-PCR .....	97
7.1.2.	Sequenzierung .....	98
7.1.3.	Mutagenese .....	99
7.1.4.	Umklonierung .....	101
<b>7.2.</b>	<b>Replikons .....</b>	<b>101</b>
7.2.1.	HCV vermittelte Resistenzmechanismen .....	101
7.2.2.	Replikonsysteme .....	103
7.2.3.	Konsensussequenzen klinisch charakterisierter Isolate .....	104
<b>8.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>108</b>
<b>8.1.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>8.2.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>111</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>127</b>



## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Historie**

Nach der Identifikation des Hepatitis B Virus in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts und des Hepatitis A Virus in den Siebzigern (14, 87) wurde bald deutlich, dass ein weiterer, bisher unbekannter Erreger existieren musste, der ebenfalls Hepatitiden auszulösen vermochte. Die durch ihn verursachte, oft nach Bluttransfusionen auftretende Gelbsucht wurde in Unkenntnis des Erregers zunächst Non-A-Non-B Hepatitis (NANBH) genannt. Durch molekularbiologische Methoden gelang es 1989, den Erreger aus dem Serum von mit Non-A-Non-B Hepatitis infizierten Schimpansen zu isolieren. Dazu wurde aus dem Serum die gesamt-RNA extrahiert, daraus per reverser Transkription komplementäre DNA (cDNA) hergestellt und diese in einer Expressionsgenbibliothek in  $\lambda$ -gt Bacteriophagen etabliert. Nach Transfektion in *E. coli* wurden die so exprimierten Proteine auf Reaktivität mit Sera getestet, die von mit NANBH infizierten Patienten stammten, bis sich nach mehr als einer Million untersuchter Proteine ein positiver Klon fand, der offensichtlich Virusnukleinsäure exprimierte. Aus diesem wurde letztendlich das Genom des später als Hepatitis C Virus identifizierten Erregers sequenziert (17, 24).

### **1.2. Molekularbiologie des Hepatitis C Virus**

#### **1.2.1. Taxonomie**

Das Hepatitis C Virus ist als humanpathogenes, hepatotropes, parenteral übertragbares Virus der einzige Vertreter der Gattung Hepacivirus, welche wiederum zusammen mit den Gattungen Flavivirus und Pestivirus die Virusfamilie der Flaviviridae bildet (18, 111) (Tab. 1.1). Die Vertreter des Genus Flavivirus sind humanpathogene Erreger von Enzephalitiden und hämorrhagischen Fiebrern, Pestiviren sind ausschliesslich tierpatho-

gen. Während die Gattung Flavivirus als Überträger Gliederfüssler benötigt, können die Gattungen Hepaci- und Pestivirus direkt persistente Infektionen in Säugern hervorrufen.

<b>Familie</b>	<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Genotypen</b>
Flaviviridae	Flavivirus	FSME	
		YFV	
		DENV	Dengue 1-4
		JEV	
		WNV	
	Hepacivirus	HCV	HCV 1-6
	Pestivirus	BDV	
		BVBV	
		HCHV	
		CSFV	
	bisher nicht zugeordnet	GBV-A, -B, -C	
		HGV	

**Tab. 1.1.** Taxonomische Klassifikation der Flaviviridae. Es sind nur die wichtigsten Vertreter aufgeführt. Abkürzungen: FSME: Frühsommer-Meningo-Enzephalitis, YFV: Gelbfieber, DENV: Dengue-Fieber, JEV: Japanische Enzephalitis, WNV: West-Nil-Fieber, HCV: Hepatitis C Virus, BDV: Border Disease Virus, BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus, HCHV: Hog Cholera Virus, CSFV: Classical Swine Fever Virus, GBV: GB-Virus Typ A, B, C, HGV: Hepatitis G Virus.

### 1.2.2. HCV Genotypen und geographisches Verteilungsmuster

Durch phylogenetische Untersuchungen von bisher sequenzierten HCV Isolaten können heute weltweit mindestens sechs verschiedene Genotypen (Typ 1 bis 6) unterschieden werden, die im Bereich der strukturellen Proteine Basensequenzunterschiede von über 30 % aufweisen. Des weiteren lassen sich innerhalb der Gruppen weitere Subtypen (a, b, c) unterscheiden, deren Homologie untereinander 80 – 90 % beträgt. Etwa 5 % aller HCV Isolate lassen sich als Ausdruck der starken Quasispeziesbildung keiner Gruppe zuordnen (20, 78, 101).

Weltweit lassen sich deutliche Unterschiede in der Prävalenz der einzelnen Subtypen feststellen. In Deutschland und Europa herrscht der Genotyp 1 vor, wobei der Subtyp 1b über 1a dominiert. Diese beiden Subtypen von HCV machen hier zusammen etwa 50 bis 70 % aller Infektionen aus. In absteigender Häufigkeit folgen dann HCV 3a, 2a und 2c. Andere Genotypen sind in Europa nur sehr selten anzutreffen (10, 91). In Nordamerika ähneln die Häufigkeiten denen in Europa, mit dem Unterschied, dass in den USA der Typ 1a noch vor 1b die häufigste Variante darstellt (11, 70). Genotyp 4 findet sich gehäuft in Afrika, im Wesentlichen in Ägypten und Kamerun sowie im Nahen Osten (77, 117), Genotyp 5 in Südafrika (102) und Genotyp 6 in Südostasien (27, 72)

### *1.2.3. Morphologie*

Flaviviridae sind morphologisch gekennzeichnet durch ein ikosaedrisches Kapsid, welches von einer enganliegenden, mit mindestens zwei verschiedenen Hüllglykoproteinen (E1 und E2 bei Hepacivirus, E und M bei Flavivirus, E1, E2 und E<sup>ms</sup> bei Pestivirus) besetzten Lipidhülle umgeben ist. Im Inneren befindet sich die einzelsträngige genomische (+)-RNA assoziiert mit dem Kapsid (Core, C) Protein. Der Durchmesser des Kapsids beträgt ca. 30 nm, die des ganzen Virions ca. 50 nm. Eine elektronenmikroskopische Darstellung des intakten Hepatitis C Virus ist bisher nicht gelungen.

### *1.2.4. Molekularer Aufbau*

Die positiv orientierte RNA des Hepatitis C Virus umfasst etwa 9.600 Basenpaare und dient in der Zelle direkt als mRNA. Sie kodiert in einem einzigen grossen Leseraster (open reading frame, ORF) für ein ca. 3000 Aminosäuren langes Polyprotein, welches durch zelleigene Signalpeptidasen des endoplasmatischen Retikulums und viruskodierte Proteasen zum Teil bereits während der Translation, teils erst danach in die einzelnen Virusproteine gespalten wird (5, 6, 36, 60, 88). Die Virus RNA besitzt bei den Gattungen Hepaci- und Pestivirus jedoch keine Cap-Struktur am 5' Ende, welche normalerweise für die Bindung der Ribosomen an die RNA benötigt wird, sondern stattdessen eine

interne Ribosomeneintrittsstelle (internal ribosome entry site, IRES). Mit ihr kann die Expression des HCV Polyproteins ohne Zuhilfenahme zelleigener Expressionsfaktoren direkt vom AUG Startcodon aus gesteuert werden (31, 89). Diese Ribosomeneintrittsstelle befindet sich in einem Abschnitt eines 341 Basen umfassenden, hochkonservierten, nicht translatierten Überhanges am 5' Ende der RNA (nicht-translatierte Region, 5'NTR). Am 3' Ende des Genoms befindet sich ebenfalls eine NTR, diese ist 230 Basen lang und unterteilt sich in einen kurzen variablen Abschnitt, gefolgt von einer poly-U/UT-Sequenz und einer hochkonservierten Region von 98 Nukleotiden an deren Ende. Nach der Spaltung des Polyproteins entstehen folgende virale Proteine (Angabe in Richtung 5' → 3'): Kapsid (Core, C), Hüllprotein 1 (Envelope, E1), Hüllprotein 2 (E2), p7 und die nicht-strukturellen Proteine NS2, 3, 4A, 4B, 5A und 5B.

Aufgrund der hohen Fehlerrate der RNA Polymerasen (ca.  $2 \cdot 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotid pro Jahr) bei einer gleichzeitig hohen Replikationsrate (die Virushalbwertszeit beträgt lediglich 2 bis 3 Stunden) (42) entstehen im Laufe der Zeit bei einer chronifizierten Infektion zahlreiche unterschiedliche HCV Isolate (Quasispezies) (42, 79, 80, 100), die sich teilweise nur in der Nukleotidsequenz, teilweise aber auch erheblich in der Aminosäuresequenz unterscheiden. In bestimmten hypervariablen Regionen (HVR) des HCV Genoms beträgt die Mutationsfrequenz sogar bis zu  $0,13 \cdot 10^{-1}$  Mutationen pro Nukleotidposition und Jahr (54). Diese enorme Wandlungsfähigkeit des Virusgenoms wird verantwortlich gemacht für die hohe Chronifizierungsrate durch ständige immunologische Alteration (Escape-Phänomen) (114).

#### *1.2.4.1. Strukturelle Proteine*

Das Core Protein kommt in zwei Erscheinungsformen vor, als 23 kDa und als 21 kDa schweres Protein. Es wird angenommen, dass das schwerere Protein zunächst am Endoplasmatischen Retikulum der Zelle synthetisiert und dann im Zytoplasma weiter zur 21 kDa Variante prozessiert wird, welche dann den eigentlichen Bestandteil des nativen Virus darstellt. Aus ihm ist das Kapsid zusammengesetzt, welches in seinem Inneren die virale Nukleinsäure enthält (90, 116). Des Weiteren scheint das Core Protein auch eine

Rolle bei der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms bei chronischer HCV Infektion zu spielen, indem es die zelleigenen DNA Reparaturmechanismen hemmt (55, 110).

Neueren Untersuchungen zufolge wird bei HCV Typ 1 im Bereich des Core Proteins durch einen Frameshift ein weiteres Protein synthetisiert. Dieses sogenannte F Protein oder auch core+1 Protein wird beim Subtyp 1a durch eine Verschiebung des Leserasters bei Codon 11 translatiert (112, 115), bei Subtyp 1b durch eine Verschiebung bei Codon 42 (15). Antikörper gegen dieses ca. 17 kd grosse Protein konnten bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nachgewiesen werden, seine Bedeutung ist jedoch bislang unklar.

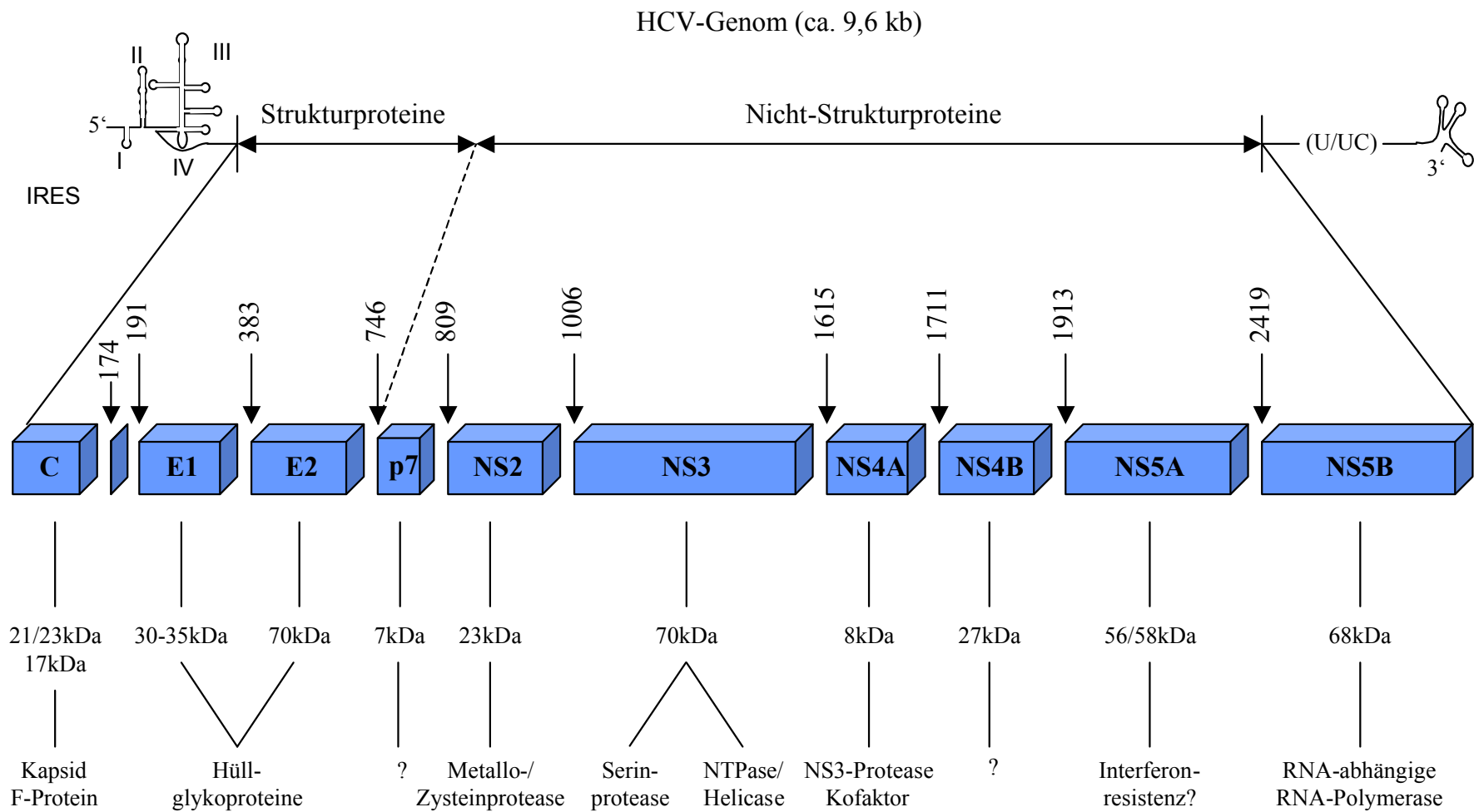
Die beiden Glykoproteine E1 und E2 sind Typ I Transmembranproteine. Am aminoterminalen Ende des E2 Proteins befindet sich eine hypervariable Region (HVR1), der eine bedeutende Rolle bei der Chronifizierung einer HCV Infektion zugesprochen wird (51). Mutationen im Bereich der HVR1 als eine massgebliche Ursache für ein Nichtansprechen auf eine Interferon basierte Therapie wurden in zahlreichen Studien untersucht, bisher jedoch ohne ein einheitliches Ergebnis. Weiterhin befinden sich auf dem E2 Protein eine HVR2, eine mutmaßliche CD81 Rezeptorbindungsregion und eine PKR/eIF2a Phosphorylierungs-Homologiedomäne, deren Bedeutung für eine Therapieresistenz bzw. für die Entwicklung der HCV-assoziierten Kryoglobulinämie näher untersucht wurden (43, 44, 97, 105, 106).

Die Rolle des vom E2 Protein nicht vollständig abgespaltenen Proteins p7 ist bislang unklar. *In vitro* Studien gaben Hinweise auf eine Funktion als viruskodierter Ionenkanal. Dies könnte sich für einen neuen Ansatz in der antiviralen Therapie als wichtig erweisen, zumal sich der synthetisierte Ionenkanal durch verschiedene Stoffe blocken liess (37, 81). *In vivo* Studien legen ausserdem eine genotypspezifische Unverzichtbarkeit für die Infektiosität von HCV nahe (93).

#### *1.2.4.2. Nichtstrukturelle Proteine*

Das NS2 Protein spaltet sich in einer autokatalytischen Reaktion vom NS3 Protein ab. Es scheint weiterhin regulatorisch im Sinne eines inhibitorischen Expressionsfaktors in den DNA-Stoffwechsel der Wirtszellen einzugreifen (26). NS3 selber spaltet sich zunächst ebenfalls autokatalytisch von NS4A ab, mit welchem es anschliessend einen stabilen Komplex zur NS3/NS4A Protease bildet und die restlichen nichtstrukturellen HCV Proteine prozessiert (4, 5, 6, 60). Das NS3 Protein beinhaltet ausserdem eine Nucleosidtriphosphatase (NTPase) / RNA-Helikase, die bei der Replikation der HCV RNA benötigt wird (86). NS4A ist ein wichtiger Kofaktor für die NS3/4A Protease und ist darüber hinaus an Phosphorylierungsvorgängen beteiligt. Über das NS4B Protein ist bislang nur sehr wenig bekannt. Es ist sowohl zytoplasmatisch als auch am endoplasmatischen Retikulum zu finden und scheint als Membrananker regulatorische Eigenschaften für die Virusreplikation zu besitzen (64, 83). NS5A scheint neben vielen regulatorischen Funktionen auch eine besondere Rolle bei der Resistenz gegen eine Interferonbasierte Therapie zu spielen (16, 95, 96, 98, 99, 104). Das NS5B Protein schliesslich stellt eine transmembranär verankerte, HCV-spezifische RNA-abhängige RNA Polymerase dar, die für die Replikation des Virusgenoms zwingend notwendig ist (56, 58, 63, 83).

Eine Übersicht über den genomischen Aufbau des Hepatitis C Virus kann Abb. 1.1 entnommen werden.



**Abb. 1.1.** HCV Genomstruktur. Die Pfeile geben die Schnittstellen des Polyproteins wieder und sind mit der Nummer der Aminosäure bezeichnet (Zählung nach dem HCV 1b Prototyp HCV-J) (49). Näheres siehe Text.

### **1.3. Infektion und Krankheit**

#### *1.3.1. Natürlicher Verlauf*

Das Hepatitis C Virus wird nach heutigem Kenntnisstand ausschliesslich parenteral übertragen. Hierbei spielt der Weg über Blut und Blutprodukte sowie nicht genügend sterilisierte Instrumente und Kanülen (insbesondere bei i.v. Drogenabusus) die grösste Rolle. Eine sexuelle sowie perinatale Übertragung von Hepatitis C ist möglich, aber im Vergleich zu den beiden Hauptübertragungswegen sehr selten (121). Nach Schätzungen der WHO liegt die weltweite Prävalenz der HCV Infektion bei etwa 3 %, jedoch mit erheblichen regionalen Schwankungen (1, 109). In Deutschland sind ca. 0,4 – 0,6 % der Bevölkerung an Hepatitis C erkrankt (HCV Antikörper positiv), bei einer jährlichen Neuinfektionsrate von über 5.000 Menschen (39).

Ähnlich wie bei der Hepatitis A und B treten bei einer akuten Neuinfektion mit HCV nur selten typische Hepatitis-Zeichen auf. Oft verläuft die Krankheit zunächst inapparent oder mit unspezifischen grippeähnlichen Symptomen. Neben dem Hauptzielorgan Leber vermehrt sich das Virus vermutlich auch in mononukleären Zellen des Blutes. In den ersten Wochen der Infektion kommt es zunächst zu einer Vermehrung des Virus mit einer HCV RNA Konzentration im Blut von bis zu  $10^8$  IU / ml, wobei aufgrund der hohen Fehlerrate der Virus-RNA-Polymerase vermutlich nur etwa 1 bis 10 % der Viruspartikel infektiös sind (17, 65). In diesem Stadium kann die Infektion nur durch einen direkten Nachweis erfolgen, die klinischen Laborparameter bleiben im Normbereich. Nach vier bis zwölf Wochen kommt es zu einer milden, meist anikterischen Hepatitis mit einer mässigen Erhöhung der Alaninaminotransferase (ALT) im Serum. Schwere Verläufe mit fulminantem Leberversagen sind sehr selten.

In der Mehrzahl der Fälle kommt es jedoch nicht zu einer Ausheilung der akuten Infektion, sondern in 60 – 80 % der Fälle zu einer Chronifizierung der Krankheit (2). Dabei entsteht im Verlauf über Jahrzehnte eine progrediente Leberzirrhose mit einem signifikant erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC),



wobei die Rolle von HCV-eigenen Proteinen bei der Karzinogenese bisher nicht genau bekannt ist (82, 92, 108). Die lange, milde Verlaufsform der Infektion deutet darauf hin, dass das Virus an sich nur wenig zytotoxisch ist, die beobachteten Symptome sind eher Ausdruck der Immunabwehr des Körpers. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass Akutinfektionen mit starker Symptomatik als Ausdruck einer kräftigen Immunantwort deutlich häufiger (ca. 50 % der Fälle) zu einer Ausheilung gelangen als asymptomatische. Insbesondere eine T-Zell vermittelte Immunantwort scheint hier eine entscheidende Rolle zu spielen (35).

### *1.3.2. Therapie der chronischen Hepatitis C Infektion*

Noch vor der Erstbeschreibung des Hepatitis C Virus wurden erste erfolgreiche Therapieversuche der chronischen Non-A-Non-B Hepatitis mit Interferon alpha (IFNa) durchgeführt (46). Die Ansprechraten der IFNa Monotherapie lagen jedoch nur bei ca. 10 %. Eine deutliche Verbesserung gelang durch die Einführung einer Kombinationstherapie aus IFNa und dem Nukleosidanalogon Ribavirin über 48 Wochen. Hierbei konnten die Ansprechraten auf ca. 40 % angehoben werden (69, 85). Gegen Ende der 90er Jahre wurden pegylierte (PEG) Interferone eingeführt, die durch einen verzögerten Abbau einen konstanteren Wirkspiegel im Serum gewährleisteten. Die Erfolgsraten einer Monotherapie mit Peginterferon alpha waren mit 20 – 40 % vergleichbar mit denen einer Kombinationstherapie mit Standard-IFNa und Ribavirin (119). Als logische Schlussfolgerung daraus wurde eine Kombinationstherapie von Peginterferon alpha plus Ribavirin untersucht, welche die Ansprechraten erneut verbessern konnte und heute als Standardtherapie angesehen wird. In Abhängigkeit der Therapiedauer zeigen ca. 50 – 60 % aller Patienten mit einer chronischen HCV Infektion hierunter ein dauerhaftes virologisches Ansprechen. Interessant ist hierbei, dass eine Infektion mit Genotyp 1 nur in 40 – 50 % der Fälle ein Ansprechen zeigt, bei Genotyp 2 und 3 liegen die Erfolgsquoten dagegen bei 80 – 90 % (32, 40, 66).

## 1.4. Möglichkeiten der *in vitro* Untersuchung von HCV

### 1.4.1. Tiermodelle

Durch die hohe Speziesselektivität von HCV ist es bisher nicht möglich, das Virus, beziehungsweise den Infektionsverlauf oder neue Therapieansätze am Kleintiermodell effektiv zu studieren. Einzig Schimpansen zeigen sich empfänglich für eine Infektion mit HCV, doch sind tierexperimentelle Untersuchungen dadurch aufwendig, teuer und, bedingt durch einen vergleichsweise milderen und häufig kurzen Verlauf, nur eingeschränkt aussagekräftig (8).

### 1.4.2. Zellkulturmodelle

Bis vor kurzem existierten keine Zellkulturmodelle, in denen HCV kontinuierlich zur Replikation gebracht werden konnte. 1998 gelang eine stabile und regulierbare Expression des gesamten ORF in Zellkultur in Osteosarkomzellen (74). Ein erstes stabiles replikatives Zellkulturmodell der nichtstrukturellen Proteine in Hepatomazellen der Linie Huh-7 auf der Basis eines HCV Genotyp 1b Isolats wurde von Lohmann und Bartenschlager 1999 etabliert (62) und bot erstmals die Möglichkeit, HCV in einer Leberzellkultur zu untersuchen. Adaptive Mutationen im Virusgenom sowie Anpassungsvorgänge in der Zelllinie konnten in nachfolgenden Arbeiten die Replikationseffizienz des Replikons deutlich erhöhen (59, 61). Seit kurzem existieren auch HCV Replikons anderer HCV Subtypen (HCV 1a, HCV 2) und in verschiedenen anderen Zelllinien (Maus Hepatomazellen sowie humane Epithelzelllinien) (12, 13, 38, 48, 52, 122). Die Übertragbarkeit dieser Zellkulturmodelle auf die Situation *in vivo* scheint durch die adaptativen Mutationen jedoch nur eingeschränkt möglich (19).

## **2. FRAGESTELLUNG**

Ein grundsätzliches Problem des bestehenden HCV Zellkulturmodells ist die fehlende klinische Charakterisierung der HCV Isolate. Es sind keine Informationen hinsichtlich der Patienten, des Verlaufs und eines eventuellen Erfolges einer Therapie verfügbar. Es stellt sich beim Betrachten der Therapiestatistiken jedoch die Frage, wie das teilweise stark unterschiedliche Ansprechen verschiedener Genotypen, Subtypen und Isolate untereinander auf eine interferonbasierte Therapie zu erklären ist. Hierzu wären replikative Zellkulturmodelle mit klinisch charakterisierten Isolaten nötig, an denen eventuelle Unterschiede, insbesondere eine aufgetretene Interferonresistenz, untersucht werden können. Daraus ergibt sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit: Herstellung von Replikons, deren klinischer Hintergrund (Patient, Genotyp, Verhalten unter IFN-basierter Therapie) klar dokumentiert ist zur Einbringung in Zellkulturmodelle.

### 3. PATIENTEN

Die Sera, aus denen die Isolate für diese Arbeit gewonnen wurden, stammen alle von Patienten, die an chronischer Hepatitis C (HCV Genotyp 1b) erkrankt waren und im Rahmen von Studien an einer kombinierten Therapie mit Interferon alpha-2b und Ribavirin teilnahmen. Alle verwandten Sera wurden vor Beginn der Therapie entnommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Alle Patienten haben die Studien inklusive der Nachkontrollen abgeschlossen und sind in Hinblick auf ihren Krankheitsverlauf vollständig dokumentiert.

Folgende Sera wurden für diese Arbeit ausgewählt:

Serum Nr.	Initialen	Therapieregime	virolog. Ansprechen
3423	H-R	1	dauerhaftes Ansprechen
8036	H-H	1	dauerhaftes Ansprechen
8422	M-H	2	fehlendes Ansprechen
8467	J-S	1	dauerhaftes Ansprechen
8757	G-H	1	fehlendes Ansprechen
8769	R-T	2	dauerhaftes Ansprechen

**Tab. 3.1.** In dieser Arbeit verwandte Sera. Die entsprechenden Therapieregime können Tab. 3.2 entnommen werden.

	Interferon	Ribavirin	Dauer
<b>Regime 1</b>	standard IFN-alpha-2b 3x3 Mio IE pro Woche	1000 mg/d < 75 kg KG 1200 mg/d = 75 kg KG	48 Wochen
	10 Mio IFN/Tag für 2 Wochen		
<b>Regime 2</b>	5 Mio IFN/Tag für 6 Wochen	1000 mg/d < 75 kg KG	48 Wochen
	3 Mio IFN/Tag für 16 Wochen	1200 mg/d = 75 kg KG	
	3x3 Mio IFN/Wo für 24 Wochen		

**Tab. 3.2.** Interferon- und Ribavirindosierungen in den einzelnen Therapieregimen. KG: Körpergewicht.

## 4. MATERIAL

### 4.1. Reagenzien

5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid (X-gal, C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrClNO<sub>6</sub>, Roth, Karlsruhe); Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe); Agarose Standard (Quantum, Heidelberg); Ampicillin-Natriumsalz (D-[+]-a-Aminobenzylpenicillin, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S, AppliChem, Darmstadt); Aqua bidestillata (B.Braun, Melsungen);  $\beta$ -Mercaptoethanol (Stratagene, Amsterdam, Niederlande); Borsäure (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AppliChem, Darmstadt); Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim); Casein Hydrolysat (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); D-(+)-Saccharose (Fluka, Neu-Ulm); Desoxyadenosintriphosphat-Lithium (dATP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxyadenosintriphosphat-Natrium (dATP, 100 mM, Natriumsalz, Roche, Mannheim); Desoxycytidintriphosphat-Lithium (dCTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxycytidintriphosphat-Natrium (dCTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxyguanosintriphosphat-Lithium (dGTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxyguanosintriphosphat-Natrium (dGTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix, 10mM, Invitrogen, Groningen, Niederlande); Desoxythymidintriphosphat-Lithium (dTTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Desoxythymidintriphosphat-Natrium (dTTP, 100 mM, Roche, Mannheim); Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt); Dithiothreitol (DTT, 100 mM, Roche, Mannheim); DNA-Längenstandards: DNA Molecular Weight Marker VI (Roche, Mannheim),  $\lambda$ -DNA/*Hind*III Marker 2 (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) und 100bp Ladder (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); Elektrophoresegel zur Sequenzierung (ABI 3100 Pop-6 [Performance optimized polymer 6], Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml, AppliChem, Darmstadt); Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Sigma-Aldrich, Steinheim); Expand Long Template PCR System: Expand Buffer 3 (Roche, Mannheim), Expand RT Buffer (Roche, Mannheim); Glucose 20% (B. Braun, Melsungen); Harnstoff (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, Roth, Karlsruhe); Hefe-Extrakt (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG, C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S, AppliChem, Darmstadt); Kaliumchlorid (KCl, Roth, Karlsruhe); Kaliumphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Roth, Karlsruhe); Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>, Roth, Karlsruhe); Kanamycin A

(C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich, Steinheim); Luria-Bertani Agar (LB, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); Luria-Bertani Broth Base (LB Broth, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>, 25 mM, Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>, Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Methylenblau (Invitrogen, Groningen, Niederlande); N,N-Dimethylformamid (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO, Merck, Darmstadt); Natriumchlorid (NaCl, Roth, Karlsruhe); Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Roth, Karlsruhe); NZ Amine (Casein Hydrolysat, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); PCR Reaction Buffer (Roche, Mannheim); Random Hexamere (50 µM, Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); RNase freies Wasser (Diethylpyrocarbonat [DEPC] behandelt, Fluka, Neu-Ulm); TSR Puffer (Template Suppression Reagent, Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Tris-Puffer (Tris[Hydroxymethyl]aminomethan, NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, Amersham Biosciences, Freiburg); Trypton (Casein Hydrolysat, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein).

## 4.2. Enzyme

### 4.2.1. Restriktionsendonukleasen

Enzym	Konz.	Zielsequenz mit Schnittstellen	Bezugsquelle
<i>Afl</i> II	10 U/µl	C <sup>?</sup> TTAA <sub>?</sub> G	Roche, Mannheim
<i>Asc</i> I	10 U/µl	GG <sup>?</sup> CGCG <sub>?</sub> CC	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Ase</i> I	10 U/µl	AT <sup>?</sup> TA <sub>?</sub> AT	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Bae</i> Ia	5 U/µl	<sup>?</sup> <sub>10(N)</sub> ACNNNNGTAYC(N) <sub>12</sub> <sup>?</sup> <sub>?</sub> <sub>15(N)</sub> TGNNNNCATUG(N) <sub>7</sub> <sup>?</sup>	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Bgl</i> I	10 U/µl	GCCN <sub>?</sub> NNN <sup>?</sup> NGGC	Roche, Mannheim
<i>Bgl</i> II	10 U/µl	A <sup>?</sup> GATC <sub>?</sub> T	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Bsp</i> EI	10 U/µl	T <sup>?</sup> CCGG <sub>?</sub> A	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Bst</i> XI	10 U/µl	CCAN <sup>?</sup> NNNN <sub>?</sub> NTGG	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Dpn</i> I	10 U/µl	GA <sup>?</sup> TC	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

<i>Eco</i> RI	10 U/μl	G <sup>2</sup> AATT <sub>7</sub> C	Roche, Mannheim
<i>Hin</i> dIII	10 U/μl	A <sup>2</sup> AGCT <sub>7</sub> T	Roche, Mannheim
<i>Mun</i> I	10 U/μl	C <sup>2</sup> AATT <sub>7</sub> G	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Nco</i> I	10 U/μl	C <sup>2</sup> CATG <sub>7</sub> G	Roche, Mannheim
<i>Pme</i> I	5 U/μl	GTTT <sup>2</sup> AAAC	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Sal</i> I	10 U /μl	G <sup>2</sup> TCGA <sub>7</sub> C	Roche, Mannheim
<i>Sca</i> I	10 U/μl	AGT <sup>2</sup> ACT	Roche, Mannheim
<i>Sfi</i> I	10 U/μl	GGCCN <sub>7</sub> NNN <sup>2</sup> NGGCC	Roche, Mannheim
<i>Spe</i> I	10 U/μl	A <sup>2</sup> CTAG <sub>7</sub> T	Roche, Mannheim

#### 4.2.2. Andere Enzyme

AmpliTaq Gold DNA Polymerase (E.C.2.7.7.7, 5 U/μl, Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Expand Pwo/Taq DNA Polymerase-Mix (3,5 U/μl, Roche, Mannheim); Expand Reverse Transkriptase (E.C.2.7.7.49, 50 U/μl, Roche, Mannheim); Pfu-Turbo DNA Polymerase (2,5 U/μl, Stratagene, Amsterdam, Niederlande); RNase Inhibitor (RNaseOut, 40 U/μl, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); SuperScript Reverse Transkriptase (Moloney Murine Leukämie-Virus [M-MLV] RNase H<sup>-</sup>, 200 U/μl, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); T4 DNA Ligase (1 U/μl, MBI Fermentas, St.Leon-Rot).

#### 4.3. Fertige Reagenzien-Sets

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0 (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden); Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim); JETstar Plasmid Maxiprep Kit (Genomed, Bad Oeynhausen); QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit (Qiagen, Hilden); QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden); QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden); QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande); S.N.A.P. Gel Purification Kit (Invitrogen, Groningen, Nie-

derlande); TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande); TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande); TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

#### 4.4. Bakterienstämme

E. coli TOP10: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG* (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

E. coli TOP10F': F' *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG* (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

E. coli XL10-Gold: Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lac* Hte [F' *proAB* *lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]a (Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

E. coli DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup> F 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(*rk*<sup>-</sup>, *mk*<sup>+</sup>) *phoA* *supE44*  $\lambda$  *thi-1* *gyrA96* *relA1* (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein).

Alle verwendeten E. coli Bakterien sind modifizierte Abkömmlinge des defizienten, apathogenen Klonierungs-Stammes K12.

#### 4.5. Vektoren

pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

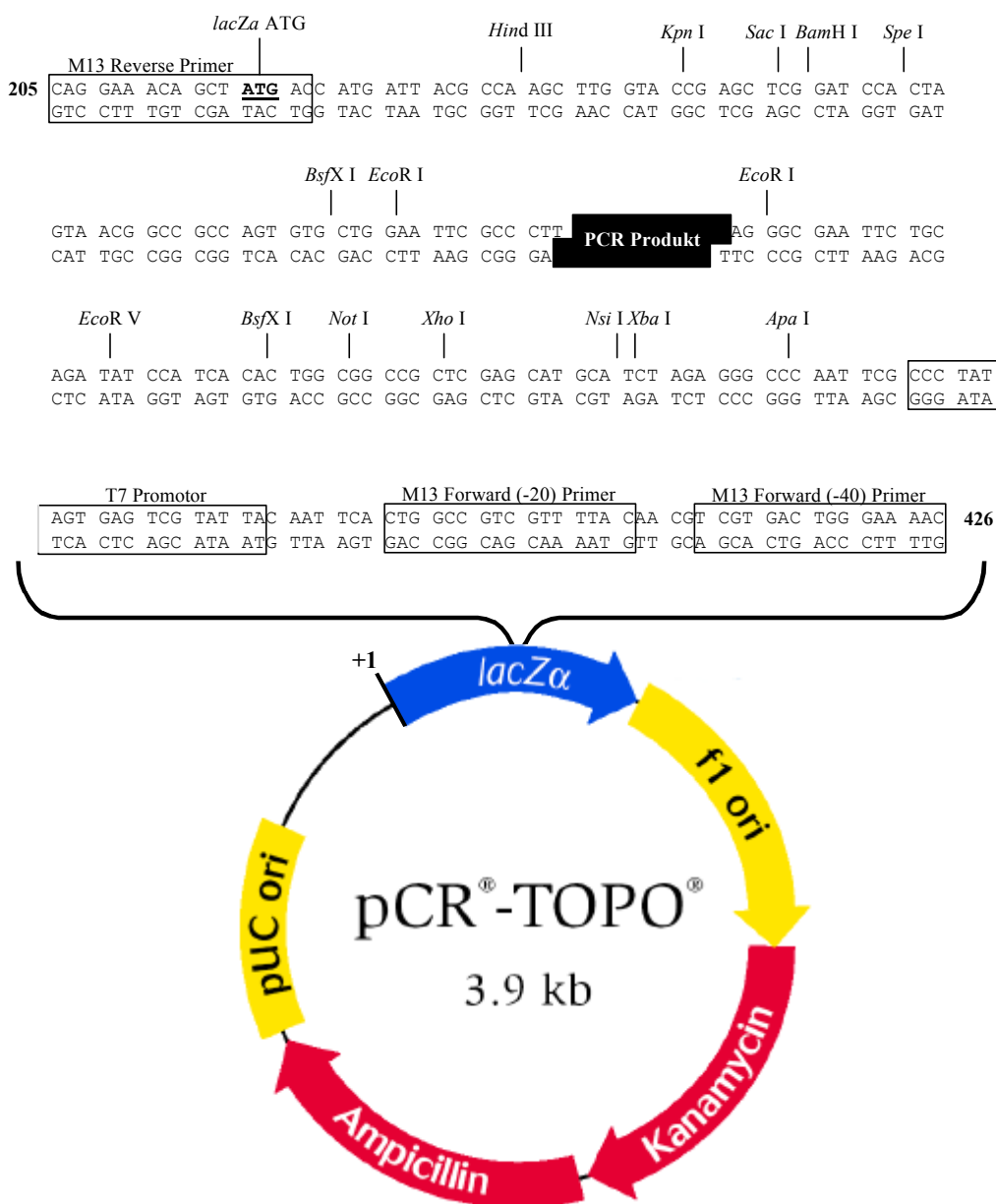
pCR 4-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

pCR-XL-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande)



pFK1 (Prof. R. Bartenschlager, Universität Heidelberg)

Die einzelnen TOPO-Vektoren sind Varianten des pBR322 Vektors und unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Restriktionsschnittstellen und eingebauten Primersequenzen. Der Grundsätzliche Aufbau ist in Abb. 4.1 dargestellt. Der pFK1 Vektor ist ebenfalls ein modifizierter pBR322 Vektor mit originären HCV 5'- und 3'-NTR-Enden (Abb. 4.2). Näheres zum pFK1 Vektor siehe 5.12.



**Abb. 4.1.** Karte des pCR-TOPO TA Vektors. Die einzelnen Vektoren (pCR 2.1, pCR4 und pCR XL) unterscheiden sich lediglich in den eingebauten Schnittstellen und Primersequenzen.

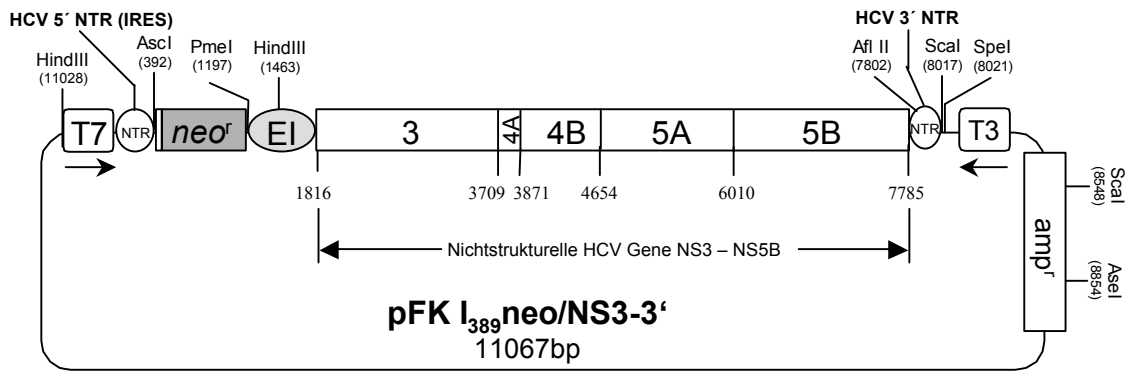


Abb. 4.2. Schematische Darstellung des pFK1 Vektors. Näheres siehe 5.12.

#### 4.6. Geräte

Autoklav CV-EL 18L (CertoClav, Traun, Österreich); DNA-Sequenzer ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Eisbad (Neolab, Heidelberg); Elektrophoresekammer Horizon 11 14 (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein); Elektrophorese-Spannungsgeber Consort E443 (Keutz, Reiskirchen) und Consort E835 (Keutz, Reiskirchen); Erlenmeyerkolben mit Schikanen 1000 ml (Nalgene Nunc, Wiesbaden); Film (Polaroid 667, Polaroid, St. Albans, England); Inkubationsschüttler TR-225 Novotron (Infors HT, Einsbach); Kamera (Fotodyne, Hartland, USA); Laminar-Abzug (Köttermann 8511, Köttermann, Uetze); Magnetrührer Ikamag Ret (IKA Labortechnik, Staufen); Mikrowelle (Bosch, Stuttgart); Nitril-Handschuhe (SafeSkin, Neolab, Heidelberg); Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen 50 ml (Polycarbonat, Nalgene Nunc, Wiesbaden); Petri-Schalen (BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg); Photospektrometer U-2000 (Hitachi, München); Sterilfilter-Pipettenspitzen (Aerosol-resistent, Nuklease-frei, steril, Molecular Bio-Products, San Diego, USA); Thermocycler GeneAmp PCR System 2400, GeneAmp PCR System 9700 und DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt); Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg); Transilluminator (Fluo-Link, Biometra, Göttingen); Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Schwabach); Waage (Sartorius Basic, Sartorius, Göttingen); Wärmeschrank (Biometra, Göttingen); Wasserheizbad (Precision, Winchester, USA); Zentrifugen: Mini-Zentrifuge (National Labnet Co., Woodbridge, USA), Biofuge

fresco (Heraeus / Kendro, Hanau), Mikro 22 R (Hettich, Bäch, Schweiz), RC 28 S SupraSpeed (Sorvall / Kendro, Hanau), Centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg) und Megafuge 2.0 (Heraeus / Kendro, Hanau).

#### 4.7. Lösungen

*PBS-Puffer:* 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O und 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in einem Liter Aqua bidestillata lösen und bei 4°C auf pH 7,4 einstellen (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein).

*TE-Puffer:* 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 8,0.

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

*TAE-Puffer* 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3 (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein).

*Ladungspuffer (loading buffer):* 2 g Bromphenolblau, 60 g Saccharose, 2 mmol EDTA und 36 g Harnstoff in 100 ml Aqua bidest. lösen und autoklavieren.

*Agarose-Gel für kurze Amplifikate:* 2 g Standard-Agarose in 100 ml TBE-Puffer einrühren und in der Mikrowelle aufkochen, bis eine klare Flüssigkeit entsteht. Dann 2µl Ethidiumbromid hinzufügen, die Lösung in einen Elektrophorese-Schlitten giessen und 15 Minuten bei Raumtemperatur erstarren lassen.

*Agarose-Gel für lange Amplifikate:* Wie für kurze Amplifikate, statt der Standard-Agarose wird jedoch 0,8 g NEEO-Agarose verwendet.

*Agarose-Gel zur Aufreinigung von langen Amplifikaten vor der Klonierung:* 0,8 g NEEO-Agarose in 100 ml TAE-Puffer einrühren und 3 Minuten lang in der Mikrowelle aufkochen. Die Flüssigkeit dann mit 60 µl Kristallviolett-Lösung (2 mg/ml) versetzen, in einen Ethidiumbromid-freien Elektrophorese-Schlitten giessen und 15 Minuten bei Raumtemperatur erstarren lassen.

*LB Broth Base:* 10 g Trypton (Casein-Hydrolysat), 5g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl in einem Liter Aqua bidest. lösen, mit NaOH auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.

*LB-Agar:* Wie LB Broth Base, jedoch wird vor dem Autoklavieren 14 g Agar hinzugefügt.

*NZY<sup>+</sup> Broth:* 10 g NZ Amine (Casein Hydrolysat), 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, 12,5 mmol MgCl<sub>2</sub> und 12,5 mmol MgSO<sub>4</sub> in einem Liter Aqua bidest. lösen, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen und autoklavieren. Anschliessend 20 ml einer 20-prozentigen sterilen Glucose-Lösung hinzufügen.

*SOC-Medium:* 20 g Trypton (Casein-Hydrolysat), 5 g Hefe Extrakt, 10 mmol NaCL, 2,5 mmol KCl, 10 mmol MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol MgSO<sub>4</sub> und 20 mmol Glucose in einem Liter Aqua bidest. lösen, mit NaOH auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren.

## 4.8. Oligonukleotide

### 4.8.1. Primer für PCR und Sequenzierung

Die Angabe aller Nukleotidsequenzen erfolgt in Leserichtung 5' → 3'. Die Positionsangaben des jeweiligen Startpunktes der Primer beziehen sich auf die vollständig veröffentlichte Sequenz des HCV 1b Prototypen HCV-J (49). Alle Nukleotide wurden synthetisiert von Biospring, Frankfurt am Main oder Humatrix AG, Frankfurt am Main.

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
1b-NS2/3-1s	gcg ggc cta cga gac ctt gc	3213 nach HCV-J
1b-NS2/3-1a	gtc ccg acc tgt gag gct ag	3463 nach HCV-J
1b-NS2/3-s2	cca ctg cgg gac tgg gcc c	3192 nach HCV-J
1b-NS2/3-a2	cgc cag gaa aga ttg tgt tgc	3513 nach HCV-J
1b-NS2/3-s3	gcg ctg aca ggt acg tac g	3156 nach HCV-J
1b-NS2/3-s4	ggg ctc att cgt gca tgc atg	3078 nach HCV-J
1b-NS2/3-a3	ccg gcc agg gtc ttc gag cc	3585 nach HCV-J
1b-NS2/3-a4	gtg tac att tgg gtg att gg	3615 nach HCV-J
NS-1b-s1	ctc act cca atc ccg gct gc	9192 nach HCV-J
NS-1b-a1	cag gat ggc cta ttg gcc	9383 nach HCV-J
1b-NS5B-s1	tgg gca gta agg acc aag c	9168 nach HCV-J
1b-NS5B-a1	atg gcc tat tgg cct gg	9379 nach HCV-J
1b-NS5B-a2	ggt tag ctc ccc gtt ca	9359 nach HCV-J
1b-NS5B-s2	tac ctc ttc aac tgg gca g	9156 nach HCV-J
1b-NS5B-s3	tgt ctc gtg ccc gac ccc g	9277 nach HCV-J
1b-NS5B-a3	atg gcc tat tgg cct gga gtg ggt agc tcc c	9366 nach HCV-J
1b-NS5B-s4	tgt ccc agg ggg gga ggg c	9121 nach HCV-J
8757-full1-s1	gac atg gag acc aag gtc atc acc tg	3261 nach HCV-J
8757-full1-s2	ggg cag aca ccg cgg cgt tgt ggg gac atc	3289 nach HCV-J

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Referenz</b>
8757-full-a1	tca tcg gtt ggg gag cag gta tac gcc tac ccc tac	9327 nach HCV-J
8422-full-s1	ccg aca tgg aga cca aag tca tca cc	3259 nach HCV-J
8422-full-s2	ggc aga cac cgc ggc gtg tgg gga cat c	3290 nach HCV-J
8422-full-a1	cgt tca tcg gtt ggg gag cag gta gat gcc tac	9333 nach HCV-J
8036-full-s1	gac atg gag acc aag atc atc acc tg	3261 nach HCV-J
8036-full-s2	gcg gcg tgt ggg gac atc atc ttg ggt c	3300 nach HCV-J
8036-full-a1	cat tca ccg gtt ggg gag cag gta gat gcc tac	9333 nach HCV-J
3423-full-s1	gac atg gag acc aag gtc atc acc tg	3261 nach HCV-J
3423-full-s2	ccg cgg cgt gtg ggg aca tca tct cgg gcc	3298 nach HCV-J
3423-full-a1	cat tca ccg gtt ggg gag cag gta gat gcc tac	9333 nach HCV-J
8469-full-s1	tct gac atg gag acc aag atc atc acc tg	3258 nach HCV-J
8469-full-s2	gcg gcg tgt ggg gac atc atc tcg ggc c	3300 nach HCV-J
8469-full-a1	cac tca tcg gtt ggg gag cag gta aag gcc tac	9333 nach HCV-J
1b-seq-s1	atc atc act agc ctc aca gg	3456 nach HCV-J
1b-seq-s2	gca cct gcg gca gct cgg acc	3697 nach HCV-J
1b-seq-s3	ccg gtc ttc aca gac aac tc	3951 nach HCV-J
1b-seq-s4	gca agt tcc ttg ccg acg gtg	4219 nach HCV-J
1b-seq-s5	ttc tat ggc aaa gcc atc c	4452 nach HCV-J

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Referenz</b>
1b-seq-s6	tgt gtc acc cag aca gtc g	4698 nach HCV-J
1b-seq-s7	gtt gcc cgt ctg cca gga cc	4970 nach HCV-J
1b-seq-s8	cca taa cca aat aca tca tgg	5248 nach HCV-J
1b-seq-s9	gga atg cag ctc gcc gag c	5490 nach HCV-J
1b-seq-s10	ctc ctg ttt aac atc ttg g	5748 nach HCV-J
1b-seq-s11	gtc ggg gtc gtg tgc gca gc	6009 nach HCV-J
1b-seq-s12	tgg gac tgg ata tgc acg g	6270 nach HCV-J
1b-seq-s13	atc aac gca tac acc acg g	6513 nach HCV-J
1b-seq-s14	ttc cag gtc ggg ctc aac c	6768 nach HCV-J
1b-seq-s15	tgg cgg cag gag atg ggc gg	7026 nach HCV-J
1b-seq-s16	cca ata cca cct cca cgg ag	7296 nach HCV-J
1b-seq-s17	gac ggg tct tgg tct acc g	7533 nach HCV-J
1b-seq-s18	gaa ggc gaa ggc gtc cac ag	7799 nach HCV-J
1b-seq-s19	cgc ctt atc gta ttc cca g	8058 nach HCV-J
1b-seq-s20	cag gcc ata agg tcg ctc ac	8337 nach HCV-J
1b-seq-s21	ttc acg gag gct atg act ag	8601 nach HCV-J
1b-seq-s22	ttc tct atc ctt cta gct c	8874 nach HCV-J
1b-seq-s23	tgg act gtc ttc cat ggc g	3564 nach HCV-J
1b-seq-s24	gca tca ctg atg gca ttc aca g	5691 nach HCV-J
1b-seq-s25	gaa tca act gtg tca tct gc	7338 nach HCV-J
1b-seq-s26	gtc tcc acc ctt cct cag gc	8121 nach HCV-J
1b-seq-s27	gcc tat tac tcc att gag c	8934 nach HCV-J
1b-seq-s28	gtt gcg aag gcg gtg gac ttt g	3894 nach HCV-J
1b-seq-s29	ttg ggc att ggc aca gtc ctg g	4308 nach HCV-J
1b-seq-a1	gct ctc agg cac ata gtg cg	6124 nach HCV-J
1b-seq-a2	cgc gaa gcg aac gct atc agc cg	6081 nach HCV-J
hcv-full-s1	gca gaa agc gtc tag cca tg	56 nach HCV-J
hcv-full-s2	tac tgc ctg ata ggg tgc t	75 nach HCV-J

#### 4.8.2. Primer für die Mutagenese

Die Angabe aller Nukleotidsequenzen erfolgt in Leserichtung 5' → 3'. Die Positionsangaben der gewünschten Mutationen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des Konsensusklons, die Bezeichnungen der Aminosäuren erfolgen gemäss dem internationalen Einbuchstaben-Code. Alle Nukleotide wurden synthetisiert von Biospring, Frankfurt am Main.

8422-mut-s1: ggc gaa atg ccc tcc act gag gac ctg gtc aac tta ctc

8422-mut-a1: gag taa gtt gac cag gtc ctc agt gga ggg cat ttc gcc

39mer, 22g/c, T<sub>m</sub> 84°C, AS1876, E ersetzt G

8422-mut-s2: c cac tac gtg acg ggc atg act act gac aac ata aaa tgc

8422-mut-a2: gca ttt tat gtt gtc agt agt cat gcc cgt cac gta gtg g

40mer, 19g/c, T<sub>m</sub> 81°C, AS2105, M ersetzt T

8422-mut-s3: ctc ctg tgg cgg cag gag atg ggc gga aac atc

8422-mut-a3: gat gtt tcc gcc cat ctc ctg ccg cca cag gag

33mer, 21g/c, T<sub>m</sub> 84°C, AS2236, E ersetzt G

8422-mut-s4: cat tac cgg gac gtg ctc aag gag atg aag gcg

8422-mut-a4: cgc ctt cat ctc ctt gag cac gtc ccg gta atg

33mer, 19g/c, T<sub>m</sub> 82°C, AS2487, L ersetzt P

8422-mut-s5: c tgt ttt gac tca aca gtc acc gag aac gac atc c

8422-mut-a5: g gat gtc gtt ctc ggt gac tgt tga gtc aaa aca g

35mer, 17g/c, T<sub>m</sub> 79°C, AS2647, V ersetzt A

8422-mut-s6: g ata aca tca tgc tcc tcc aat gtg tcg gtc gcg cac

8422-mut-a6: gtg cgc gac cga cac att gga gga gca tga tgt tat c

37mer, 20g/c, T<sub>m</sub> 84°C, AS2788, N ersetzt S



8422-mut-s7: ctc cta ctt tct gta ggg gta ggc atc tac ctg ctc

8422-mut-a7: gag cag gta gat gcc tac ccc tac aga aag tag gag

36mer, 19g/c,  $T_m$  81°C, AS3001, G ersetzt E

8422-mut-s8: ggc tcc tca tac gga ttc caa tac tct cct gga cag cgg

8422-mut-a8: ccg ctg tcc agg aga gta ttg gaa tcc gta tga gga gcc

39mer, 23g/c,  $T_m$  85°C, AS2613, Q nicht verändert (auf Nukleotidebene ScaI-Site eliminiert)

8422-mut-s9: ca tac gga ttc caa tac tct cct gga cag cgg gtc gag

ttc ctg gtg aac gcc tgg aag tca aag aag aac cct atg

ggc ttc gca tat gac acc cgc tgt ttt gac tca aca gtc

acc gag aac

8422-mut-a9: gtt ctc ggt gac tgt tga gtc aaa aca gcg ggt gtc ata

tgc gaa gcc cat agg gtt ctt ctt tga ctt cca ggc gtt

cac cag gaa ctc gac ccg ctg tcc agg aga gta ttg gaa

tcc gta tg

125mer, 23g/c,  $T_m$  85°C, AS2613: Q nicht verändert (auf Nukleotidebene ScaI-Site eliminiert) und AS2647: V ersetzt A (Mut5)

## 5. **METHODEN**

### 5.1. **HCV-RNA-Extraktion aus Patientenserum**

#### 5.1.1. *Prinzip*

Um Hepatitis C Viren näher untersuchen zu können, müssen diese zunächst aus Körpermaterial von Patienten mit chronischer Hepatitis C gewonnen werden. Als Ausgangsmaterial wurde dazu Patientenserum verwandt, welches in den meisten Fällen eine ausreichende Viruskonzentration enthält. Nach der Blutentnahme wird innerhalb von zwei Stunden das Serum per Zentrifugation gewonnen und bei minus 80°C asserviert, da es bei Lagerung unter Raumtemperatur zu einer raschen Degradation der Hepatitis C Viren kommt.

Für genomische Untersuchungen an Hepatitis C Viren wird die reine Erbinformation benötigt, die beim HCV als Einzelstrang-RNA (single-stranded, ss-RNA) vorliegt. Da sie in der Hülle und dem Kapsid des Virus eingeschlossen ist, müssen diese erst entfernt werden, bevor die RNA frei vorliegt und weiter extrahiert werden kann. Hierzu bedient man sich Detergenzien, die die lipidhaltige Hülle des Virus zerstören. Durch den Wegfall der Hülle wird auch das Kapsid instabil und die Erbinformation tritt aus.

Bei der eigentlichen Extraktion der RNA aus dem Serum macht man sich deren chemische Eigenschaften zu Nutze. Das mit der detergenzienhaltigen Lösung versetzte Serum wird durch eine Filtermembran gepresst, die durch ionische Wechselwirkungen die RNA im alkalischen Milieu, in dem sie vorwiegend als Polyanion auftritt, bindet, während andere Nukleinsäuren und Proteine den Filter passieren können. Die RNA kann dann mit einer sauren Lösung wieder eluiert werden.

### 5.1.2. Durchführung

Zur Virus-RNA-Extraktion wurde das QIAamp Viral RNA Mini Spin Kit (Qiagen, Hilden) verwandt. Der detergenzienhaltige AVL-Puffer zur Zerstörung der Virus-Hülle wurde zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Hierbei war darauf zu achten, dass sich durch die Lagerung bei 4°C kein Niederschlag im zu verwendenden Puffer gebildet hatte. Bei Bedarf wurde die Lösung im Ofen auf bis zu 80°C erhitzt, um ausgefallene Salze wieder in Lösung zu bringen. Vor Benutzung musste der Puffer jedoch wieder auf Raumtemperatur abgekühlt werden.

100 µl Patientenserum wurden nun mit 400 µl klarem Detergenz-Puffer (AVL) versetzt und durch vortexen gut durchmischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl Ethanol hinzugefügt und erneut gevortext. Die Zugabe von Alkohol führte zur Denaturierung und dadurch zum Ausfällen der freigesetzten Nukleinsäuren, so dass diese bei der Zentrifugation von der Membran zurückgehalten werden konnte. Von dieser Lösung wurden 650 µl auf eine Extraktions-Säule gegeben und bei 8000 Umdrehungen pro Minute (upm) eine Minute lang zentrifugiert. Die durch die Filtermembran gepresste Flüssigkeit wurde verworfen. Dann wurde der Rest der Serum-Lösung ebenfalls auf die Säule gegeben und bei 8000 upm eine Minute lang zentrifugiert. Auch diese Flüssigkeit wurde danach verworfen. Um die jetzt in der Membran befindliche RNA wieder in Lösung zu bringen, musste der Alkohol zunächst wieder entfernt werden. Dazu wurde der Filter gewaschen, indem die Säule ein weiteres Mal wie oben zentrifugiert wurde, dieses Mal mit 500 µl der Waschlösung AW1. Nun wurden 500 µl der Waschlösung AW2 auf die Säule gegeben, jetzt wurde jedoch mit 13000 upm für 3 Minuten zentrifugiert, um jeden Rest von Flüssigkeit aus der Membran zu pressen.

Zum Eluieren der RNA wurden dann 50 µl AVE-Puffer auf die Mitte der Membran geträufelt, ohne diese dabei zu berühren, und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die gelöste RNA wurde dann durch einen letzten Zentrifugationsschritt (8000 upm, 1 min, Raumtemperatur) aus der Membran in ein steriles Eppendorff-Cup eluiert.

## **5.2. Reverse Transkription (RT) und Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)**

### *5.2.1. Prinzip der Reversen Transkription*

Da das HCV-Genom als ss-RNA vorliegt, muss es zuerst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, um eine Vervielfältigung mittels PCR zu ermöglichen. Dazu wird die RNA zunächst mit einer Reversen Transkriptase in cDNA übersetzt und anschliessend die PCR durchgeführt (RT-PCR). Zur Optimierung der Ausbeute benutzt man hierzu eine Reverse Transkriptase ohne RNase H-Aktivität (RNase H<sup>-</sup>). RNase H ist eine Endonuklease, die spezifisch die Phosphodiester-Bindungen von RNA hydrolysiert, welche an DNA hybridisiert ist. Dies würde zu einem Abbau der RNA führen, sobald ein cDNA-Strang erstellt wurde. Dieser nun einzelne DNA-Strang kann wiederum mit einer noch nicht transkribierten RNA hybridisieren, woraufhin diese ebenfalls abgebaut werden würde. Dadurch würde die Effizienz der RT-Reaktion erheblich sinken.

Es gibt zwei Varianten der RT-PCR:

#### 1. Ein-Schritt-Technik

Es werden alle nötigen Ingredienzien sowohl für die RT-Reaktion als auch die PCR in einem Ansatz gemischt. Nach Ablauf der reversen Transkription kann direkt mit der PCR begonnen werden.

#### 2. Zwei-Schritt-Technik

Es wird zunächst eine RT-Reaktion durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Produkt in einen neuen PCR-Ansatz überführt und dann mit der PCR begonnen.

Vorteil der ersten Technik ist, dass der Ansatz nicht mehr geöffnet werden muss und sich daher die Kontaminationsrate verringern lässt. Nachteil ist, dass aus dem selben RT-Ansatz nicht mehrere unterschiedliche PCR angefertigt werden können. Ausserdem verbleibt kein Rest für eventuelle spätere Kontrollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschliesslich die Zwei-Schritt-Methode angewandt.

### 5.2.2. Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um Nukleinsäuren zu vervielfältigen. Dazu benutzt man eine thermostabile Polymerase, die aus thermophilen Bakterien (z.B. *Thermus aquaticus*, *Taq*) gewonnen wird. Das Prinzip einer jeden Polymerase besteht darin, dass sie nach vorheriger Strangtrennung (*in vivo* durch die Enzyme Helicase und Topoisomerase I, *in vitro* durch Denaturierung mittels Erwärmung) an einem Einzelstrang entlangfährt und jeder Base ihr entsprechendes Pendant gegenüberstellt. Anschliessend werden diese dann verknüpft. Dadurch entsteht ein komplementärer Strang und aus den beiden Einzelsträngen werden zwei identische Doppelstränge. Die für die Denaturierung benötigte Temperatur bezeichnet man als Schmelztemperatur, welche üblicherweise 94°C - 98°C beträgt. Kühlt man die denaturierte DNA sehr schnell wieder ab, so haben die langen DNA-Stücke keine Zeit, sich wieder zusammenzulagern und bleiben als Einzelstränge bestehen. Die Polymerase arbeitet in 5' → 3' Richtung und benötigt als Startpunkt ein freies 3'OH<sup>-</sup>-Ende, an dem sie anknüpfen kann. Daher müssen synthetisch hergestellte Oligonukleotide („Primer“) hinzugegeben werden, die jeweils zu den 3'-Flanken des zu amplifizierenden Bereiches komplementär sind. Diese Primer lagern sich bei einer Temperatur knapp unterhalb ihres eigenen Schmelzpunktes spezifisch an die entsprechenden Regionen an (Hybridisierungstemperatur), wobei gilt: je näher die Hybridisierungstemperatur der Schmelztemperatur des Primer ist, desto spezifischer ist die Bindung, je weiter die Temperatur darunter liegt, umso stabiler wird die Bindung, doch nehmen gleichzeitig auch unspezifische Bindungen zu. Übliche Hybridisierungstemperaturen liegen etwa bei 50°C - 60°C, jedoch sind für spezielle Anforderungen erhebliche Abweichungen möglich. Mit der Anlagerung des Primers lagert sich auch die Polymerase an das 3'OH<sup>-</sup>-Primerende an. Nun wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der Polymerase gebracht (typischerweise um 70°C), worauf die Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Anschliessend wird der Reaktionszyklus aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Extension wiederholt, wobei sich jedes Mal die Menge der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte verdoppelt. Es ergibt sich also insgesamt eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz ab dem dritten Zyklus, während DNA-Abschnitte, welche nicht von Primern eingerahmt werden, nur eine lineare Amplifikation erfahren (Abb. 5.1).

Thermostabile DNA-Polymerasen haben zwar ihr Temperaturoptimum bei Temperaturen um 70°C, doch sind sie auch bereits bei niedrigeren Temperaturen aktiv. Im suboptimalen Temperaturbereich ist jedoch die Spezifität sehr gering, was dazu führen kann, dass bereits beim Mischen des Reaktionsansatzes unspezifische Polymerisationen synthetisiert werden. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, gibt es mehrere Möglichkeiten, die drei häufigsten sollen hier kurz vorgestellt werden:

1. Hot-Start-Technik

Ein Polymerase-freier PCR-Ansatz wird auf Denaturierungstemperatur erhitzt. Erst nach Erreichen der Temperatur wird die Polymerase hinzugefügt.

2. Paraffin-Beans-Technik

Auf einen Polymerase-freien PCR-Ansatz wird eine kleine Perle aus Paraffin gelegt, in welcher die Polymerase eingeschlossen ist. Bei Erhitzung schmilzt das Paraffin und gibt die Polymerase frei.

3. Touch-down-Technik

Hier wird eine durch gebundene Antikörper inaktivierte Polymerase benutzt. Bei Erhitzung trennen sich die Antikörper von der Polymerase, die dadurch aktiv wird. Neuere Touch-down-Polymerasen liegen durch gezielte Veränderungen ihrer Tertiärstruktur in einer inaktiven Form vor, die sich bei Erhitzung entfaltet und das Reaktionszentrum freigibt. Dadurch kann auf Antikörper verzichtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine modifizierte Hot-Start-Technik sowie die Touch-down-Technik benutzt.

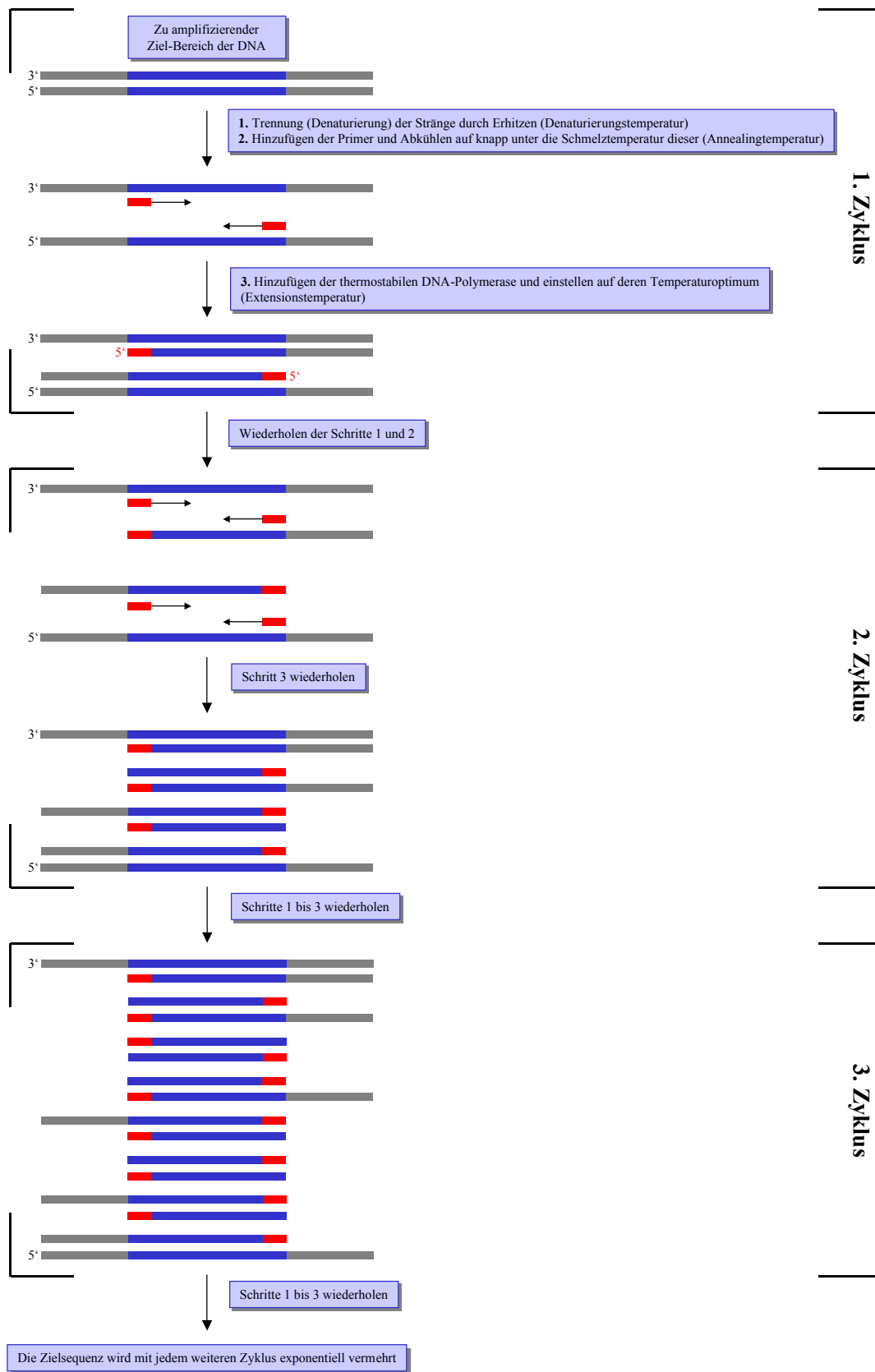


Abb. 5.1. Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die einzelnen Polymerasen an sich unterscheiden sich wiederum in bestimmten Eigenschaften, so dass die Auswahl der verwandten Polymerase von der Art der PCR und speziellen Fragestellungen abhängig gemacht werden muss. Solche Eigenschaften sind zum Beispiel Geschwindigkeit der Extension, Transferase-Aktivität und Endo- bzw. Exonukleaseaktivitäten. Die am meisten verwandte *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) etwa besitzt eine Zielsequenz-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die nach jeder Extension ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR Produktes anhängt (A-Überhang). Dies hat bei den üblichen Standard-PCR keine besonderen Auswirkungen, kann jedoch bei Klonierungen bzw. Ligationen von besonderer Wichtigkeit sein. Polymerasen mit Endonuklease-Aktivität nennt man Proofreading-Polymerasen. Sie erkennen bei der Extension falsch eingebaute Basen und können diese wieder ausschneiden und den Fehler korrigieren. Dadurch sinkt die Fehlerquote erheblich, gleichzeitig arbeiten sie aber auch langsamer, erzeugen keine Überhänge (daher nennt man sie auch Blunt-End Polymerasen) und die maximal an einem Stück amplifizierbare Anzahl Basen ist deutlich geringer. Ein Beispiel hierfür wäre die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) und die sehr ähnliche *Pwo*-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*), die mit jeweils einer durchschnittlichen Fehlerrate von 1,3 fehlerhaft eingebauten Basen pro einer Million zu den am genauesten arbeitenden Polymerasen gehören. Im Vergleich dazu kommt die häufig verwendete nicht-proofreading-Polymerase *Taq* auf eine in etwa zehnmal höhere Fehlerrate (25). Oft werden auch Gemische aus verschiedenen Polymerasen benutzt, um die Eigenschaften zu kombinieren.

Um bei sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial trotzdem eine hohe und gleichzeitig spezifische Amplifikation des gewünschten Abschnittes zu erzielen, kann eine verschachtelte („nested“) oder halb verschachtelte („semi-nested“) PCR durchgeführt werden. Hierzu werden in einer ersten PCR Primer benutzt, die etwas weiter ausserhalb des zu amplifizierenden Abschnittes liegen. Mit dem Produkt dieser Reaktion wird dann eine weitere PCR angefertigt, deren Primer innerhalb des zuvor amplifizierten Teilstückes, aber immer noch flankierend zum gewünschten Abschnitt liegen. In dieser Arbeit wurden alle Varianten eingesetzt.



### 5.2.3. Durchführung

#### 5.2.3.1. RT-PCR für kurze DNA-Abschnitte

Grundsätzlich benötigt man zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion folgende Ingredienzien:

- Die zu amplifizierende cDNA (nach RT-Reaktion als RNA/DNA Hybrid)
- Sense- und antisense Primer
- DNA-Polymerase
- Desoxyribonukleotriphosphate (dNTP)
- Eine Pufferlösung, in der die Reaktion optimal ablaufen kann

Dieser Grundansatz kann dann je nach Anforderung noch modifiziert werden, z.B. durch Zugabe von DMSO zur besseren Entfaltung der DNA-Stränge. Ausserdem benötigen manche Polymerasen bestimmte Zusätze wie  $MgCl_2$  zur Erlangung ihrer maximalen Aktivität. Die zur PCR benutzte *AmpliTaq* Gold DNA-Polymerase ist eine Touch-down-Polymerase, so dass kein Hot Start nötig ist (75).

Die für die PCR benötigte DNA wird aus dem extrahierten Virusgenom mittels reverser Transkription in Form von RNA/DNA Hybriden gewonnen. Ein typischer RT-Ansatz benötigt

- Die zu transkribierende RNA
- Zufällige hexamere Nukleotide („random hexamers“) oder spezifische Oligonukleotide als Primer
- Reverse Transkriptase
- Desoxyribonukleotriphosphatnukleotide (dNTP)
- RNase Inhibitor
- Eine Pufferlösung, in der die Reaktion optimal ablaufen kann

Aufgrund ubiquitär vorhandener RNAsen wird dem Ansatz immer ein RNase Inhibitor zugesetzt, da sonst geringste Kontaminationen bereits zu einem Abbau der RNA führen können. Die Verwendung von zufälligen hexameren Nukleotiden als Primern ist nötig, da der Ansatz aufgrund der Hitzeinstabilität der Reversen Transkriptase nicht auf die Hybridisierungstemperatur spezifischer Primer erhitzt werden kann. Durch die zufälligen Hexamere entstehen DNA-Stücke von zufälliger Länge und Startsequenz. In einem geringen Prozentsatz wird jedoch immer der gewünschte Abschnitt enthalten sein, der sich dann anschliessend mittels PCR amplifizieren lässt. Theoretisch lassen sich natürlich auch spezifische Primer einsetzen, doch ohne die Erhitzung geht der Vorteil der spezifischen Primer durch gehäufte unspezifische Bindungen nahezu vollständig verloren. Um dieses Problem zu umgehen und die Effizienz und Spezifität zu erhöhen, kann in einem ersten Schritt nur die RNA alleine mit einem spezifischen Primer im Puffer gelöst und für 10 Minuten erhitzt werden, um eine Entfaltung der Nukleinsäure und die Anlagerung des Primers zu ermöglichen. Anschliessend wird dieser Ansatz schnell wieder abgekühlt, und die übrigen Reagenzien können hinzugefügt werden.

Ein konkretes Beispiel einer nested-RT-PCR sieht folgendermassen aus:

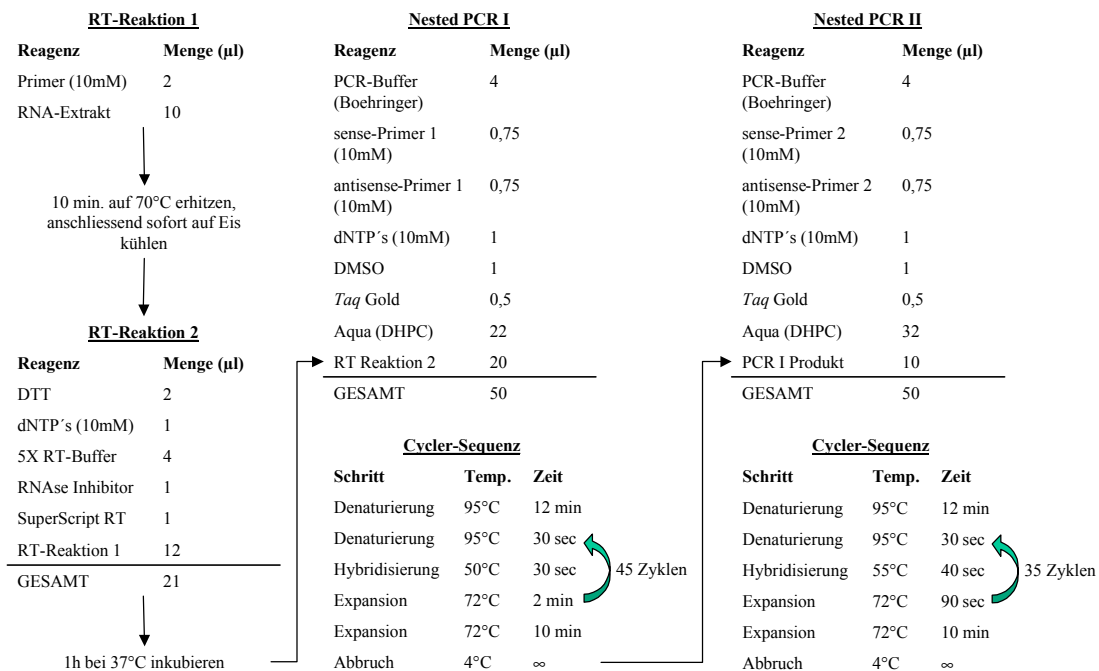


Abb. 5.2. Beispiel eines nested-RT-PCR Protokolls.

Anschliessend kann das PCR-Produkt aufgereinigt (siehe 5.3) und weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

#### 5.2.3.2. Lange RT-PCR (> 6000 Basenpaare)

Die Amplifikationen besonders langer DNA-Stücke wurden mit dem Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim) durchgeführt. 1996 wurde von Tellier et al. bereits eine Methode zur Amplifikation langer viraler Nukleinsäuren beschrieben (107), welche als Grundlage für diese Arbeit herangezogen wurde. Trotzdem musste praktisch eine eigene Methode entwickelt werden, da für das Expand Long Template PCR System bisher keine Anwendung mit sehr langen HCV-Genomstücken beschrieben worden war. In diesem Längenbereich der Amplifikate können geringste Variationen der Konzentrationen der Einzelsubstanzen bereits signifikante Unterschiede im Ergebnis verursachen. Daher musste das Protokoll für jede PCR individuell angepasst werden. Da die benutzten *Pwo* und *Taq* Polymerasen keine Touch-down-Eigenschaften besitzen, wurden zunächst Nukleinsäure-freie Master-Mixe auf Eis pipettiert, die alle Reagenzien ausser den Nukleinsäuren und den Nukleotiden enthielten. Primer, DNA und dNTP wurden erst direkt vor Beginn der Thermozyklen hinzugefügt (modifizierter Hot-Start). Durch die Nutzung moderner Thermocycler war kein echter Hot-Start nötig, da die Denaturierungstemperatur binnen weniger Sekunden erreicht wurde. Die Hybridisierungstemperatur wurde ca. ein Grad Celsius unter der niedrigeren der errechneten Schmelztemperaturen beider Primer gewählt. Die Dauer der Denaturierung wurde wegen der bei langen Molekülen erhöhten Gefahr für Strangbrüche möglichst kurz gehalten.

Auch die Dauer der Expansionszyklen musste der Länge der Amplifikates angepasst werden. Die hier verwandten DNA-Polymerasen synthetisieren im Schnitt ca. 1000 Basenpaare in der Minute, so dass als Ausgangswert 6 Minuten gewählt wurden. In den ersten zehn Zyklen blieb diese Zeit konstant, danach wurde für weitere zwanzig Zyklen die Expansionszeit um jeweils 20 Sekunden je Zyklus verlängert, um auch bei zunehmender Menge der zu amplifizierenden Moleküle sowie abnehmender Aktivität der Polymerasen und Menge der dNTP einen vorzeitigen Kettenabbruch zu vermeiden.

Aufgrund der geringen Ausbeute wurden die Lang-PCR ausschliesslich in der nested-Technik durchgeführt (Abb. 5.3).

RT-PCR für HCV-1b NS-full-length (ca. 6500bp)		Expand Reverse Transcriptase und Expand Long Template PCR System (alle Reagenzien vor Verwendung vortexen, Master Mix jeweils auf Eis pipettieren)	
Datum: 8. Februar 2003		PCR-I	
RT		PCR-II	
RT-1	n= 4	n= 5	n= 5
HCV-RNA (30µl Extr.)	3µl RNA variabel (1µg)	9	45,0
1b-NS5B-a3	2 8,0 1µM=20µmol	5	25,0
aqua RNase frei	0 0,0	1,5	7,5
Volumen RT-1	5	1,5	7,5
Im Cycler 65°C / 10min Anschließend direkt auf Eis		Volumen MM-1 (Eis) 17	
RT-2		Zu MM-1 jeweils RT-2 dazugeben	
aqua RNase frei	4 16,0	8	variabel
5x Expand RT Puffer	4 16,0	RT-2 (cDNA)	
100mM DTT	2 8,0	Master Mix 2	
20mM Na-dNTP	4 16,0	aqua RNase frei	16,75
RNase Inh. 40U/µl	0,5 2,0	10x Expand PCR buffer 3 (warm)	5
Expand RT 50U/µl	1 4,0	MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5
Volumen RT-2	15,5	DMSO	1
Gesamtvolumen	20,5	Expand enzyme mix 3,5U/µl	0,75
Mix RT-2 zu RT-1 geben (vorher vortexen und gut vermischen) 42°C / 60min		Volumen MM-2 (Eis) 25	
Anschließend direkt auf Eis		Gesamtvolumen 50,0	
Schmelztemperaturen der Primer		Master Mix 1 + RT-2 und Master Mix 2 vortexen und erst kurz vor dem Cycler zusammengenommen und gut mischen	
8036-full-s1	54°C	Cycler	
8036-full-s2	62°C	94°C 2min	94°C 2min
8036-full-a1	63°C	94°C 10sec	94°C 10sec
8757-full-s1	56°C	53°C 30sec	61°C 30sec
8757-full-s2	66°C	68°C 6min	68°C 6min
8757-full-a1	65°C	94°C 10sec	94°C 10sec
8422-full-s1	56°C	53°C 30sec	61°C 30sec
8422-full-s2	65°C	68°C 6min+je 20s	68°C 6min+je 20 sec
8423-full-s1	56°C	68°C 7min	68°C 7min
8423-full-s2	67°C	4°C unendlich	4°C unendlich
3423-full-a1	63°C	5µl PCR-II auf 0,8% Agarose (Neo-Agarose) Gel auftragen (1:40h, 90V) 4µl Standard MBI-Fermentas lambda-hind-III	

Abb. 5.3. Beispiel eines Lang-PCR Protokolls

### 5.3. *Aufreinigung von PCR-Produkten*

#### 5.3.1. *Prinzip*

Nach abgelaufener Polymerase-Kettenreaktion muss das Produkt aufgereinigt werden. Hierbei soll das Amplifikat von Resten des Reaktionsgemisches, allem voran kurze Nucleinsäuren wie Primer, dNTP und unspezifische Oligomere, getrennt werden. Hierzu gibt es wieder verschiedene Möglichkeiten:

##### 1. Ethanol-Fällung

Durch Versetzen mit Ethanol denaturieren lange Nucleinsäuremoleküle und fallen aus, während kurze (< 50 bp) in Lösung verbleiben. Durch wiederholtes Zentrifugieren, Abpipettieren des Überstandes und Resuspendieren des Pellets werden kurze DNA-Fragmente und einzelne Nucleotide entfernt.

##### 2. Membranfiltration

Bei dieser Technik wird, ähnlich zur RNA-Isolierung aus Serum (siehe 5.1), das PCR-Produkt durch eine Membran filtriert, die aufgrund der polyanionischen Eigenschaften der Nucleinsäuren Stücke ab einer bestimmten Grösse reversibel bindet, während kürzere Stücke und andere Moleküle die Membran passieren. Anschliessend kann die gereinigte DNA mit geeigneten Pufferlösungen wieder eluiert werden. Die Grenzlänge, die zwischen Passage und Bindung in der Membran entscheidet, ist abhängig von der verwandten Membran und dem Puffersystem.

##### 3. Gelsäulenfiltration

Diese Methode beruht auf einer speziellen Gel-Matrix, durch die die aufzureinigende Lösung hindurchläuft. Der Unterschied zur Membran liegt darin, dass kurze Moleküle im Gel gebunden werden, während die langen DNA-Stücke das Gel passieren (in der Membran funktioniert dies genau andersherum). Dadurch sind Wasch- und Eluierungsschritte überflüssig, da das erste Eluat direkt dem aufgereinigten Produkt entspricht.

#### 4. Elektrophoretische Trennung

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten kommt auch die elektrophoretische Aufreinigung in Frage. Nach elektrophoretischer Trennung (Prinzip und Durchführung siehe 5.4) der langen DNA-Stücke von den kurzen (Primer, unspezifische Oligomere und Nukleotide) kann die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel herausgelöst werden.

#### 5.3.2. Durchführung

##### 1. Ethanol-Fällung

Die Ethanol-Fällung von PCR-Produkten wurde ausschliesslich bei Sequenz-PCR Produkten (siehe 5.5) angewandt. Es wurde die gesamte Menge PCR-Produkt (üblicherweise 20 µl) mit 58 µl HPLC-Wasser sowie 122 µl Ethanol 100 % versetzt zu einer Gesamt-Ethanol-Konzentration von 60 %. Nach vortexen wurde das Gemisch 15 Minuten inkubiert und anschliessend weitere 15 Minuten bei 13000 upm zentrifugiert (Centrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde abgehoben und verworfen, das Pellet mit 250 µl Ethanol 70 % resuspendiert und ein weiteres Mal bei 13000 upm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Zur Entfernung von verbliebenem Alkohol wurde das Pellet nun für 3 Minuten bei 95°C getrocknet. Nach anschliessender Resuspendierung in 18 µl TSR-Puffer oder 18 µl HPLC-Wasser konnte nun direkt mit der Sequenzierung begonnen werden. Bei 4°C und Lichtschutz konnte das so aufgereinigte Sequenz-PCR Produkt auch mehrere Tage gelagert werden.

##### 2. Membranfiltration

Diese Methode wurde für normale PCR-Produkte angewandt. Zur Filtration normaler PCR-Produkte wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwandt. Zunächst wurde das PCR-Produkt mit der fünffachen Menge an PB-Puffer versetzt und per Vortexer gut gemischt. Dieses Gemisch wurde dann auf eine Säule aufgetragen und bei 13000 upm eine Minute lang (wie alle Zentrifugationsschritte bei dieser Methode) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Anschliessend wurde die Säulenmembran durch Auftragen von 750 µl PE-Puffer und nochmaliges Zentrifugieren gewaschen.

Auch dieses Eluat wurde verworfen und die leere Säule ein weiteres Mal zentrifugiert, um jeglichen Rest des alkoholhaltigen PE-Puffers aus der Membran zu entfernen. Diese Leerzentrifugation ist nötig, da beim ersten Waschen durch die alkoholische Dampfphase über dem Eluat ein vollständiges Entfernen des Alkohols aus der Membran verhindert wird. Nun wird die Säule auf ein frisches Cup aufgesetzt und die in der Membran gebundene DNA durch 50 µl EB-Puffer oder RNase-freies Wasser in einem letzten Zentrifugationsschritt eluiert.

### 3. Gelsäulenfiltration

Bei Sequenz-PCR Produkten kam diese Methode bevorzugt zur Anwendung, da sie gegenüber der Ethanol-Fällung viel weniger Zeit beansprucht bei besseren Ergebnissen. Es wurde hierzu das DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Nach Homogenisierung des Gels durch vortexen wurde zunächst die überschüssige Flüssigkeit bei 2700 upm (entsprechend 750 g) drei Minuten lang abzentrifugiert. Anschliessend wurde das Sequenz-PCR Produkt vorsichtig auf das Gel pipettiert, ohne dessen Oberfläche zu berühren und die Säule ein weiteres Mal bei 750 g für drei Minuten zentrifugiert. Das Eluat konnte dann direkt zur Sequenzierung benutzt oder bei 4°C und Lichtschutz mehrere Tage aufbewahrt werden.

### 4. Elektrophoretische Trennung

Diese Methode wurde benutzt, um Lang-PCR Produkte für die Klonierung (siehe 5.6) aufzureinigen. Nach erfolgter Elektrophorese unter Verwendung von Methylenblau und TAE-Puffer (siehe 5.4) wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des S.N.A.P. Gel Purification Kits (Invitrogen, Groningen, Niederlande) aus dem Gel herausgelöst. Hierzu wurde das ausgeschnittene Stückchen Gel zerkleinert, mit 250 µl 6,6 M Natriumjodid-Lösung versetzt und durch vortexen kräftig durchmischt. Das ganze wurde dann ca. 5 Minuten lang unter intermittierendem Mischen bei 50°C inkubiert, bis das gesamte Gel geschmolzen war. Anschliessend wurden 525 µl Bindungspuffer hinzugegeben, gemischt, und die gesamte Lösung auf eine S.N.A.P.-Membransäule aufgetragen. Die Säule wurde nun dreimal 30 Sekunden lang bei 3000 g zentrifugiert, wobei jeweils das Eluat zurück auf die Säule gegeben wurde, um eine optimale Ausbeute zu erzielen. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Eluat verworfen

und die Säule mit 400 µl Final Wash bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 27000 g) für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde abermals verworfen. Nun wurden 40 µl HPLC-Wasser auf die Säulenmembran gegeben und eine Minute inkubiert. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute lang in ein frisches Cup eluiert.

## 5.4. Elektrophorese

### 5.4.1. Prinzip

Die meisten Biopolymere wie Proteine als Polyampholyte und Nukleinsäuren als (Poly)Säuren sind geladen und wandern daher in einem elektrischen Feld. Bei einer Elektrophorese werden geladene Moleküle unter dem Einfluss eines elektrischen Potentialgradienten transportiert. Infolge der an den geladenen Teilchen oder Molekülen angreifenden elektrischen Kraft  $\vec{F}$

$$\vec{F} = ze\vec{E}$$

*z*, Zahl der Einheitsladungen *e* und  $\vec{E}$ , elektrische Feldstärke

erfährt das Teilchen eine Beschleunigung. Die Molekül-Geschwindigkeit steigt so lange, bis die dadurch ebenfalls grösser werdende Reibungskraft des Moleküls in der Gelmatrix genauso gross geworden ist wie die antreibende elektrische Kraft *F*.

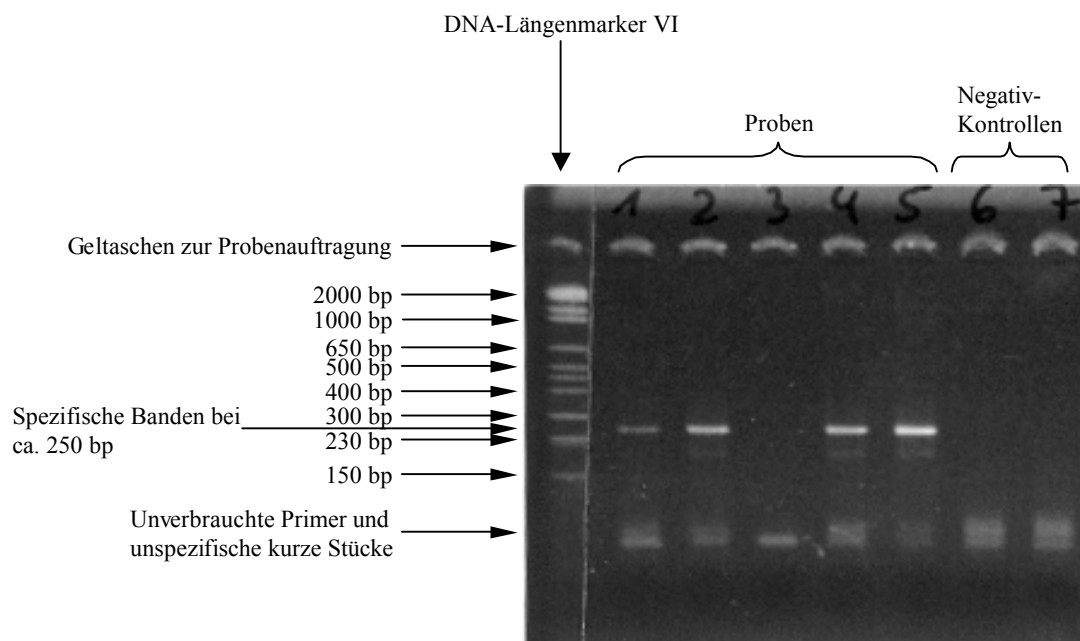
Zum Beladen der Gele wurden die PCR-Produkte in einem Loading Buffer gelöst. Dieser erfüllt zwei Aufgaben: Erstens wird durch einen hohen Glycerin-Anteil eine hyperbare Lösung geschaffen, die ein Absinken der Probe in die Geltaschen gewährleistet und so ein Abdiffundieren in den umgebenden Puffer verhindert. Zweitens ist der Loading Buffer mit Bromphenolblau angefärbt, welches im elektrischen Feld vor den DNA-Fragmenten herwandert und so eine optische Kontrollmöglichkeit des Elektrophoresefortschrittes ermöglicht.



Da die zu untersuchenden DNA Moleküle in ihren für die Elektrophorese relevanten Eigenschaften bis auf ihre unterschiedliche Länge identisch sind, wandern sie im elektrischen Feld nur entsprechend der Anzahl ihrer Basenpaare unterschiedlich schnell. Um die dabei entstehenden Banden sichtbar zu machen, müssen diese angefärbt werden. Hierzu gibt es mehrere Möglichkeiten, von denen zwei in dieser Arbeit genutzt wurden:

### 1. Färbung mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid ist ein im UV-Bereich fluoreszierender Farbstoff, der in DNA interkaliert. Er kann entweder direkt beim Giessen des Gels in diesem gelöst werden, oder das Gel kann nach Beendigung der Elektrophorese in eine ethidiumbromidhaltige Pufferlösung getaucht werden, aus der der Farbstoff ins Gel diffundiert. Anschliessend wird das Gel auf eine UV-Lampe gelegt, wodurch die DNA-Banden deutlich aufleuchten. Diese Methode ist sehr sensitiv, bereits wenige  $\mu\text{g}$  DNA sind unter UV-Licht mit bloßem Auge zu erkennen (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4.** Beispiel einer Elektrophorese mit typischem Bandenmuster nach Ethidiumbromid-Färbung.

## 2. Färbung mit Methylenblau

Bei der Färbung mit Methylenblau wird der Farbstoff direkt beim Giessen des Gels in diesem gelöst. Methylenblau ist positiv geladen und wandert im elektrischen Feld den DNA-Molekülen entgegen, wo er sich dann durch ionische Wechselwirkungen anreichert. Diese Färbemethode benötigt kein UV-Licht, da Methylenblau bereits im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbiert. Dadurch wird die Gefahr UV-bedingter Strangbrüche beim Ausschneiden von Banden aus dem Gel zwecks weiterer Experimente umgangen. Allerdings werden hohe Mengen an DNA benötigt ( $>200 \mu\text{g}$ ), um eine sichtbare Bande zu erzeugen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst alle Elektrophoresegele wegen der höheren Sensitivität mit Ethidiumbromid gefärbt und Proben von 2-10  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt aufgetragen. Gesetzt den Fall, dass eine Bande zur weiteren Verarbeitung ausgeschnitten werden sollte, wurde nach positiver Ethidiumbromid-Kontrolle mit dem Rest des PCR-Produktes ein EtBr-freies Gel beladen und mit Methylenblau gefärbt.

### 5.4.2. Durchführung

Je nach Länge der erwarteten Fragmente wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen gewählt. Für kurze Stücke um 500 bp wurde typischerweise ein 2-%iges Standard-Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer verwendet, für lange Stücke um 6000 bp ein 0,8-%iges Gel aus NEEO-Agarose in 1x TAE-Puffer.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstanden war. Anschliessend wurden 2  $\mu\text{l}$  einer EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) oder wahlweise 200  $\mu\text{l}$  Methylenblau hinzugefügt und das noch flüssige Gel in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Dann wurde ein Kamm zur Aussparung der Probenkammern eingehängt und ca. 10-15 Minuten stehen gelassen, bis das Gel vollständig erstarrt war.

2-10  $\mu\text{l}$  (bei Methylenblaufärbung bis zu 50  $\mu\text{l}$ ) des PCR-Produktes wurden in der Zwischenzeit mit 2  $\mu\text{l}$  loading buffer vermischt. Nach Erstarren des Gels wurden die Proben dann in die Kammern pipettiert. Die beiden äusseren Kammern enthielten jeweils einen passenden Längenmarker. Die Elektrophorese wurde für kurze Fragmente mit 120 V und 125 mA über eine Stunde durchgeführt, für lange Fragmente mit 90 V über eine Stunde und 40 Minuten. Anschliessend wurde das Gel auf einer UV-Lampe fotografiert oder, bei Methylenblaufärbung, die gewünschten Banden ausgeschnitten und weiterverarbeitet.

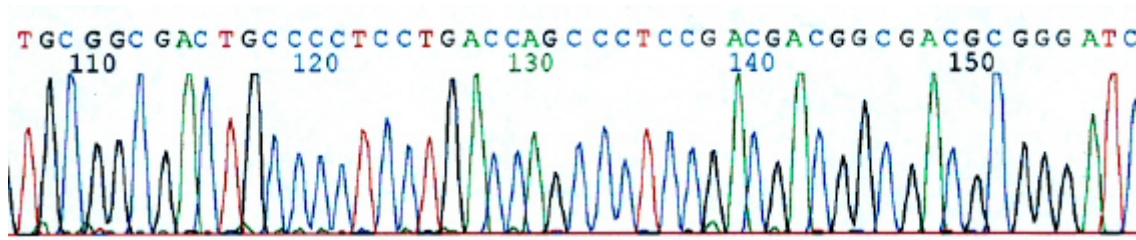
## **5.5. Sequenz-PCR und Sequenzierung**

### *5.5.1. Prinzip*

Zur Aufklärung der Basensequenz eines Nukleinsäurestranges müssen Art und Position eines jeden Nukleotids eindeutig bestimmt werden. Dazu wird zunächst ein üblicher PCR-Ansatz mit entsprechenden, den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt einschliessenden Primern hergestellt. Zusätzlich zu den im Ansatz enthaltenen vier Desoxynukleotidtriphosphaten mit den Basen Adenin, Cytosin, Guanosin und Thymin werden noch spezielle Nukleotid-Analoga (Terminatoren) hinzugefügt, die ebenfalls die vier Basen enthalten, jedoch am 3'-Ende zusätzlich desoxygeniert (Dideoxynukleosidtriphosphate) und mit einem Marker (Dye) versehen sind. Die Terminatoren werden von der DNA-Polymerase als normale Nukleotide erkannt und über ihre am 5'-Kohlenstoffatom befindliche OH Gruppe in den wachsenden Strang eingebaut. Sie führen beim Einbau jedoch zum Strangabbruch, da die OH Gruppe des 3' Kohlenstoffatoms desoxygeniert wurde und so die Verknüpfung mit dem nächsten Basenzucker nicht stattfinden kann. Der so entstandene Strang einer zufälligen Länge ist nun an seinem Ende mit einem Dye markiert, der die letzte Base der Kette eindeutig identifizierbar macht. Die Markierung kann entweder radioaktiv oder durch Farbstoffe geschehen, wobei letztere neben der fehlenden Strahlung den zusätzlichen Vorteil besitzen, dass sich jedes Analogon mit einem Farbstoff eines jeweils anderen Absorptionsspektrums markieren lässt, wodurch alle vier Analoga einem einzigen PCR-Ansatz zugefügt werden

können. Bei der Verwendung gleichartiger Markierungen müssen vier Ansätze mit jeweils einem anderen Didesoxynukleosidtriphosphat hergestellt werden. Die exakte Länge des Stranges und damit die Position der Markierung wird mit Hilfe einer nachfolgenden hochauflösenden Elektrophorese bestimmt. Da die Einzelwahrscheinlichkeit des Einbaus bei jedem Verlängerungsschritt gleich ist, steigt die Gesamtwahrscheinlichkeit, dass in einem Strang irgendwo ein Analogon eingebaut wird, proportional zur Länge des Stranges an. Durch den beim Einbau resultierenden Strangabbruch nimmt die Ausbeute an PCR-Produkten und damit die Signalintensität mit steigender Länge ab, wodurch ab einer bestimmten Länge die erzeugte Menge für eine Auswertung nicht mehr ausreicht. Insgesamt konnten in dieser Arbeit DNA-Abschnitte bis zu einer Länge von 500-700 Basenpaaren sequenziert werden. Längere Abschnitte mussten in überlappenden Teilstücken sequenziert und die Ergebnisse anschliessend zusammengefügt werden.

Die Sequenzierungen wurden allesamt auf einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt) vorgenommen. Dieses Gerät besitzt eine Gel-gefüllte Kapillare, deren eines Ende in die aufgereinigte Sequenz-PCR Lösung getaucht wird und das andere Ende in ein Puffersystem. Die Kapillare selbst ist aus einem Isolatormaterial gefertigt. Wird nun über eine direkt neben der Kapillaröffnung in die Lösung getauchte Elektrode und der Pufferlösung auf der anderen Seite eine Spannung angelegt, so fließt ein Strom durch das in der Kapillare befindliche Gel, wodurch analog zu einer normalen Elektrophorese die geladenen, in der Lösung befindlichen DNA-Fragmente in das Gel einzuwandern beginnen. In der Kapillare befindet sich ein Fenster, durch das ein Laser-Photospektrometer kontinuierlich die Absorption der sich vorbeibewegenden Fragmente bei den vier für die jeweiligen Terminatoren spezifischen Wellenlängen misst. Graphisch gegen die Zeit aufgetragen entsteht so ein Wellenmuster, wobei jeder Peak einem Nukleotid-Analogon am Ende eines Stranges entspricht, welches durch sein Absorptionsmaximum identifiziert werden kann. Da kürzere Stränge im Gel schneller wandern als längere, stellt jeder Peak eine bestimmte Base dar, aufsteigend geordnet in der Reihenfolge ihrer Position (Abb. 5.5). So lässt sich die Basensequenz direkt ablesen, bis das Signal bei zunehmender Länge der Fragmente zu schwach wird und nicht mehr signifikant vom Hintergrundrauschen abzugrenzen ist.



**Abb. 5.5.** Ausschnitt aus einer typischen DNA-Sequenzanalyse. Die vier verschiedenen Wellenlängen sind farblich gekennzeichnet und werden mit der Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Jeder Peak wird automatisch mit dem entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet, so dass die Sequenz einfach abgelesen werden kann.

## 5.5.2. Durchführung

### 5.5.2.1. Sequenz-PCR

Für alle durchzuführenden Sequenzierungen wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0 (Perkin Elmer / Applied Biosystems, Weiterstadt) benutzt. Dieses enthält bereits fertig gemischte PCR-Ansätze mit vier unterschiedlich markierten Terminator-Dyes, zu denen nur noch die den zu sequenzierenden Abschnitt enthaltende DNA (üblicherweise aufgereinigte PCR-Produkte oder Plasmide) und die entsprechenden Primer hinzugefügt werden mussten (Tab. 5.1).

#### Sequenz-PCR mit big-dye Nucleotiden

(BigDye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0)

PCR sense		PCR antisense	
Seq. Kit	4 µl	Seq. Kit	4 µl
Primer sense letzte PCR	0,5 µl	Primer as letzte PCR	0,5 µl
Gesamt	4,5 µl	gesamt	<b>4,5 µl</b>
aufgereinigtes PCR-Produkt:	ca. 15 µl		ca. 15 µl
Gesamt:	ca. 20 µl		ca. 20 µl

**Tab. 5.1.** Beispiel eines Sequenz-PCR Protokolls

Anschliessend wurde im Thermocycler folgendes Schema gefahren:

96°C	2 min		
96°C	10 sec	}	30 Zyklen
50°C	15 sec		
60°C	4 min		
72°C	10 min		

abschliessend Kühlung auf 4°C.

#### 5.5.2.2. Sequenzierung

Die Länge der ablesbaren Sequenz wird hauptsächlich von der Signalreinheit bestimmt. Diese wiederum ist abhängig von der Menge der durch die Kapillare des Sequenzers wandernden DNA, ihrer Geschwindigkeit, mit der sie wandert, vom verwendeten Gel, von der Temperatur des Gels, von der Länge der Kapillare und natürlich von der Güte der Sequenz-PCR und der Aufreinigung.

Die Menge der DNA wird durch die Injektionsspannung und deren Dauer bestimmt. Hierbei wird für kurze Zeit eine sehr hohe Spannung angelegt, die die DNA ins Anfangsstück der Kapillare presst. Je höher die Spannung und je länger sie anliegt, desto mehr DNA wird im Gel deponiert. Die Geschwindigkeit der wandernden DNA wird durch die anschliessend angelegte Elektrophorese-Spannung bestimmt. Übliche Parameter waren:

Injection time: 20 sec

Injection voltage: 2.0 kV

Run time: 40 min

Run voltage: 15.0 kV

Run temperature: 50°C

Diese wurden dann je nach Menge und Güte des Ausgangsmaterials und benötigter Länge des zu sequenzierenden Abschnittes modifiziert. Als Gel kam das Applied Biosystems 3100 Pop-6 zum Einsatz.

## **5.6. Transformation und Klonierung von PCR Produkten**

### *5.6.1. Prinzip*

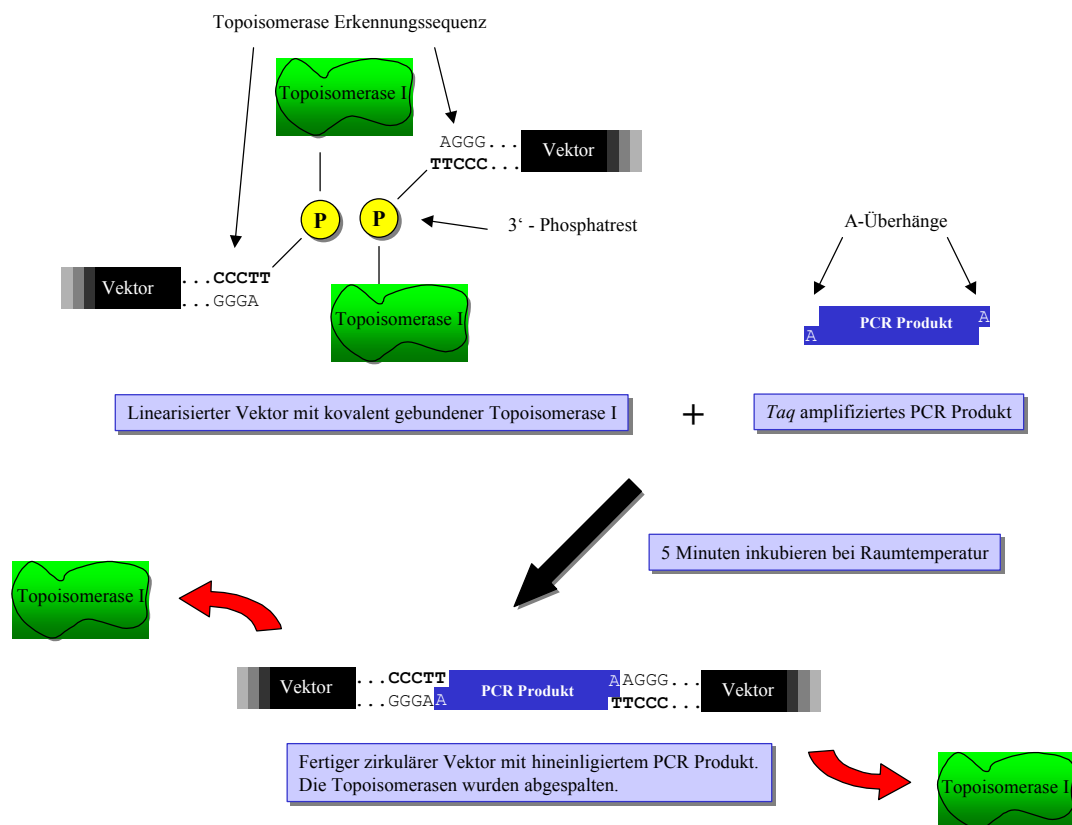
Aufgrund von bei der viralen Replikation in vivo vorkommenden zufälligen Mutationen entwickelt sich im Patienten mit der Zeit eine Quasispeziespopulation des Hepatitis C Virus (67, 80, 100, 120). Das bedeutet, dass das PCR Produkt einer langen PCR keinesfalls eine einheitliche DNA-Struktur darstellt, sondern ein Gemisch aus vielen Quasispezies, die sich untereinander mehr oder weniger deutlich durch bestimmte Mutationen unterscheiden. Um die jeweiligen Isolate einzeln untersuchen zu können, müssen sie zunächst getrennt und dann jeweils wieder zur Sequenzierung vervielfältigt werden. Dazu bedient man sich der Technik des Klonierens. Hierbei werden die Isolate zunächst in Vektoren eingebracht, wobei jeder Vektor immer nur ein Isolat aufnehmen kann (monozistronischer Vektor). Die beladenen Vektoren wiederum werden dann in *E. coli* Bakterien transformiert, die den Vektor samt enthaltenem Isolat bei ihrem Wachstum mitvermehren. Die hier verwendeten Vektoren pCR 2.1-TOPO, pCR 4-TOPO und pCR XL-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande) sind Doppelstrang-DNA-Derivate des zirkulären, männliche *E. coli* infizierenden Einzelstrang-DNA-Bakteriophagen M13 (München 13), der fremde nicht-virale DNA variabler Länge bei erhaltener Replikation aufnehmen kann.

Der Vektor liegt zunächst in linearisierter Form vor. An den 3'OH-Enden befindet sich je ein T-Überhang, an den wiederum das Enzym Topoisomerase I (aus *Vaccinia Virus*) kovalent gebunden ist. Da die in dieser Arbeit erzeugten PCR Produkte allesamt einen 3'OH-Adeninüberhang besitzen, der durch die *Taq* Polymerase generiert wird (siehe 5.2), lagern sich die Enden der PCR Produkte bevorzugt an die Enden der Vektoren an und bilden Wasserstoffbrückenbindungen aus (daher auch als „sticky ends“ bezeichnet).

Durch die Topoisomerase I werden nun die beiden Phosphodiester-Rückgrate des Isolates und des Vektors verknüpft und damit der Vektor zum Plasmidring geschlossen, wobei das Enzym abgespalten wird. Diese Reaktion läuft sehr schnell ab und benötigt bei Raumtemperatur ca. 5 Minuten (siehe Abb. 5.6). Alternativ kann die Ligation auch mit Hilfe einer DNA Ligase vorgenommen werden, diese Reaktion benötigt jedoch 12 Stunden Inkubationszeit bei 4°C.

Der Bereich, in dem die Fremd-DNA eingebaut wird, liegt innerhalb eines *LacZa-ccdB*-Fusion-Gens, welches für *E. coli* letal ist, jedoch bei Aufnahme von Fremd-DNA deaktiviert wird. Somit wird gewährleistet, dass nur Bakterien, die beladene Plasmide aufgenommen haben, überleben, während erfolglose Transfektionsversuche gar nicht erst zum Wachstum gelangen. Nach Bebrütung eines Ausstriches transformierter Zellen entstehen Kolonien, die aus je einer einzelnen Zelle hervorgehen, welche einen Vektor mit Insert aufgenommen hat. Somit stellt jede Kolonie eine klonale Amplifikation einer einzelnen Zelle bzw eines einzelnen Isolates dar. Durch getrennte Kultivierung der Kolonien kann jetzt das im Plasmid enthaltene Isolat beliebig vermehrt werden.





**Abb. 5.6.** Prinzip der Ligation eines PCR-Produktes in einen Vektor mittels Topoisomerase I

### 5.6.2. Durchführung

Zur Klonierung von Isolaten wurde das TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande) benutzt. Zunächst wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

- 4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl TOPO-Vektor
- 1 µl Salt Solution

Die Salt Solution ist eine fertige, im Kit enthaltene Salzlösung aus 1,2 M NaCl und 0,06 M MgCl<sub>2</sub>. Durch Zugabe zum Reaktionsgemisch entsteht eine Endkonzentration von

200 mM NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Diese Anwesenheit von Salzen verhindert eine unerwünschte Wiederanlagerung abgespaltener Topoisomerase I an die DNA und damit eine potentielle Schädigung des Stranges. Das Resultat sind eine zwei- bis dreimal höhere Ausbeute an erfolgreichen Transformationen.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch abkühlen auf 0°C gestoppt. Zwei µl des Reaktionsgemisches wurden nun in ein Cup mit TOP10 Zellen gegeben und sanft durchmischt. Die Bakterien wurden zum Zeitpunkt der maximalen Anstiegssteilheit ihrer Wachstumskurve, an dem die Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmiden am grössten ist, vom Hersteller schockgefrostet (kompetente Zellen). Um die Zellwände zusätzlich zu schwächen und dadurch die Aufnahme der Vektoren weiter zu erleichtern, sind die Zellen oft mit milden Detergenzien (wie beispielsweise β-Mercaptoethanol) und Salzen vorbehandelt. Dadurch sind die E. coli jedoch sehr empfindlich und müssen äusserst vorsichtig gehandhabt werden. Das Gemisch aus Zellen und Vektoren wurde üblicherweise 5 Minuten auf Eis inkubiert, bei zu niedrigen Koloniezahlen konnte diese Zeit auf bis zu 30 Minuten verlängert werden. Die Aufnahme der Vektoren wurde dann gestoppt durch Hitzeschocken der Zellen. Dazu wurden die Cups für exakt 30 Sekunden in ein Wasserbad von 42°C getaucht. Damit die Bakterien keinen bleibenden Schaden nahmen, wurde sie anschliessend sofort auf Eis gekühlt, bevor 250 µl Nährmedium (SOC-Medium) dazugegeben wurden und sich die Zellen bei 37°C und 200 rpm eine Stunde im Thermoschüttler erholen konnten.

Zur Anzucht der Kolonien wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen, welche 50 µg/ml Kanamycin B enthielten. Um sowohl hohe als auch niedrige Transformationserfolge nutzen zu können, wurden auf eine Platte 10 µl der Zelllösung ausgestrichen, auf eine andere 50 µl. Die Platten wurden dann bei 37°C über Nacht (mindestens 12 Stunden) inkubiert. Um die entstandenen Klone eindeutig identifizieren und Auswerten zu können, wurden 10 bis 20 Kolonien jedes Ausstriches mit einer sterilen Pipettenspitze auf eine frische Agarplatte übertragen, die vorher mit einem nummerierten Raster versehen wurde. Nach erneuter Bebrütung bei 37°C über Nacht befand dann sich in jedem Quadrat des Rasters genau eine Kolonie.

## 5.7. Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

### 5.7.1. Prinzip

Um die geklonte virale cDNA in den Plasmiden untersuchen zu können, müssen die Plasmide aus den Bakterien isoliert werden. Dadurch wird auch eine Kontaminierung durch bakterielle DNA verhindert. Hierzu wird eine Kolonie in einem Flüssigmedium vermehrt. Nach Lyse der Zellwände werden Proteinanteile ausgefällt und durch Filtration entfernt. Die verbleibende nukleinsäurehaltige Lösung wird nun, ähnlich der PCR-Aufreinigung (siehe 5.3), über eine Membransäule gegossen, welche die Plasmid-DNA adsorbiert und möglichst alle anderen Inhalte der Lösung passieren lässt. Anschliessend können die Plasmide dann eluiert werden. Je nach Menge der benötigten Plasmide wird dazu eine Kolonie entweder in einer kleinen Menge Nährmedium herangezogen (5 ml, Miniprep), oder in einer grösseren (200 ml, Maxiprep).

### 5.7.2. Durchführung

#### 5.7.2.1. Miniprep

Zur Purifizierung kleinerer Mengen Plasmide wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Ein Teil einer plasmid-tragenden Zellkolonie wurde über Nacht im Thermoschüttler in 5 ml LB Broth Base (mit Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin B) bei 37°C und ca. 250 upm vermehrt. Die Zellen wurden am nächsten Morgen für 10 min bei 4000 upm zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus / Kendro, Hanau) und das überstehende Nähmedium abgegossen. Das Bakterienpellet wurde dann in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorff-Cup transferiert. Zur Lyse der Bakterien wurden nun 250 µl Puffer P2 hinzugefügt und sanft gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 350 µl Puffer N3 zur Neutralisation hinzugefügt, gemischt und bei maximaler Geschwindigkeit (17000 upm, Mikro 22 R, Hettich, Bäch, Schweiz) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Miniprep-Säule gegeben und 60 sec. Bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wurde dann zweimal gewaschen, das erste Mal

durch Zugabe von 500 µl Puffer PB, danach mit 750 µl Puffer PE (jeweils 60 sec. zentrifugiert). Dann wurde der Durchfluss verworfen und die Säule ein weiteres Mal auf einem leeren Auffanggefäss zentrifugiert, um auch den letzten Rest Puffer aus der Membran zu entfernen. Anschliessend wurden 50 µl Puffer EB auf die Membran aufgebracht und eine Minute gewartet. Dann konnte die aufgereinigte Plasmid-DNA in einem letzten Zentrifugationsschritt in ein frisches Eppendorff-Cup eluiert werden.

#### *5.7.2.2. Maxiprep*

Wurden grosse Mengen an Plasmid-DNA benötigt, beispielsweise für eine komplette Sequenzierung des Inserts oder zur Aufbewahrung, so empfahl sich ein Maxiprep (JETstar Plasmid Maxiprep Kit, Genomed, Bad Oeynhausen) durchzuführen. Hierbei wurden Zellen einer Kolonie in 200 ml Flüssigmedium (LB Broth Base mit 50 µg/ml Kanamycin B) über Nacht im Erlenmeyerkolben bei 37°C bebrütet. Zur besseren Sauerstoffdurchmischung der Lösung wurde ein Erlenmeyerkolben mit Schikanen in einem Thermoschüttler bei ca. 150 - 200 upm verwandt. Am nächsten Tag wurde das Flüssigmedium bei 4000 upm 10 Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus / Kendro, Hanau) und der Überstand möglichst vollständig entfernt. In der Zwischenzeit wurden die Säulen mit 30 ml der Lösung E4 aus dem Kit äquilibriert. Bei allen Schritten, bei denen Flüssigkeit über eine Säule geschickt wurde, wurde ohne weitere Kraftaufwendung ausschliesslich mit Hilfe der Schwerkraft gearbeitet. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation mit 10 ml Lösung E1 resuspendiert, bis die Lösung homogen erschien. Dann wurden 10 ml der Lösung E2 hinzugefügt und gemischt, um die Lyse einzuleiten. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lyse gestoppt durch Zugabe von 10 ml Neutralisationslösung E3. Dieses Gemisch wurde nun in der Ultrazentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 20.000 g) und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert (RC 28 S SupraSpeed, Sorvall / Kendro, Hanau). Der Überstand wurde dann auf eine äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde anschliessend zweimal mit 60 ml Lösung E5 gewaschen. Nun konnte die Plasmid-DNA mit 15 ml der Lösung E6 aus der Membran eluiert werden. Um die Plasmid-Lösung weiter zu konzentrieren und handlichere Volumina herzustellen, wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei 4°C und ca.

20.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet mit 1,5 ml Ethanol 70% gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets bei 50°C wurde es in 1 ml DEPC-Wasser resuspendiert und der weiteren Verarbeitung bzw. Aufbewahrung zugeführt.

## **5.8. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in einer Lösung**

### *5.8.1. Prinzip*

Die meisten Moleküle absorbieren aufgrund ihrer chemischen Struktur Licht bestimmter Wellenlängen unterschiedlich stark. Mit einem Spektrophotometer lassen sich diese Absorptionen messen und graphisch gegen die Wellenlänge auftragen. Dabei wird eine Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt und die dahinter gemessene Intensität zu einer Nullprobe in Relation gesetzt. Die daraus resultierenden Absorptionsspektren sind charakteristisch für einen bestimmten Stoff. So können auch in Stoffgemischen die einzelnen enthaltenen Stoffe nachgewiesen werden. In einer Lösung ist die Stärke der Absorption direkt proportional zur Konzentration der Stoffes. Ist die Proportionalitätskonstante (Optische Dichte, OD) des jeweiligen Stoffes bekannt, so lassen sich die absoluten Konzentrationen in einer Lösung direkt photometrisch bestimmen.

### *5.8.2. Durchführung*

Für die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentrationen nach einem Maxiprep wurden die Proben zunächst zwecks besserer Messgenauigkeit mit Aqua bidest. auf 1:100 verdünnt. Die Absorption wurde dann beim Absorptionsmaximum für DNA (260 nm) gemessen und der Leerwert von reinem Aqua bidest. (ebenfalls bei 260 nm) vom Probenwert subtrahiert. Die optische Dichte von DNA wurde mit 50 µg/ml angenommen. Bei einer gemessenen Absorptionsdifferenz von 0.127 beispielsweise ergab sich daraus also eine DNA-Konzentration von 6,35 ng/µl Probe. Da die Probe 1:100 verdünnt war, hatte

das ursprüngliche Gemisch also eine DNA-Konzentration von 635 ng/μl (Abb. 5.7 und Abb. 5.8).

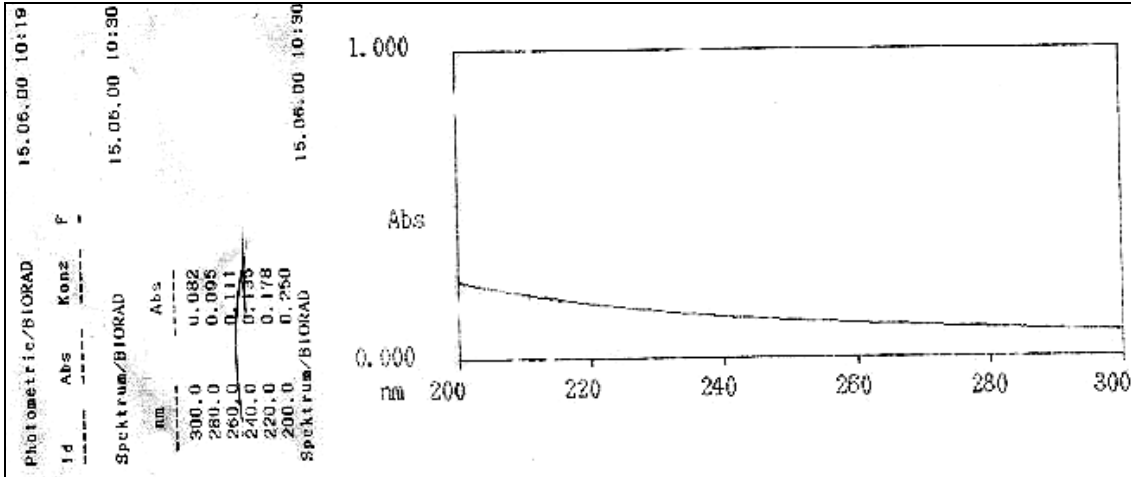


Abb. 5.7. Leerwertmessung im Photospektrometer.

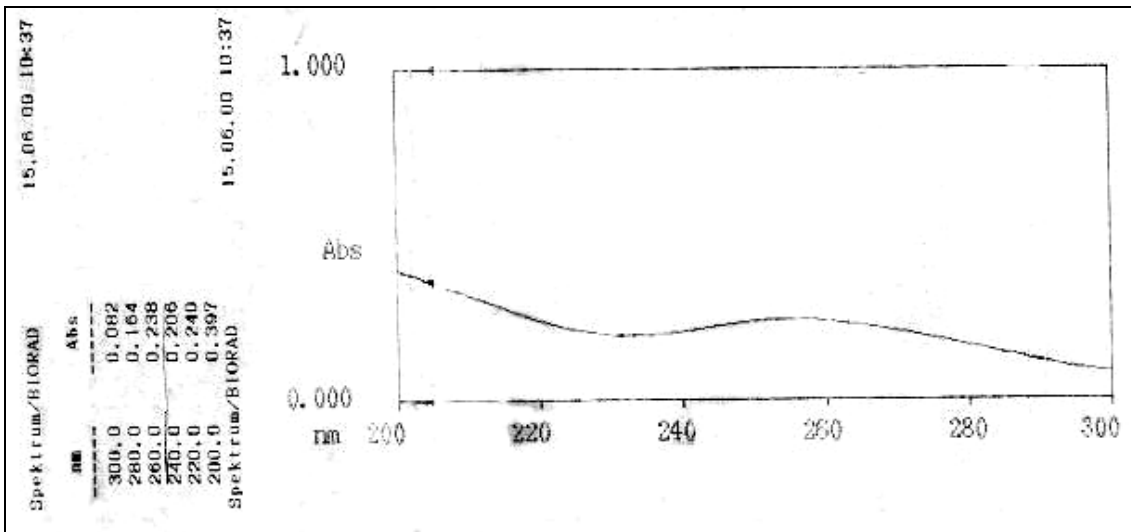


Abb. 5.8. Photospektrometrische Messung einer Plasmid-DNA-Probenlösung.

## 5.9. Erstellung einer Konsensussequenz

### 5.9.1. Prinzip

Wie bereits erwähnt, entstehen im Laufe der Zeit im Körper eines Hepatitis C Patienten verschiedene Quasispezies durch Mutationen. Hinzu kommt, dass auch die zur Amplifikation von DNA-Abschnitten benutzten Polymerasen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit falsche Nukleotide oder irreguläre Verknüpfungen in den Strang einbauen (siehe 5.2.2). *In vivo* werden die meisten dieser Fehler durch zelleigene Reparatursysteme wie die Exonukleaseeigenschaften der Zellpolymerasen korrigiert, *in vitro* fehlen diese jedoch. Damit hängt die Fehlerrate bei der PCR direkt von der verwendeten Polymerase ab.

Es wird angenommen, dass ein grosser Anteil der in einem Patienten produzierten HCV RNA replikationsdefizient ist. Um nicht zufälligerweise eine seltene oder nicht replikative Quasispezies aus dem Patienten oder gar ein Fehlprodukt der PCR als hauptsächlichen Erreger anzunehmen, ist es ratsam, aus den Sequenzen mehrerer zufällig ausgewählter Klone einen Durchschnitt zu bilden, der dann die Konsensussequenz darstellt. Es geht hierbei nicht unbedingt darum, den Wildtyp oder die häufigste Quasispezies des Erregers zu isolieren, sondern vielmehr darum, einen Klon zu erzeugen, dessen Aminosäuresequenz an jeder Stelle der dort am häufigsten vorkommenden entspricht. Damit nimmt die Wahrscheinlichkeit, dass sich an einer Stelle der Sequenz eine Aminosäure befindet, die zur Replikationsdefizienz führt, ab. Der erzeugte Konsensusklon kann dabei durchaus ein künstliches Produkt sein, welches als solches *in vivo* gar nicht vorzufinden ist.

### 5.9.2. Durchführung

Aufgrund des sehr hohen Aufwandes für die Sequenzierung der kompletten NS-Region des Hepatitis C Virus beschränkten wir uns in dieser Arbeit auf vier zufällig ausgewählte Einzelklone als Ausgangsmaterial. Die Konsensussequenz wurde jedoch nicht auf

Nukleotidebene gebildet, sondern auf der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz. Mutationen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz hatten, wurden nicht berücksichtigt. Es wurde also ein Durchschnitt gebildet, in dem jede Aminosäure der in den vier Ausgangssequenzen an den jeweiligen Stellen am häufigsten vorkommenden entsprach (Tab. 5.2). Die Umsetzung der auf diese Weise künstlich erzeugten Sequenz gelang mittels Mutagenese (siehe 5.10) und Umklonierung (siehe 5.11) der einzelnen Klone.

Klon	AS-Sequenz
8422-1	SKWRALETFWAKHMWNFISGIQYLAGLSTLPGNPAAIASLMAFTASVTS
8422-2	-----V-----T-----
8422-3	-----T-----
8422-4	-----T-----I---
8422-con	----- <b>A</b> ----- <b>T</b> ----- <b>V</b> ---

**Tab. 5.2.** Beispiel aus der Erstellung der Konsensussequenz. Die Aminosäuresequenzen von vier HCV-Klonen werden miteinander verglichen. Die Aminosäuresequenzen sind im Standardeinbuchstabencode wiedergegeben. Striche zeigen AS an, die identisch sind mit der Sequenz des ersten Klones. Die Konsensussequenz wird gebildet aus den am häufigsten vorkommenden AS an der jeweiligen Stelle.

Für die Erstellung der nötigen Primer für die lange PCR wurden dagegen die Basensequenzen von bis zu 20 Klonen verglichen, um möglichst genau passende Primer herstellen zu können. Hierbei wurden jedoch nur die entsprechenden Abschnitte der Klone sequenziert (Tab. 5.3).



Bezeichnung	Sequenz
HCV-J	cgtccttctct gacatggaga ctaaactcat cacctggggg
8422-1	-----c ----- -c--g---- -----
8422-2	-----c ----- -c--g---- -----
8422-3	-----c ----- -c--g---- -----
8422-4	-----c ----- -c--g---- -----
8422-5	-----t--c ----- -c--g---- -----
8422-6	-----c ----- -c--g---- -----
8422-7	-----c ----- -c--g---- -----
8422-8	-----c ----- -c--g---- -----
8422-9	-----c ----- -c--gg---- -----
8422-10	-----c ----- -c--g---- -----
8422-11	-----c ----- -c--g---- -----
8422-12	-----c ----- -c--g---- -----
8422-13	-----c ----- -c--g---- -----
8422-14	-----c ----- -c--g---- -----
8422-15	-----c ----- -c--g---- -----
8422-16	-----c ----- -c--g---- -----
8422-17	-----c ----- -c--g---- -----
8422-18	-----c ----- -c--g---- -----
8422-19	-----c ----- -c--g---- -----
Primersequenz	cgtcctt <b>ctcc</b> gacatggaga <b>caaag</b> tcac cacctggggg

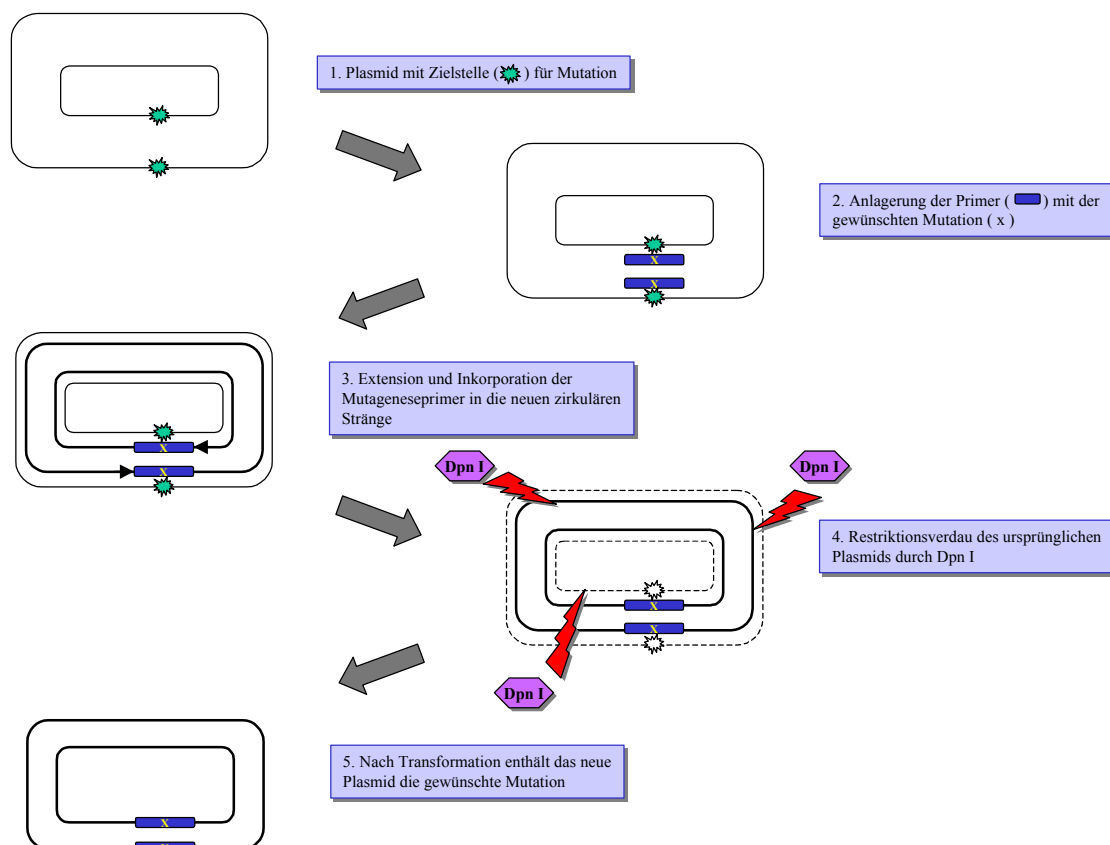
**Tab. 5.3.** Beispiel einer Quasispeziesanalyse auf Nukleotidbasis zur Primererstellung für eine Lang-PCR im HCV-NS2/3-Übergangsbereich. Als Referenzsequenz ist der HCV 1b Prototyp HCV-J angegeben. Striche zeigen Basen an, die identisch mit der Referenzsequenz sind. Die Primersequenz entspricht den an jeder Stelle am häufigsten vorkommenden Basen.

## 5.10. Mutagenese

### 5.10.1. Prinzip

Um einzelne kleine Mutationen innerhalb eines Plasmides zu erzeugen, kann man sich der Tatsache bedienen, dass die Primer einer normalen PCR auch dann an die DNA

binden, wenn sie nicht hundertprozentig mit der Basensequenz der Bindungsstelle übereinstimmen. Die Fehlerrate darf jedoch prozentual zur Gesamtlänge des Primers ein gewisses Mass nicht überschreiten, sonst steigt wiederum die Rate der unspezifischen Bindungen. Aus dem selben Grund darf sich der eingebaute Fehler nicht an den Enden des Oligonukleotids befinden. Insgesamt muss der Primer also relativ lang sein und die gewünschte Mutation in etwa in seiner Mitte beherbergen. Der antisense-Primer ist mit dem sense-Primer komplementär. Führt man nun eine PCR mit zwei solchen Primern an einem ringförmigen Plasmid durch, so binden die Primer an gegenüberliegenden Stellen, und die Polymerasen beginnen, das Plasmid in beide Richtungen entlangzulaufen. Da die Primer später Bestandteil des erzeugten Amplifikates sind, wird dieses an entsprechender Stelle, an der sich die Primer von der Ausgangssequenz unterscheiden, die gewünschte Mutation enthalten (site-directed Mutagenese). Die ringförmige Struktur des Plasmids bleibt dabei erhalten, so dass keine Bruchstücke entstehen, die später aufwendig wieder zusammengefügt werden müssten. Die DNA der Ausgangsplasmide, an denen die Mutagenese durchgeführt werden soll, stammt aus nicht methylierungsdefizienten *E. coli* Bakterien, die Stränge sind daher methyliert (*dam*). Die für die Mutagenese benutzte Polymerase besitzt keine Methylierungseigenschaft, die PCR Produkte sind also nicht methyliert (*dam*<sup>-</sup>). Diese Gegebenheit lässt sich nutzen, um das Ergebnis der Mutagenese zu optimieren. Hierzu wird nach erfolgter PCR die Endonuklease Dpn I hinzugefügt, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA angreift und an der Zielsequenz 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3' schneidet. Dadurch werden die ursprünglichen Plasmide zerstört, während die neu gebildeten nicht angegriffen werden (Abb. 5.9).



**Abb. 5.9.** Prinzip der Site-Directed Mutagenese.

Ist das Ausgangsmaterial der Mutagenese ein lineares DNA-Fragment, oder ist das Plasmid zu gross für eine einzelne PCR, so muss eine Überlapp-PCR durchgeführt werden. Hierbei geht man nach dem selben Prinzip vor wie bei der Plasmid-Mutagenese, mit dem Unterschied, dass zunächst zwei PCR (A und B) durchgeführt werden müssen, je eine mit einem mutationstragenden sense- und eine mit einem mutationstragenden antisense-Primer. Anschliessend wird eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden der gewünschten PCR A und B Produkte ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 5.3). Die beiden PCR Produkte werden dann in einer dritten PCR C zusammengefügt. Dazu werden als Primer die jeweils nicht mutationstragenden aus den beiden ersten Reaktionen gewählt. Als zu amplifizierenden DNA-Abschnitt fügt man die Produkte der ersten beiden PCR hinzu, die sich aufgrund ihrer komplementären Anfangs- bzw. Endbereiche (dort, wo die Mutationen eingefügt wurden) hybridisieren und bei der PCR mit dem jeweils fehlenden Teil vervollständigt werden. Man erhält wieder einen kompletten

DNA-Abschnitt, welcher nun in der Mitte die gewünschte Mutation trägt (Abb. 5.10). Die Isolation des Produktes wird abermals mittels Gelelektrophorese und Ausschneiden der Banden bewerkstelligt.

Alle Mutagenese Produkte müssen anschliessend mittels Sequenzierung überprüft werden. Zum Einen, um den Erfolg der Mutagenese zu verifizieren und zum Anderen, um sicherzustellen, dass keine neue Mutation durch die Polymerase eingefügt worden ist.

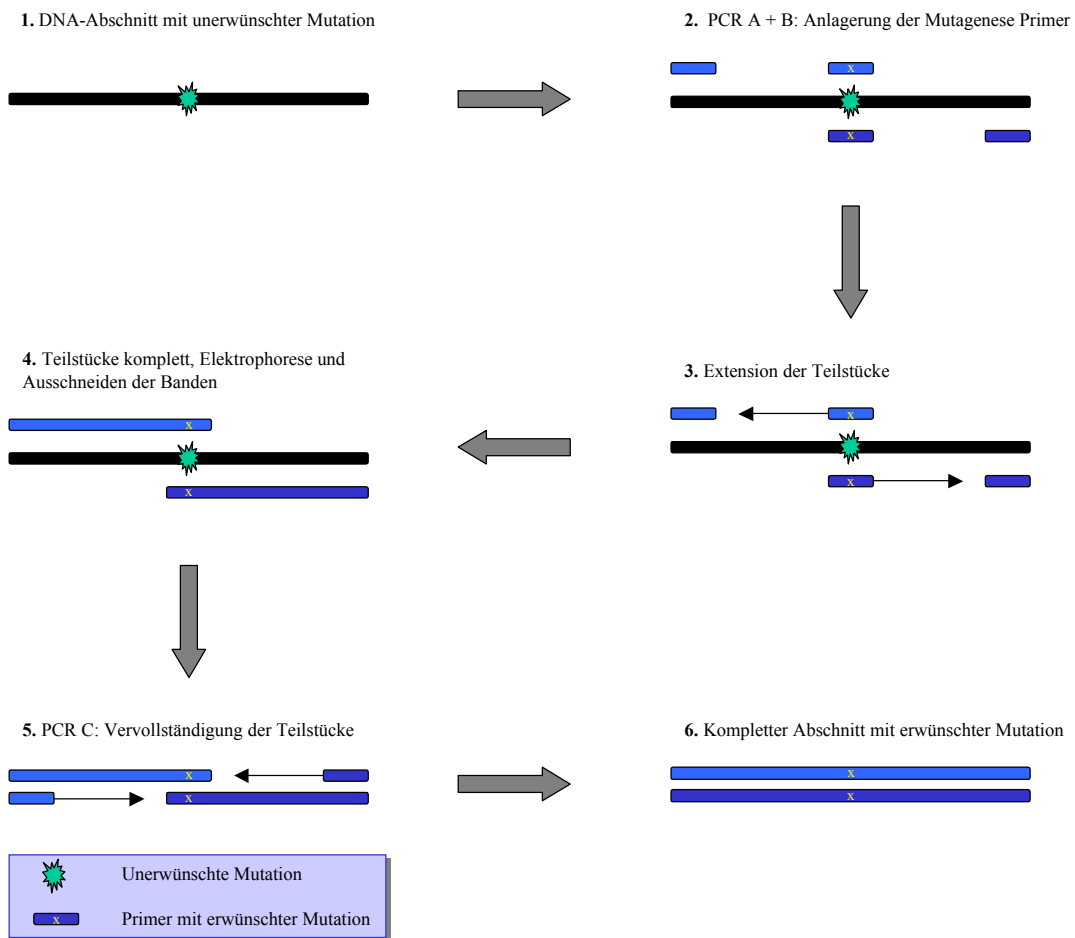


Abb. 5.10. Prinzip der Mutagenese mittels Überlapp-PCR.

### 5.10.2. Durchführung

Die Mutagenesen an Plasmiden wurden allesamt mit dem QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Eine Übersicht der verwandten Mutagenese Primer findet sich in 4.8.2. Die Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer wurde nach folgender Formel annäherungsweise berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - \frac{675}{N} - \%mismatch$$

wobei gilt:

N	Länge des Primers in Basen
%GC	Prozentualer Anteil von Guanosin und Cytosin bezogen auf N
%mismatch	Prozentualer Anteil der von der Primerbindungssequenz abweichenden Basen bezogen auf N

%GC und %mismatch werden dabei auf ganze Zahlen gerundet.

Da es sich bei der Mutagenese PCR mit den in dieser Arbeit verwandten Plasmiden um eine sehr lange PCR handelte (Plasmid + Insert = ca. 10.000 bp), mussten die Bedingungen stets ideal gehalten werden. Hierzu wurden vorher die Primer- und Plasmidkonzentrationen bestimmt (siehe 5.8), um immer annähernd gleiche Mengen in der PCR einsetzen zu können. Die eingesetzte Primermenge betrug 125 ng je Primer, vom Plasmid wurden 10 ng hinzugegeben. Die Extensionszeit im Zyklus wurde auf 20 Minuten festgesetzt, um der Polymerase genügend Zeit für die 10 Kilobasen zu geben. Als Polymerase kam eine Proofreading-Polymerase zum Einsatz, um die Wahrscheinlichkeit einer Neumutation durch die PCR zu minimieren, ausserdem wurde die Anzahl der Extensionszyklen aus dem selben Grund auf 18 begrenzt. Eine PCR zur Plasmid-Mutagenese wurde also folgendermassen durchgeführt:

Reaction Buffer	5 $\mu$ l
Plasmid	x $\mu$ l (10 ng)
sense-Primer	x $\mu$ l (125 ng)
antisense-Primer	x $\mu$ l (125 ng)
dNTP Mix	1 $\mu$ l
QuikSolution	3 $\mu$ l
<i>Pfu Turbo</i> Polymerase	1 $\mu$ l
DEPC Wasser	auffüllen auf 50 $\mu$ l

Als Thermocycler-Konditionen wurden eingestellt:

95°C	1 min	} 18 Zyklen
95°C	50 sec	
60°C	50 sec	
68°C	20 min	
68°C	7 min	
4°C	8	

Anschliessend wurde der Ansatz mit 1  $\mu$ l Dpn I für 60 Minuten bei 37°C verdaut, um die unmutierten Ausgangsplasmide zu zerstören. Das so behandelte PCR Produkt wurde dann in XL-10 Gold Zellen nach dem selben Prinzip wie in 5.6 transformiert. Es wurde jedoch ein speziell auf die XL-10 Gold Zellen abgestimmtes Protokoll benutzt:

1. 45  $\mu$ l der aufgetauten Zellsuspension wurden mit 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versehen und 10 Minuten auf Eis inkubiert.
2. 2  $\mu$ l des mit Dpn I verdauten PCR Produktes wurden hinzugefügt und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.
3. Nun wurden die Zellen für 30 Sekunden in ein 42°C heisses Wasserbad getaucht und sofort danach für weitere 2 Minuten auf Eis gesetzt.
4. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l NZY<sup>+</sup> Broth (42°C) wurden die Cups mit den Zellen eine Stunde lang bei 37°C und 250 upm im Thermomixer inkubiert.

5. Dann wurde das gesamte Volumen der Transformationsreaktion auf eine auf 37°C vorgewärmte LB-Agarplatte (plus 50 µg/ml Kanamycin B) ausgestrichen und über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 37°C inkubiert.

Aufgrund der Grösse des Plasmids war die Transformationseffizienz trotz allem relativ gering, im Durchschnitt wuchsen 3 bis 20 Kolonien pro Ansatz. Aus den gewachsenen Kolonien wurden Minipreps (siehe 5.7) angefertigt und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung überprüft.

Die Überlapp-PCR zur Mutagenese wurden nach standard-Protokoll (siehe 5.2) mit entsprechenden Primern durchgeführt. War der Ziel-DNA-Abschnitt Teil eines Plasmids, so wurde dieser zunächst per Restriktionsverdau ausgeschnitten und nach erfolgter PCR wieder an selber Stelle hineinligiert (siehe 5.11).

## **5.11. Restriktionsverdau und Ligation**

### *5.11.1. Prinzip*

Die Mutagenesen per site-directed Mutagenese und Überlapp-PCR haben den Nachteil, dass dazu immer mindestens eine PCR durchgeführt werden muss, die auch immer die Gefahr von Neumutationen birgt. Ausserdem lassen sich mit diesen Methoden sehr nahe beieinander liegende Mutationen nur schwer einfügen, oder man benötigt für jede einzufügende Änderung eine eigene Mutagenese, was abermals die Fehlerwahrscheinlichkeit erhöht. Dieses Problem lässt sich mit der Technik der Restriktionsverdauung und Umklonierung elegant umgehen.

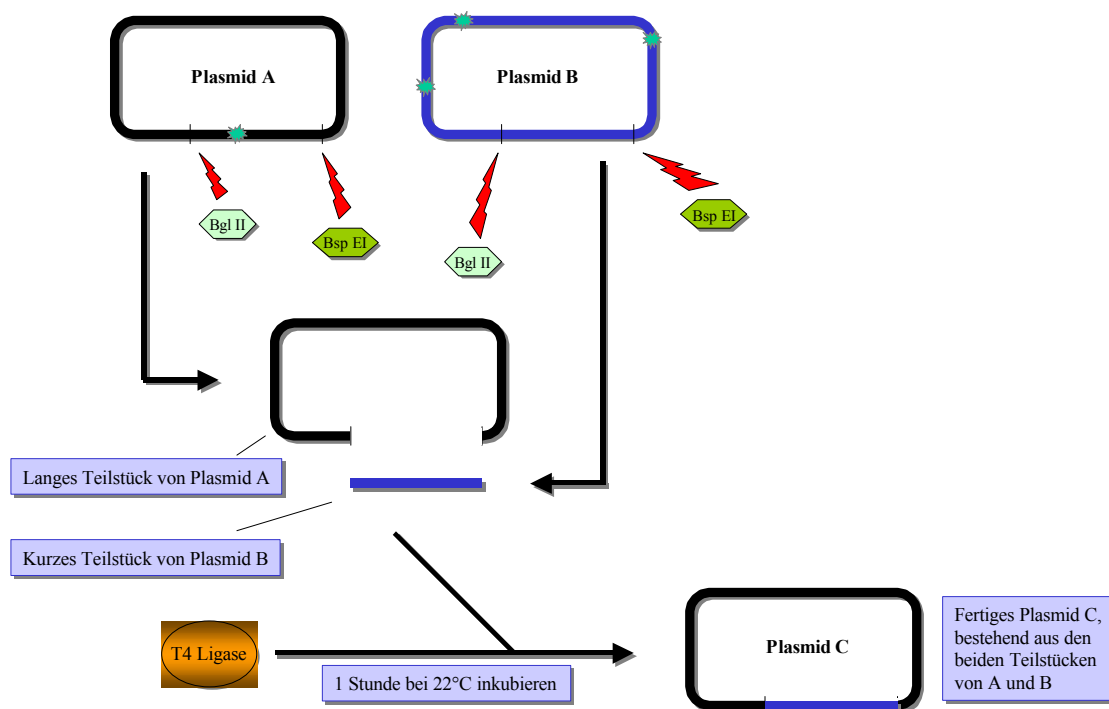
Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die bestimmte Zielsequenzen eines DNA-Stranges hochspezifisch erkennen und den Strang an dieser Stelle zerschneiden. Im Falle eines Plasmids und nur einmaligen Vorkommen der Zielsequenz wird dieses also linearisiert. Kommt die Zielsequenz mehr als einmal vor, oder benutzt man mehrere unterschiedliche Restriktionsenzyme, so wird das Plasmid in mehrere Teile zerschnit-

ten, abhängig von der Anzahl der darin vorkommenden Schnittstellen. Die Teile können anschliessend per Elektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt und weiter verarbeitet werden. Hat man nun, wie in dieser Arbeit, die vollständige Sequenz mehrerer sich nur durch vereinzelt Mutationen unterscheidenden DNA Abschnitte vorliegen, so kann man unerwünschte Mutationen einfach durch Austausch einzelner Teilstücke entfernen.

Angenommen, ein Plasmid A enthält ein Insert, das an einer Stelle eine unerwünschte Mutation trägt. Ein anderes Plasmid B enthält ein Insert einer anderen Quasispezies, die diese Mutation nicht besitzt. Nun wird ein Restriktionsenzym ausgewählt, dessen Zielsequenz möglichst einmal vor und ein weiteres Mal nach der zu entfernenden Mutation vorkommt. Alternativ können auch zwei jeweils nur einmal schneidende Enzyme gewählt werden, deren Zielsequenzen entsprechend angeordnet sind. Nun wird der mutati-onstragende Teil des Plasmids A ausgeschnitten und entfernt. Aus Plasmid B wird mit denselben Enzymen das entsprechende Stück ebenfalls ausgeschnitten und mit Hilfe einer Elektrophorese und anschliessender Gelextraktion isoliert. Dieses ist bis auf die fehlende Mutation mit dem bei Plasmid A entfernten Teilstück identisch. Es wird dann mit dem Rest-Plasmid A in einen Reaktionsansatz gegeben und mit Hilfe einer Ligase wieder eingefügt. Somit entsteht ein Plasmid C, in dem die ursprüngliche Mutation aus Plasmid A entfernt wurde, ohne eine fehlerträchtige PCR durchführen zu müssen. (Abb. 5.11).

Die zur anschliessenden Vermehrung der Plasmide nötige Klonierung in Bakterien hat durch die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen eine erheblich niedrigere Fehlerrate. Ein weiterer grosser Vorteil dieser Methode ist, dass mehrere nahe beieinander liegende Mutationen in einem einzigen Schritt entfernt werden können, vorausgesetzt, es finden sich entsprechende Restriktionsschnittstellen vor und nach den Mutationen und es existiert eine andere bekannte Quasispezies, die besagte Mutationen nicht enthält. Die Art der Mutationen (Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder komplexe Mutationen) spielen dabei keine Rolle.





**Abb. 5.11.** Schematische Darstellung einer Kombination zweier Plasmidanteile mittels Restriktionsverdau und anschließender Ligation der Teilstücke.

### 5.11.2. Durchführung

Da Restriktionsenzyme aus den unterschiedlichsten Organismen stammen, besitzen sie spezifische Temperaturoptima und erreichen ihre maximale Aktivität nur in speziellen Puffersystemen, die sich für die meisten Enzyme unterscheiden, so dass nur dann mehrere Enzyme in einem Ansatz gemischt werden konnten, wenn sie ähnliche Parameter benötigten. Ansonsten wurden nacheinander zwei Ansätze hergestellt. Die oft gebrauchten Enzyme Bgl I, Bgl II, Eco RI und Bsp EI können im selben Puffersystem benutzt werden. Ein typisches Restriktionsverdau-Ansatz sah dann folgendermassen aus:

Bgl II	2 $\mu$ l
Bsp EI	2 $\mu$ l
Puffer NEBuffer 3	2 $\mu$ l
Plasmid	4 $\mu$ l
DEPC-Wasser	auffüllen auf 20 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt durch Hitzeinaktivierung der Enzyme (80°C für 20 Minuten). Die entstandenen Teilstücke wurden dann durch Elektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt und per Gelextraktion aufgereinigt (siehe 5.4). Für die Ligation des gewünschten Teilstückes in das entsprechende Plasmid wurde das Enzym T4 DNA Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) nach folgendem Protokoll verwandt:

Vektor	2 µl
Insert	6 µl
Ligation Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	2 µl
DEPC Wasser	auffüllen auf 20 µl

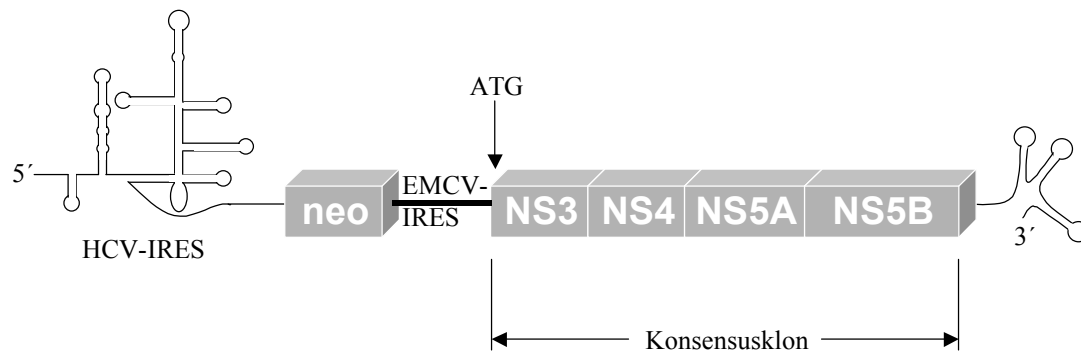
Der Ansatz wurde dann bei 22°C für 60 Minuten inkubiert. Stoppen der Reaktion bei 65°C für 10 Minuten. Das Reaktionsgemisch konnte dann direkt zur Transformation in Zellen (meist E.coli DH5a) verwendet werden.

## ***5.12. Umklonierung der Konsensusklone in den pFK1 Vektor zur Replikation in Hepatomazelllinien***

### *5.12.1. Prinzip*

Die generierten Konsensusklone werden nach dem selben Prinzip wie in 5.11 mittels Restriktionsverdau vom pCR-XL-TOPO in den pFK1 Vektor umkloniert. Dieser ist ein bizistronischer modifizierter pBR322 Vektor und wird von Prof. R. Bartenschlager (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Dieser modifizierte Vektor enthält bereits den originären HCV 5'-Promoter (IRES) vor einem Neomycin-Phosphotransferase-Gen (G418), gefolgt von einem EMCV Promoter (aus Enzephalomyokarditis Virus) und einem artifiziell eingebrachten ATG, dem sich direkt die nicht-strukturellen HCV 1b Gene (NS3 bis NS5B) und das nichtkodierende HCV 3'-Ende mit der poly-U/UC-Sequenz anschliessen. Das gesamte Konstrukt wird flankiert von einem T7 Promotor

am 5'-Ende und einem T3 Promotor am 3'-Ende (siehe Abb. 4.2). Bei der Umklonierung werden die ursprünglich enthaltenen nicht-strukturellen HCV Gene des Genotyps 1b (NS3 bis NS5B) durch die in dieser Arbeit generierten charakterisierten (mit und ohne Ansprechen auf Interferon  $\alpha$  basierter Therapie) HCV 1b Isolate (NS3 bis NS5B) ersetzt (Abb. 5.12). Durch eine direkt hinter dem 3'-NTR-Ende befindliche *Sca* I Schnittstelle kann der Vektor dann linearisiert und mittels einer T7 RNA Polymerase *in vitro* Transkripte des jeweiligen Replikons mit originären 5'- und 3'-NTR-Enden hergestellt werden. Das zwischengeschaltete Neomycin-Phosphotransferase-Gen dient der späteren Identifizierung und Selektion von replizierenden Konstrukten in Humanen Hepatoma-zellen (Huh-7).



**Abb. 5.12.** Schematische Darstellung des in den pFK1 Vektor eingebauten HCV Konstruktes mit originärer HCV-IRES, Neomycin-Phosphotransferase-Gen, EMCV-IRES, NS3-NS5B-HCV-Genomabschnitt (entsprechend dem generierten Konsensusklon) und dem originären 3'-nichtkodierenden Ende mit der poly U/UC-Sequenz.

Zur Umklonierung wird eine *Sfi* I Restriktionsenzymchnittstelle benutzt, die hinter der EMCV-IRES im pFK1 Vektor lokalisiert ist und an der das aminoternale Ende des Konsensusklons eingebunden wird. Entsprechend wird das carboxyterminale Ende des Klons mittels einer *Kpn* I Schnittstelle eingebunden. Zuvor muss eine Restriktionsverdauungskarte des Konsensusklons erstellt werden, um weitere Schnittstellen der benutzten Restriktionsenzyme auszuschliessen oder gegebenenfalls andere geeignete Restriktionsenzyme zu finden.

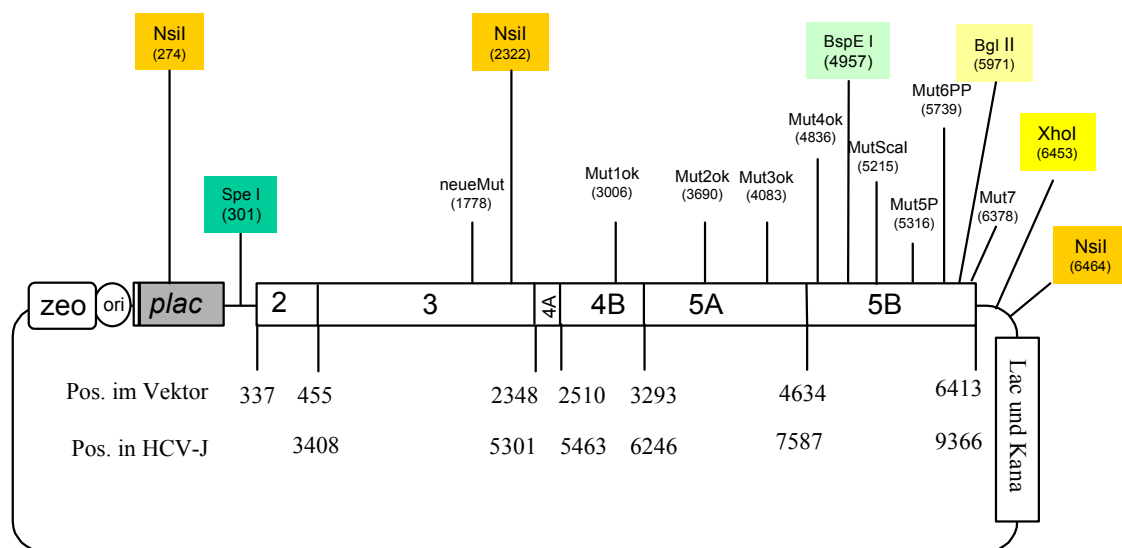
### 5.12.2. Durchführung

Um die Konsensusklone in den pFK1 Vektor zu integrieren, wurde eine Umklonierungsstrategie erstellt, mit der unter Berücksichtigung der vorkommenden Restriktionsenzymststellen sowohl im Vektor als auch in den Inserts der genaue Ablauf der einzelnen Schritte geplant werden konnte. Hier ein Beispiel einer Umklonierungsstrategie zum Einfügen des 8422-Konsensusklons in den pFK1 Vektor. Durch mehrere nacheinander durchgeführte Überlapp-PCR und Umklonierungen von Teilstücken wurden dabei gleichzeitig letzte Fehler aus der gewünschten Sequenz des Konsensusklons entfernt und dieser letztendlich mit dem pFK1 Vektor zum vollständigen Replikon ligiert.

#### 5.12.2.1. Erstellung des fertigen Konsensusklons zur Einbringung in den pFK1 Vektor

Im einer ersten Überlapp-PCR / Klonierungsrunde muss der Konsensusklon soweit vorbereitet werden, dass er in den pFK1 Vektor eingebracht werden kann. Hierzu sind zunächst Überlapp-PCR mit Restriktionsverdau für die Elimination der neuen Mut1778 im Klon 8422mut1-5+ScaPP, der ScaI site mit Mut5 im Klon 8422-3 und von Mut6 im Klon 8422mut1-5+ScaPP nötig.

Ausgangsprodukt ist der Vektor pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP+Mut1778 mit 9595 bp, mit seinem Insert von bp 337 bis bp 6412 bestehend aus 8422-3 Ende NS2 bis TGAACG vom NS5B/3'NTR.



**Abb. 5.13.** pCR XL TOPO Vektor mit Insert 8422mut1-6+ScaPP-Mut1778. Im Insert sind die gewünschten Mutagenesen 1-6 durchgeführt worden. Dabei entstand eine neue unerwünschte Mutation bei Base 1778, ausserdem kam es beim Einfügen der Mutationen 5 und 6 zu einem doppelten Einbau der Mutageneseprimersequenzen, die ebenfalls wieder entfernt werden müssen. Hinzu kommt noch eine *Sca I* Schnittstelle bei 5215, die die spätere Umklonierung in den pFK1 Vektor behindern würde und daher ebenfalls entfernt werden soll.

## Schritt I

1. Verdau von pCR XL TOPO 8422-3 mit

*Spe I* und *Nsi I*

Es entstehen vier Stücke: 27 bp, 2021 bp, 3405 bp und 4142 bp. Aufreinigung des 2021 bp Fragments über Gel und Säule. Das herausgeschnittene Segment entspricht dem originären Stück von 8422, in der die neue Mut1778 noch nicht entstanden war.

2. Verdau von pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP+Mut1778 mit

*Spe I* und *Xho I*

Es entstehen zwei Stücke: 3443 bp und 6152 bp. Aufreinigung des 6152 bp Fragments über Gel und Säule (entspricht in etwa dem TOPO XL Vektor ohne Insert).

3. Verdau von pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP+Mut1778 mit  
*Spe* I und *Xho* I

Es entstehen vier Stücke: 11 bp, 2048 bp, 3405bp und 4131 bp. Aufreinigung des 4131 bp Fragments über Gel und Säule.

4. Ligation der aufgereinigten Banden von 1, 2 und 3 mit T4 DNA Ligase.

Produkt: pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP. Die Mutation bei Base 1778 wurde entfernt.

## Schritt II

1. Umtransformation von pCR XL TOPO 8422-3 in methylierungsdefiziente *E. coli* DH5a.

2. Verdau von pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP aus Schritt I mit  
*Bsp* EI und *Bgl* II

Es entstehen 2 Stücke: 1014 bp und 8581 bp. Aufreinigung des 8581 bp Fragments über Gel und Säule (entspricht dem Produkt von Schritt I ohne ein Teilstück, welches die unerwünschten Mutationen Mut5P und Mut6PP sowie eine unerwünschte *Sca* I Restriktionsschnittstelle enthält).

3. Überlapp-PCR 1

### PCR A

Primer: 1b-seq-s18 (liegt vor der *Bsp* EI site) und 8422-mut-a9 (liegt über unerwünschter *Sca* I site und Mut5P ohne den entsprechenden Mutationen und Primersequenzverdoppelungen)

Template: pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP aus Schritt I

Produkt: ca. 500 bp

PCR B

Primer: 8422-mut-s5 (liegt über unerwünschter *Sca* I site und Mut5P ohne den entsprechenden Mutationen und Primersequenzverdoppelungen) und 8422-full-a1 (liegt hinter der *Bgl* II site)

Template: pCR XL TOPO 8422mut1-6+ScaPP aus Schritt I

Produkt: ca. 1200 bp

Aufreinigung der PCR-Produkte A und B über Agarose-Gel und Säule.

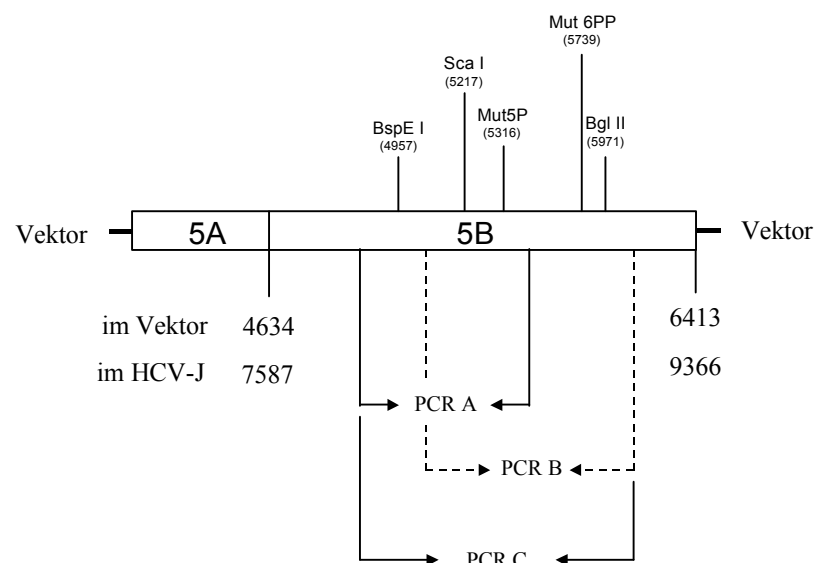
PCR C

Primer: 1b-seq-s18 (liegt vor der *Bsp* EI site) und 8422-full-a1 (liegt hinter der *Bgl* II site)

Templates: PCR Produkte aus PCR A und B

Produkt: ca. 1600 bp

Aufreinigung des PCR-Produktes C über Agarose-Gel und Säule.



**Abb. 5.14.** Schematische Darstellung der Lage der einzelnen Primer für die Überlapp-PCR 1. Es werden hierbei die unerwünschte *Sca* I site sowie die Primersequenzverdoppelung bei Mutation 5 entfernt. Bei der anschließenden Überlapp-PCR 2 wird dann analog hierzu die Primersequenzverdoppelung bei Mutation 6 aus dem Produkt von Überlapp-PCR 1 entfernt. Wichtig ist, dass die Restriktionsschnittstellen von *Bsp* EI und *Bgl* II unverändert innerhalb der Überlapp-PCR verbleiben, um später mit Hilfe dieser das bereinigte Produkt mit dem 8581 bp Teilstück aus Schritt II zum endgültigen Konsensusklon ligieren zu können.

### Schritt III

#### 1. Überlapp-PCR 2

##### PCR D

Primer: 1b-seq-s18 (liegt vor der *Bsp* EI site) und 8422-mut-a6 (liegt über Mut6PP ohne Primersequenzverdoppelung)

Template: Produkt von PCR C von Schritt II

Produkt: ca. 800 bp

##### PCR E

Primer: 8422-mut-s6 (liegt über Mut6PP ohne Primersequenzverdoppelung) und 8422-full-a1 (liegt hinter der *Bgl* II site)

Template: PCR C von Schritt II

Produkt: ca 800 bp

Aufreinigung der PCR-Produkte von D und E über Agarose-Gel und Säule.

##### PCR F

Primer: 1b-seq-s18 (liegt vor der *Bsp* EI site) und 8422-full-a1 (liegt hinter der *Bgl* II site)

Templates: PCR Produkte aus PCR D und E

Produkt: ca. 1600 bp

Aufreinigung des PCR-Produktes F über Agarose-Gel und Säule. Anschliessend Verdau mit *Bsp* EI und *Bgl* II. Gelaufreinigung (3 Banden), das ca. 1000 bp grosse Teilstück wird ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Es entspricht dem gewünschten Sequenzabschnitt für den Konsensusklon.

#### 4. Ligation und Transformation

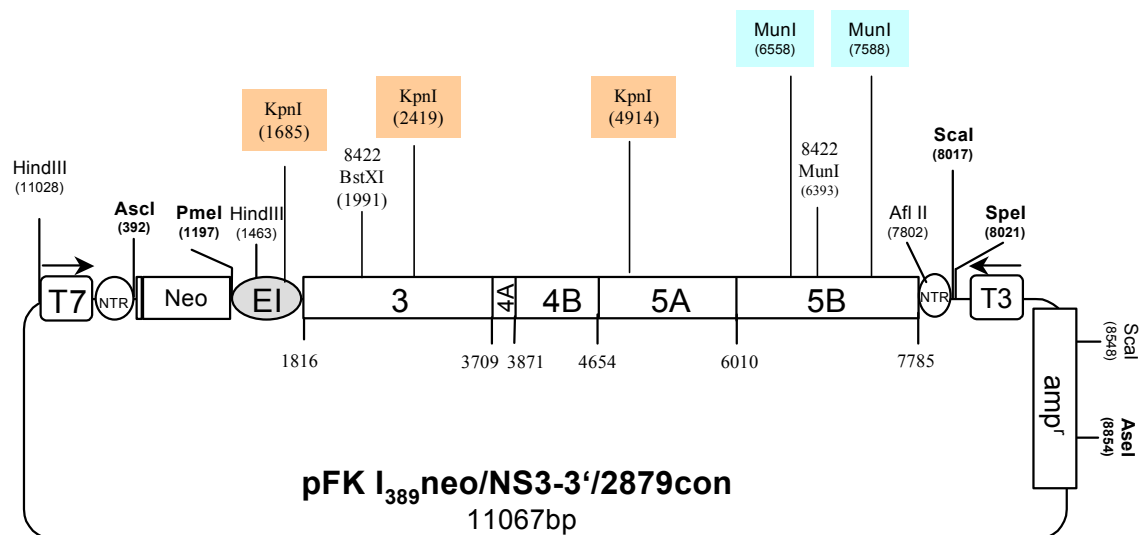
Der verdaute Vektor aus Schritt II (8581 bp Fragment) und das Insert aus Schritt III (ca. 1000 bp Fragment) werden nun mit T4 DNA Ligase zusammengefügt. Als Produkt entsteht pCR XL TOPO 8422mut1-6 mit eliminiertes *Sca*I site, eliminiertes Mut5, elimi-



nierter Mut6 und ohne Primersequenzverdoppelungen. Dieser Vektor wird nun in *E. coli* TOP10 transformiert und per Miniprep amplifiziert und aufgereinigt. Die einzige jetzt noch bestehende Mutation ist Mut7, die bei der Umklonierung in den pFK1 Vektor entfernt wird.

#### 5.12.2.2. Umklonierung in pFK mit Elimination der Mut7

Ausgangsprodukte sind der in 5.12.2.1 erstellte pCR XL TOPO 8422mut1-6, dessen Insert bis auf die letzte verbliebene Abweichung (Mut7) den Konsensusklon 8422con enthält, sowie der Vektor pFK<sub>1389</sub>neo/NS3-3'/2879con, dessen Insert (bestehend aus den nichtstrukturellen Genen eines HCV 1b Wildtyps) durch den 8422 Konsensusklon ersetzt werden soll (Abb. 5.15).



**Abb. 5.15.** pFK I Vektor zur Einbringung des Konsensusklons in die Zellkultur. Der Vektor enthält als Insert die nichtstrukturellen Gene eines klinisch nicht charakterisierten HCV 1b Wildtyps, die bei der Umklonierung durch den in dieser Arbeit generierten 8422-Konsensusklon ersetzt werden. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Basenpaare des Gesamtkonstrukts (Vektor + Insert), beginnend mit dem T7 Promotor Gen. Die mit 8422 gekennzeichneten Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Bst* XI und *Mun* I kommen nur im einzusetzenden 8422 Klon vor, jedoch nicht im ursprünglichen Insert des pFK1 Vektors. Sie sind auf dieser Karte jedoch schon eingezeichnet, da sie im Rahmen der Umklonierung eine wichtige Rolle spielen.

## Schritt I

1. Verdau von pFK1<sub>389</sub>neo/NS3-3'/2879con mit

*Kpn* I und *Mun* I

Es entstehen fünf Stücke: 743 bp, 1030 bp, 1644 bp, 2495 bp und 5164 bp. Aufreinigung des 5164 bp Fragments über Gel und Säule. Die vordere *Kpn* I Schnittstelle liegt innerhalb der EMCV-IRES, wodurch diese zerschnitten wird. Das Fragment entspricht also dem pFK1 Vektor mit einem Rest der EMCV Region am 3'-Ende und einem Rest des NS5B Gens des HCV Wildtyps am 5'-Ende des Vektors.

2. Überlapp-PCR

### PCR A

Primer: s-EMCV-vorPmeI (liegt vor der zerstörten EMCV Region) und a-EMCV-8422-NS3 (bindet mit seinem vorderen Anteil am Rest der EMCV Region und enthält als überhängendes Ende den fehlenden Teil der EMCV bis zum Übergang zum NS3 Bereich der Konsensussequenz)

Template: 5164 bp Fragment aus Punkt 1

Produkt: 680 bp (entspricht der Intakten EMCV-IRES mit Übergang zum NS3 Bereich)

### PCR B

Primer: s-8422-NS3 (als komplementärer antisense Primer zu a-8422-NS3 aus PCR A) und 1b-seq-6a (liegt hinter der *Bst* XI Schnittstelle)

Template: pCR XL TOPO 8422mut1-6

Produkt: 349 bp

Aufreinigung der PCR Produkte A und B über Agarosegel und Säule.

### PCR C

Primer: s-EMCV-vorPmeI und 1b-seq-6a

Template: Produkte aus PCR A und B

Produkt: ca. 1000 bp

Aufreinigung des PCR-Produktes C über Agarosegel und Säule.

3. Verdau des aufgereinigten PCR-Produktes C mit

*Kpn* I und *Bst* XI

Es entstehen drei Stücke: 150 bp, 320 bp und 520 bp. Das 320 bp Teilstück wird ausgeschnitten und aufgereinigt, es entspricht einem Teilstück von der Mitte der EMCV-IRES bis etwa zum ersten Drittel des NS3 Gens von 8422.

4. Verdau von pCR XL TOPO 8422mut1-6 mit

*Bst* XI und *Mun* I

Es entstehen sechs Stücke: 16 bp, 308 bp, 418 bp, 1394 bp, 3011 bp und 4402 bp. Das 4402 bp grosse Stück wird ausgeschnitten und aufgereinigt, es entspricht einem Teilstück von 8422 vom zweiten Drittel des NS3 Gens bis etwa zur Hälfte des NS5B Gens.

5. Ligation der aufgereinigten Banden von 1, 3, und 4 mit T4 DNA Ligase. Das Produkt ist der pFK1 Vektor, der als Insert einen unvollständigen 8422 Konsensusklon trägt (bis etwa zur Hälfte des NS5B Gens), dem sich ein kurzer Rest des Wildtyp-NS5B Gens anschliesst. Die Länge dieses Zwischenkonstruktes beträgt 9872 bp.

## **Schritt II**

1. Verdau des Zwischenkonstrukts aus Schritt I mit

*Afl* II und *Mun* I

Es entstehen zwei Stücke: 214 bp und 9658 bp. Aufreinigung des 9658 bp grossen Teilstückes mit Agarosegel und Säule. Dieses Stück entspricht dem pFK1 Vektor mit einem Teilstück des 8422 Konsensusklons bis etwa zur Mitte des NS5B Gens.

2. PCR mit überlappendem Primer zur Ausschaltung von Mut7

PCR D

Primer: 1b-seq-s18 (liegt vor der *Mun* I site) und a-9402-AfIII-8422-NS (liegt über der *Afl* II site im 3'-NTR Bereich und beseitigt durch Überlappung die noch bestehende Mut7)

Template: pCR XL TOPO 8422mut1-6

Produkt: 1617 bp, Aufreinigung mit Gel und Säule

3. Verdau des Amplifikates aus PCR D mit

*Afl* II und *Mun* I

Es entstehen drei Stücke: 30 bp, 193 bp und 1394 bp. Ausschneiden und Aufreinigung des 1394 bp grossen Teilstückes, es entspricht dem fehlenden Stück des 8422 Konsensusklons bis zur *Afl* II site.

4. Ligation der Produkte aus 1 und 3. Das Produkt ist der endgültige Konsensusklon von 8422 im pFK1 Vektor: pFK1-8422con.

Für dem Klon 8769 wurde analog eine ähnliche Umklonierungsstrategie erarbeitet.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1. Herstellung von Primern für die lange PCR

#### 6.1.1. Amplifikation der HCV 1b NS2 / NS3 und NS5B / 3' NTR Übergangsregionen

Um exakt passende Primer für eine lange PCR der gesamten nichtstrukturellen Gene des Virus Genoms herzustellen, wurde zunächst im Bereich des Übergangs zwischen NS2 und NS3 sowie im Bereich NS5B / 3' NTR aus bereits veröffentlichten HCV 1b Sequenzen (HCV-J, HCV-J4, HCV Con1) (49, 62, 80) eine Konsensussequenz erstellt, nach der dann erste Primer ausgewählt wurden (Abb. 6.1). Mit Hilfe dieser Primer wurden dann die entsprechenden Regionen der HCV-RNA-Extrakte aus Patientenserum per RT-PCR amplifiziert. Da diese Vor-Primer nur in etwa mit der tatsächlichen Sequenz der Isolate übereinstimmten, mussten einige Versuche unternommen werden, bis ausreichend passende Primersequenzen für reproduzierbare Ergebnisse gefunden wurden. Auch eine Anpassung des RT-PCR Protokolls war vonnöten.

Eine deutliche Erhöhung der RT-PCR-Effizienz fand sich dabei durch die Modifikation des Standardprotokolls mit Verwendung einer Touch down Polymerase (Taq Gold) sowie einer Vorinkubation des RNA Extraktes mit dem antisense Primer über 10 Minuten bei 70°C und anschließender Kühlung auf Eis, bevor die restlichen Reagenzien hinzugefügt wurden. Des weiteren wurde DMSO hinzugefügt, um eine bessere Auffaltung der DNA zu erreichen (Tab. 6.1, Tab. 6.2 und Abb. 6.2). Eine weitere Verbesserung brachte eine nested PCR, bei der nach Durchführung einer RT-PCR nach dem modifizierten Protokoll nochmals eine PCR mit weiter innen liegenden Primern angehängt wurde. Im NS5B / 3' NTR Bereich wurde diese als semi-nested durchgeführt.

3171  
 Kato HCV-J tacgtatatg accatcttac tccactgcfg gattgggccc adgcfggcct acgagacctt ggggtggcag tagagcccgt  
 Okamoto HC-J4 -----t---a -----c-----  
 Bartenschlager con1 -----t-----c-----c----- -t-----  
 ← 1b-NS2/3-s2 → ← 1b-NS2/3-1s →

3251  
 Kato HCV-J cgtcttctct gacatggaga ctaaactcat cacctggggg gcagacaccg cggcgtgtgg ggacatcatc tcgggtctac  
 Okamoto HC-J4 -----c----- -c--gg---- -----a----- -a----- -t-----  
 Bartenschlager con1 ----- --t----- -c--gg-t-- ----- -t---c--g-

3331  
 Kato HCV-J cagtctccgc ccgaagggg aaggagatac ttctaggacc ggccgatagt tttggagagc aggggtggcg gctccttgcg  
 Okamoto HC-J4 -c----- -----t --t-g----- c--a--g-- -a----- a-----  
 Bartenschlager con1 -c----- -c----- -g----- a--g----- --a--c--c c--a--g-- ----- a-----c-----  
 → **Beginn NS3**

3411  
 Kato HCV-J cctatcacgg cctattccca acaaacgcgg ggctgcttg gctgtatcat cactagcctc acaggtcggg adaagaacca  
 Okamoto HC-J4 --c-----a-----c----- --g-a----- -t--c----- -----c-----  
 Bartenschlager con1 -----t-----c----- --g-----a----- -a----- -c----- -----c----- -g-----  
 ← 1b-NS2/3-s2 →

3491  
 Kato HCV-J ggtcgatggg gaggttcagg tgctctccac dgcaacgcaa tctttcttgg cgacctgcgt caatggcgtg tgttggaccg  
 Okamoto HC-J4 -----g-----a-----g-t----- |-----a----- |-----a----- -c----- -c-----t-----  
 Bartenschlager con1 -----g-----c-----a-----g----- |-----a----- |-----a----- -----t-----  
 ← 1b-NS2/3-s2 →

**Abb. 6.1.** Ausschnitt aus dem Alignment der drei HCV Genome HCV-J, HC-J4 und con1. Die Nummern geben die Position der jeweils ersten Base einer Zeile nach HCV-J an. Striche zeigen Basen an, die identisch sind mit der Sequenz von HCV-J. Die Markierungen geben die Lage der einzelnen Primer in diesem Ausschnitt sowie den Beginn des NS3 Gens an. Im Bereich des NS5B / 3'NTR Überganges wurde analog verfahren.

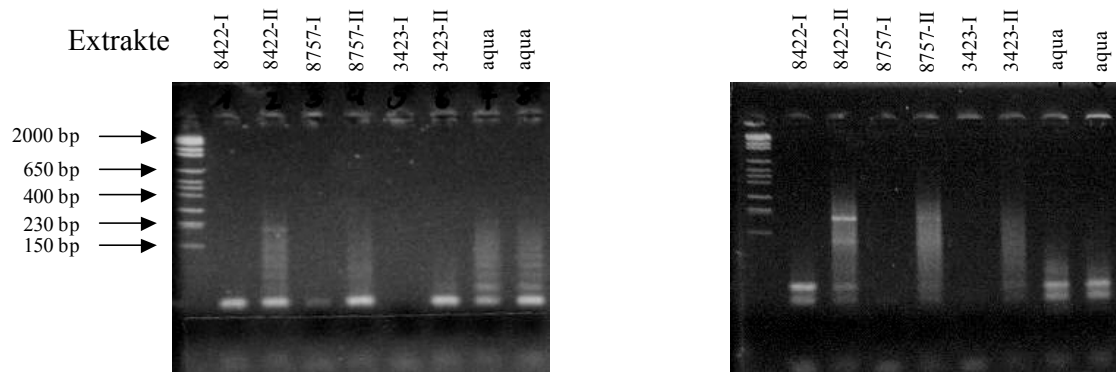
<u>RT</u>		<u>PCR</u>		<u>Cycler</u>	
MgCl <sub>2</sub>	4 µl	PCR Puffer	4 µl	95°C	2 min
Nucleotide	4 µl	NS-1b-s1	1 µl	95°C	20 sec
RT Puffer	2 µl	NS-1b-a1	1 µl	55°C	30 sec
Hexamere	0,5 µl	Aqua	23,75 µl	72°C	40 sec
RNAse Inhibitor	0,5 µl	Taq Polymerase	0,25 µl	72°C	10 min
RT	0,25 µl	RT Produkt	20 µl	Abschliessend Kühlung auf 4°C	
RNA Extrakt	8,75 µl	Gesamtvolumen	50 µl		
<hr/>		<hr/>			
Gesamtvolumen	20 µl				

Tab. 6.1. Standard RT-PCR Protokoll

<u>Vorinkubation</u>	<u>PCR I</u>	<u>PCR II</u>
1b-NS2/3-a2	2 µl	PCR Puffer
RNA Extrakt	10 µl	PCR Puffer
(10 min bei 70°C)		1b-NS2/3-s2
<hr/>		1b-NS2/3-a2
<u>RT</u>		1b-NS2/3-1a
DTT	2 µl	Nucleotide
Nucleotide	1 µl	Nucleotide
RT Puffer	4 µl	DMSO
RNAse Inhibitor	1 µl	DMSO
RNA + Primer	12 µl	Taq Gold
<hr/>		Taq Gold
Gesamtvolumen	21 µl	Aqua
		Aqua
		PCR I Produkt
		<hr/>
		Gesamtvolumen
		50 µl
		<hr/>
		Gesamtvolumen
		50 µl
		<hr/>
		Cycler:
		95°C 12 min
		95°C 30 sec
		50°C 30 sec
		72°C 2 min
		72°C 10 min
		} 45 x
		Cycler:
		95°C 12 min
		95°C 30 sec
		55°C 40 sec
		72°C 1:30 min
		72°C 10 min
		} 35 x

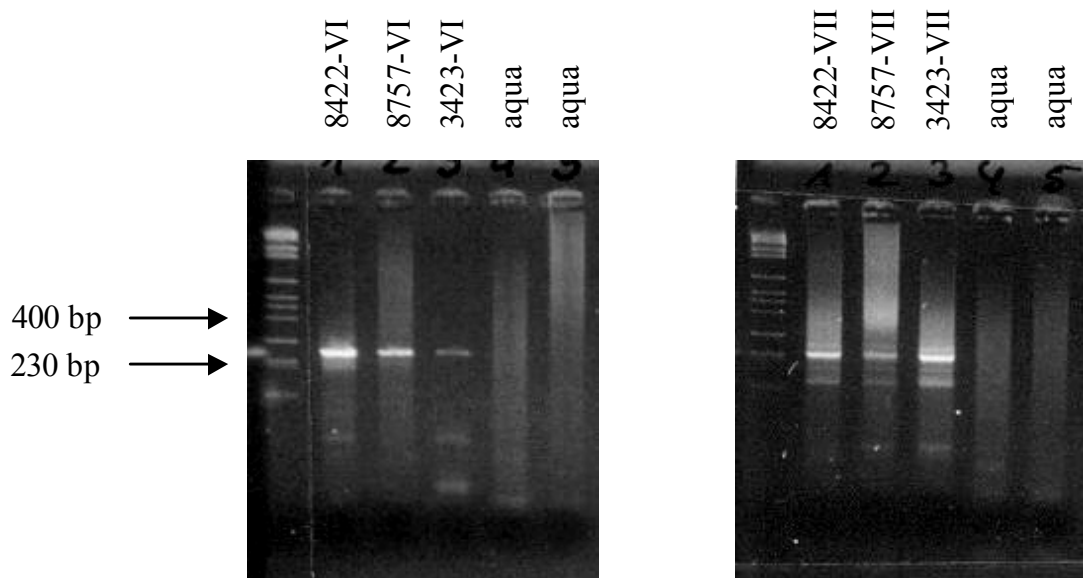
Tab. 6.2. Modifiziertes Protokoll (nested) zur Amplifikation der HCV 1b NS2 / 3 und NS5B / 3' NTR Übergangsbereiche zur Erstellung von Primern für die lange PCR. Es wurde eine Vorinkubation des RNA-Extraktes mit dem antisense Primer durchgeführt, eine Touch down Polymerase für die PCR verwendet sowie eine Anpassung der Thermozyklen vorgenommen,



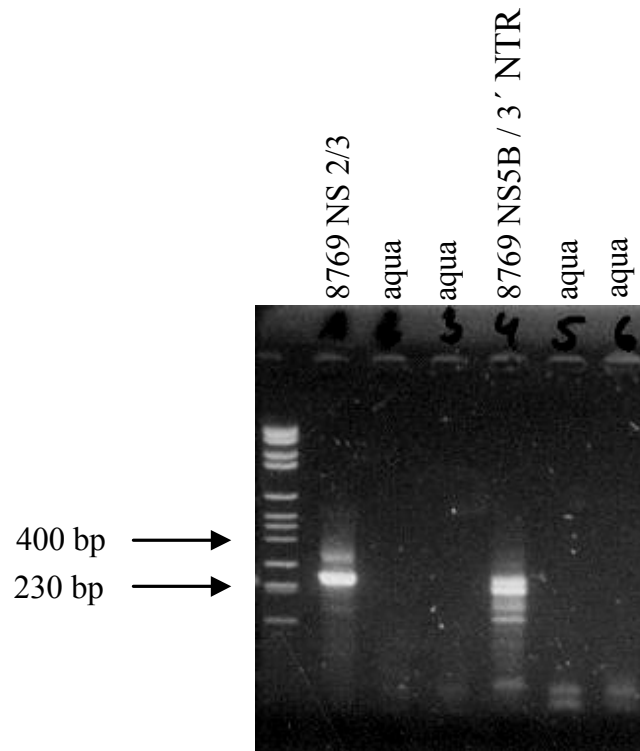


**Abb. 6.2.** Gelelektrophorese zweier RT-PCR mit identischen Proben aus HCV 1b RNA Extrakt mit random Hexamers nach Standardprotokoll (links) und nach modifiziertem Protokoll (nicht nested) mit Vorinkubation des RNA Extraktes mit dem antisense PCR Primer über 10 Minuten bei 70°C (rechts). Trotz einer Reduktion der Thermozyklen-Anzahl von 51 (links) auf 45 (rechts) ist die Bande in Reihe 2 bei ca. 220 bp im rechten Bild deutlich intensiver und schärfer abgrenzbar. Die Elektrophorese wurde in Agarosegel (2,45 %) bei 120 V und 250 mA über eine Stunde durchgeführt.

Insgesamt wurden eine Vielzahl von PCR mit verschiedenen Extrakten aus mehreren Patientenseren angefertigt. Zur weiteren Bearbeitung wurden dann die Patientenseren mit den Nummern 3423, 8036, 8422, 8467, 8757 und 8769 ausgewählt. Die klarsten Banden der NS2 / NS3 und der NS5B / 3'NTR Amplifikate wurden aus den Gelen ausgeschnitten und aufgereinigt.



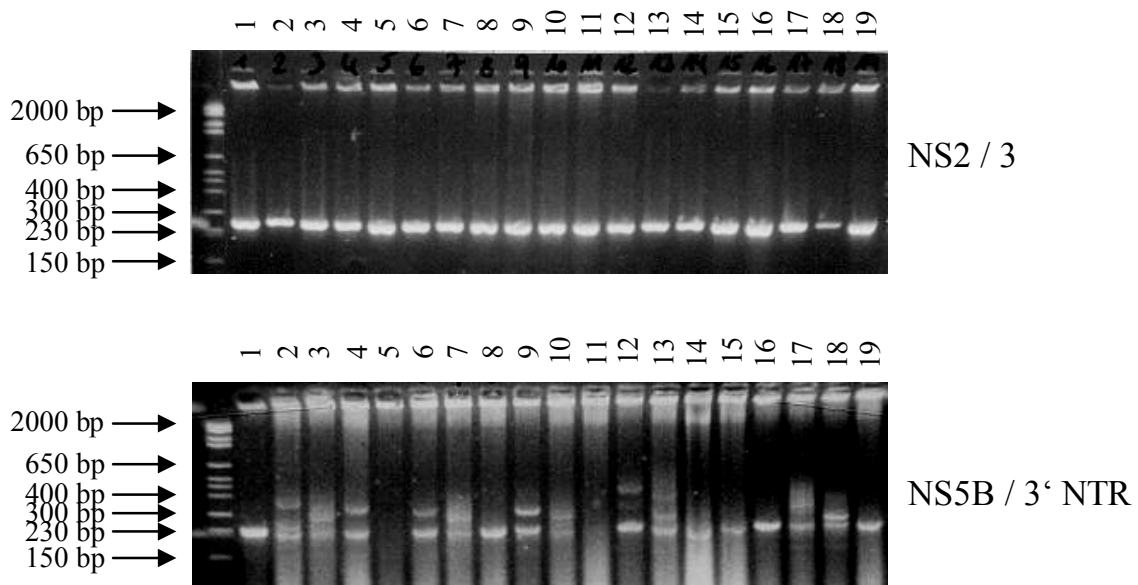
**Abb. 6.3.** PCR der Übergangsregionen NS2 / NS 3 (ca. 280 bp Bande, links) und NS5B / 3' NTR (ca. 230 bp Bande, rechts). Die Banden wurden zur weiteren Verarbeitung ausgeschnitten und aufgereinigt.



**Abb. 6.4.** PCR der Übergangsregionen NS2 / NS 3 (ca. 280 bp, Reihe 1) und NS5B / 3' NTR (ca. 230 bp, Reihe 4) des Patientenserums 8769.

### 6.1.2. Klonierung und Sequenzierung der HCV 1b NS2 / NS3 und NS5B / 3' NTR Übergangsregionen

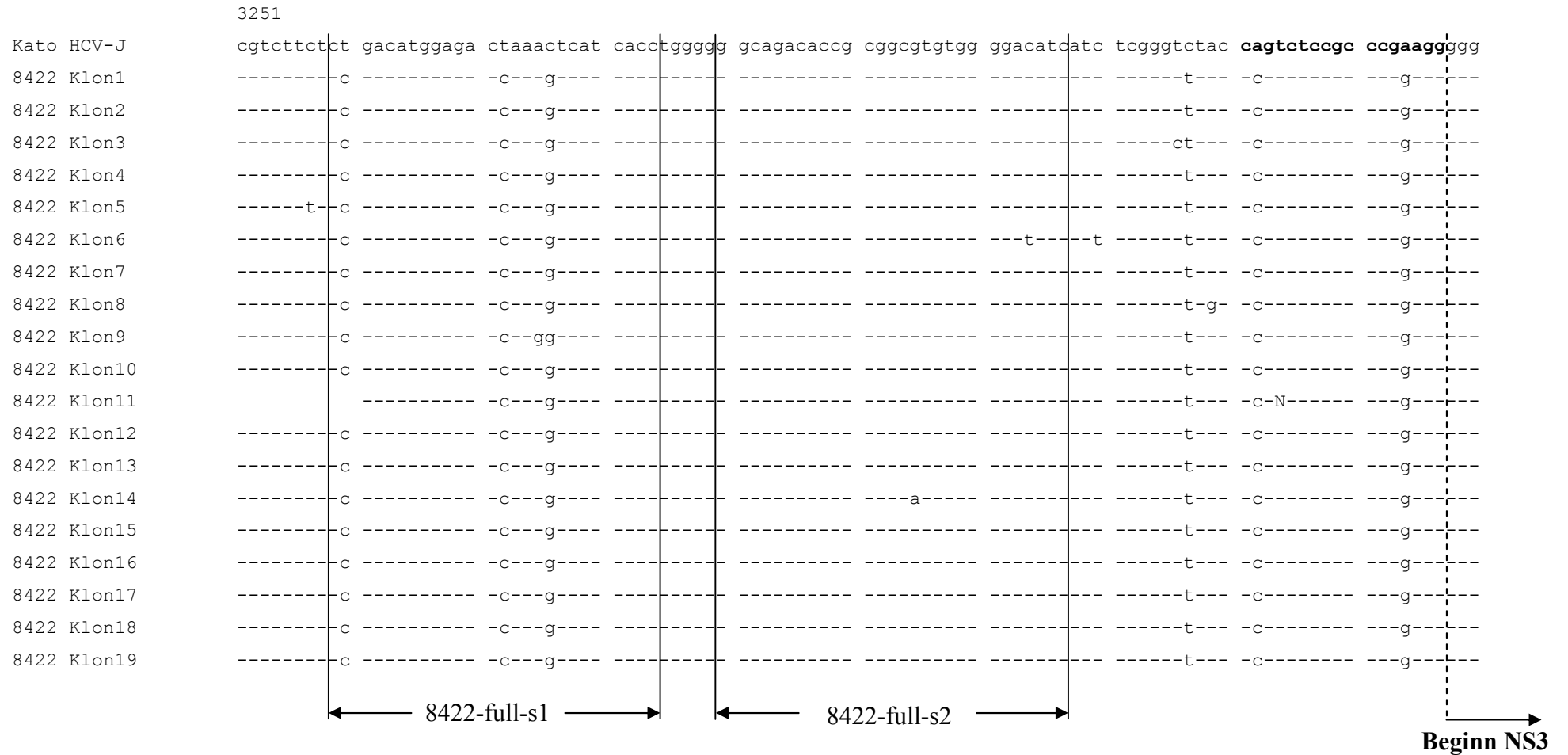
Die DNA der ausgeschnittenen Banden wurde nach Aufreinigung in *E. coli* TOP 10 Zellen transformiert (siehe 5.6). Es wurden jeweils 19 einzelne Kolonien gepickt, auf einer mit einem nummerierten Raster versehenen Platte neu ausgebracht und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Erfolgskontrolle der Transformation wurde dann die PCR II der nested PCR wiederholt, wobei als Template 10 µl einer Zellsuspension aus den jeweiligen Kolonien diente. Das PCR Produkt wurde anschliessend per Gelelektrophorese auf Banden analysiert (Abb. 6.5).



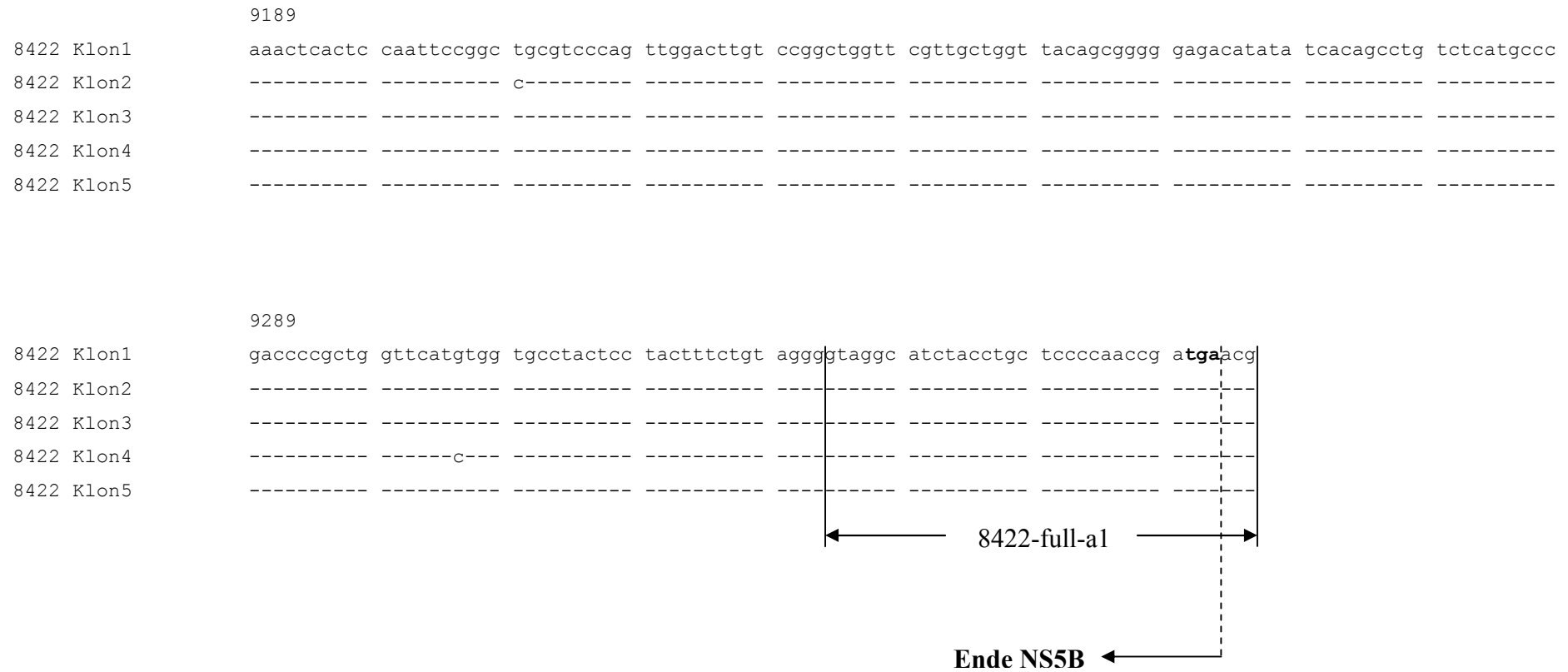
**Abb. 6.5.** Kontroll PCR der transformierten PCR Produkte der HCV 1b (8422) NS 2 / 3 (oben) und NS5B / 3' NTR (unten) Übergangsregionen. Vermutlich aufgrund der Tatsache, dass im NS5B-Bereich nur eine semi-nested PCR möglich war, sind die Banden hier teilweise wesentlich unsauberer.

Es wurden dann alle ausreichend spezifischen Banden ausgeschnitten. Im Beispiel oben (Patientenserum 8422, Abb. 6.5) wurden von den NS2/3 Klonen alle 19 Banden zur Sequenzierung ausgeschnitten, von den NS5B Klonen nur die 230 bp Banden mit den Nummern 1, 4, 5, 8, 12, 14, 15, 16 und 19, von denen sich jedoch nur 5 Klone sequenzieren liessen. Nach dem Alignment der Basensequenzen und Erstellung einer Konsensussequenz dieser Abschnitte wurden dann Primer ausgewählt, mit denen die lange PCR

der gesamten nicht-strukturellen Gene des HCV 1b Virus in Angriff genommen werden sollte (Abb. 6.6 und Abb. 6.7).



**Abb. 6.6.** Alignment der 19 Klone des Patientenserums 8422 im Übergangsbereich NS2 / NS3. Als Referenzsequenz ist HCV-J angegeben. Die Nummern geben die Position der jeweils ersten Base einer Zeile nach HCV-J an. Striche zeigen Basen an, die identisch sind mit der Sequenz von HCV-J. Die Lage der endgültigen sense Primer für die lange PCR sowie der Beginn des NS3 Gens sind markiert. Mit dem Patientenserum 8769 wurde analog verfahren.

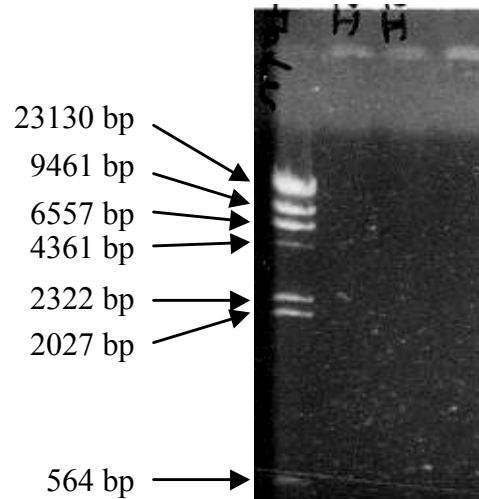


**Abb. 6.7.** Alignment der 5 Klone des Patientenserums 8422 im Übergangsbereich NS5B / 3'NTR. Die Nummern geben die Position der jeweils ersten Base einer Zeile nach HCV-J an. Striche zeigen Basen an, die identisch sind mit der Sequenz des ersten Klons. Die Lage des endgültigen antisense Primers für die lange PCR sowie das Ende des NS5B Gens sind markiert. Mit dem Patientenserum 8769 wurde analog verfahren.

## 6.2. Lange PCR

### 6.2.1. Entwicklung eines PCR Protokolls für die lange HCV 1b PCR

Mit Hilfe der nun vorhandenen hochspezifischen Primer sollte jetzt eine Amplifikation des gesamten nicht-strukturellen Genomabschnittes von HCV 1b durchgeführt werden. Es gab jedoch keine in der Literatur verfügbaren Protokolle oder Anhalte für eine solche PCR. Die meisten Protokolle für sehr lange PCR basieren auf  $\lambda$ -Phagen DNA oder humaner DNA als Template (22, 68, 113). Amplifikationen viraler RNA-Genomabschnitte dieser Länge waren bisher nur für einen anderen Vertreter der Flaviviridae beschrieben, wobei hier mit mehreren Teilstücken gearbeitet wurde, die später zusammengefügt wurden (3). Als Ausgangspunkt wurde das im Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim) vorgeschlagene Protokoll für  $\lambda$ -Phagen DNA benutzt. Hiermit zeigten sich zunächst keinerlei Banden, so dass Modifikationen nötig waren.



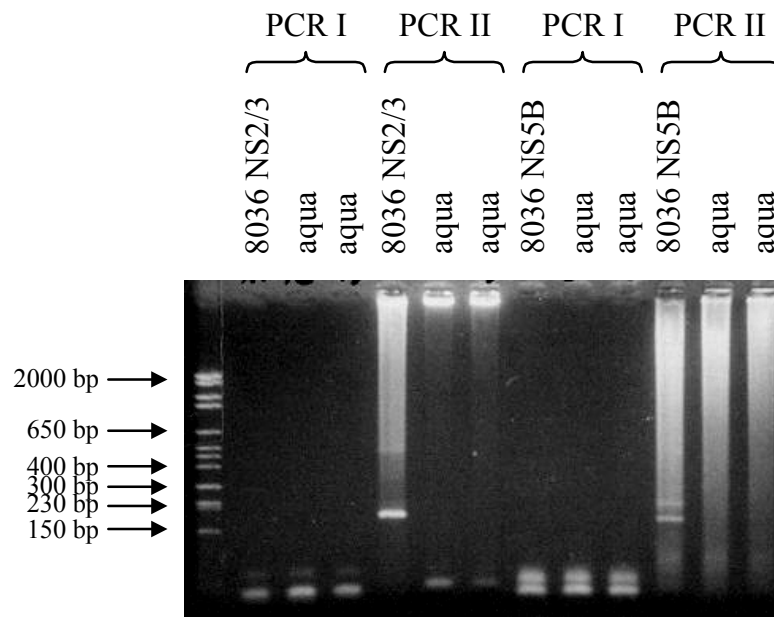
**Abb. 6.8.** Elektrophorese des ersten Versuches einer langen HCV 1b NS3 – NS5B PCR nach Standardprotokoll (Serum 8036). Es sind keine Banden zu erkennen. Als Marker wurde  $\lambda$  DNA/*Hind*III Marker 2 (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwandt. Es wurden – wie in allen folgenden Lang-PCR Elektrophoresen – jeweils 5  $\mu$ l des Produktes aus PCR II aufgetragen. Die Elektrophorese wurde durchgeführt in 0,8 % Neo Agarosegel bei 90 V über 90 Minuten. DNA Längenmarker und die Elektrophoreseparameter gelten ebenfalls für alle folgenden langen PCR.

Um sicherzugehen, dass die erstellten Primer auch funktionieren, wurde eine kurze PCR durchgeführt, bei der jeweils ein Primer der neu erstellte Lang-PCR Primer war und der andere ein bereits erprobter aus der Primererstellungphase. Hierbei zeigten sich in der nested PCR klare Banden bei den zu erwartenden Längen. Interessanterweise waren die Banden jedoch nur in der jeweils zweiten (nested) PCR zu erkennen, dort dann aber auch – allerdings etwas schwächer – die längeren Amplifikate der ersten PCR (Abb. 6.9). Zu erklären war dies dadurch, dass beim Übertragen des PCR Produkts der ersten PCR in den Ansatz der zweiten das gesamte Gemisch unaufgereinigt benutzt wird und somit Restmengen an Primern mit übertragen werden, die dann in der zweiten PCR zu einer weiteren Amplifikation führen. Dadurch war aber auch klar, dass die Technik der nested PCR in diesem Fall dringend notwendig war, um bei den sehr geringen Konzentrationen der Serum-Extrakte eine ausreichende Nukleinsäurekonzentration zu erzielen. Die erste Massnahme zur Optimierung des Protokolls war daher, die Konzentration der RNA Extrakte zu erhöhen, indem beim Extrahieren die doppelte Menge Serum (200 µl) eingesetzt und nur noch 30 statt 50 µl Wasser zum eluieren verwandt wurde.

Als weitere Optimierung wurden die Hybridisierungstemperaturen dahingehend angepasst, dass sie jeweils ein Grad Celsius unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Primer lagen, um unspezifische Bindungen zu minimieren.

Um Modifikationen an der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches kontrolliert vornehmen zu können, wurden die Konzentrationen eines jeden Reagenz im Gemisch exakt festgelegt. Weiterhin wurde bei den PCR mit zwei sogenannten Mastermixes gearbeitet. Der erste enthielt alle Nukleinsäuren (Primer, Nukleotide und cDNA) und wurde auf Eis angesetzt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Der zweite enthielt alle restlichen Reagenzien und wurde bei Raumtemperatur angesetzt, um ein Ausfallen des Puffers zu vermeiden. Beide Mastermixe wurden erst direkt vor dem Einsetzen in den Thermocycler zusammenpipettiert und gut durchmischt.



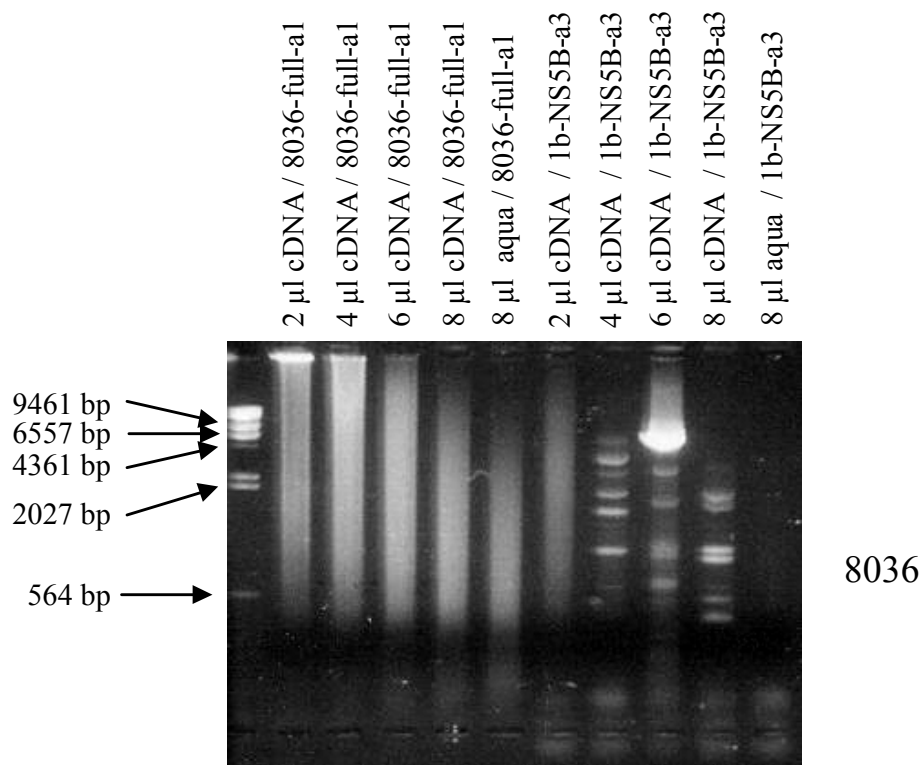


**Abb. 6.9.** PCR mit jeweils einem Lang-PCR Primer und einem Primer aus den Vorarbeiten. Sowohl im NS2/3 als auch im NS5B Bereich sind in den zweiten PCR je zwei Banden zu erkennen. Die längeren und schwächeren Banden entsprechen dem Amplifikat der äusseren PCR, die kürzeren und stärkeren dem der inneren (nested) PCR. Aufgrund der Tatsache, dass im NS5B Bereich nur eine semi-nested PCR durchgeführt wurde, ist das äussere Amplifikat nur wenig länger als das innere, im NS2/3 Bereich ist der Längenunterschied durch die weiter auseinander liegenden Primer der echten nested PCR deutlich grösser.

Bei den Versuchen stellte sich jedoch bald heraus, dass eine solch lange PCR hochempfindlich auf Unterschiede in der Menge der eingesetzten Ausgangs-DNA reagierte. Entscheidend war hierbei vor allem die Menge an cDNA, die aus der RT-Reaktion in die erste PCR überführt wurde. Bereits ein einziger Mikroliter (entsprechend wenigen Nanogramm DNA) mehr oder weniger konnte für den Erfolg oder Misserfolg der PCR verantwortlich sein. Ausserdem brachte eine semi-nested PCR keine Erfolge, so dass auf einen weiter aussen liegenden und glücklicherweise exakt passenden Primer aus den Vorversuchen zurückgegriffen wurde, um eine full-nested PCR durchführen zu können. Nachdem alle diese Faktoren berücksichtigt waren und auf an anderer Stelle liegende Primer zurückgegriffen wurde, gelang die erste lange PCR der gesamten nichtstrukturellen HCV 1b Gene (Tab. 6.3 und Abb. 6.10).

<b><u>Vorinkubation</u></b>		<b><u>PCR I</u></b>		<b><u>PCR II</u></b>	
1b-NS5B-a3	2 µl	<b>Mastermix 1</b>		<b>Mastermix 1</b>	
RNA Extrakt	3 µl	20 mM Na-dNTP	5 µl	20 mM Na-dNTP	5 µl
(10 min bei 65°C)		8036-full-s1	1,5 µl	8036-full-s2	1,5 µl
		1b-NS5B-a3	1,5 µl	8036-full-a1	1,5 µl
		RT (cDNA)	variabel	PCR I	5 µl
		Mit aqua auf 25 µl auffüllen		Mit aqua auf 25 µl auffüllen	
<b><u>RT</u></b>		<b>Mastermix 2</b>		<b>Mastermix 2</b>	
Aqua RNase frei	4 µl	Expand	5 µl	Expand	5 µl
Expand RT Puffer	4 µl	PCR Puffer 3		PCR Puffer 3	5 µl
100 mM DTT	2 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
20 mM Na-dNTP	4 µl	DMSO	1 µl	DMSO	1 µl
RNase Inh. 40 U/µl	0,5 µl	Expand Polyme- rase Mix 3,5 U/µl	0,75 µl	Expand Polyme- rase Mix 3,5 U/µl	0,75 µl
Expand RT 50 U/µl	1 µl	Mit aqua auf 25 µl auffüllen		Mit aqua auf 25 µl auffüllen	
RNA + Primer	5 µl				
Gesamtvolumen	20,5 µl	Gesamtvolumen (MM1 + MM2)	50 µl	Gesamtvolumen (MM1 + MM2)	50 µl
(60 min bei 42 °C)					
		<b>Cycler</b>		<b>Cycler</b>	
		94 °C 2 min		94 °C 2 min	
		94 °C 10 sec	} 10 x	94 °C 10 sec	} 10 x
		53 °C 30 sec		61 °C 30 sec	
		68 °C 6 min		68 °C 6 min	
		94 °C 10 sec	} 20 x	94 °C 10 sec	} 20 x
		53 °C 30 sec		61 °C 30 sec	
		68 °C 5 min + je 20 sec		68 °C 5 min + je 20 sec	
		68 °C 7 min		68 °C 7 min	

**Tab. 6.3.** Protokoll der ersten funktionierenden langen PCR mit Patientenserum 8036. Näheres siehe Text.

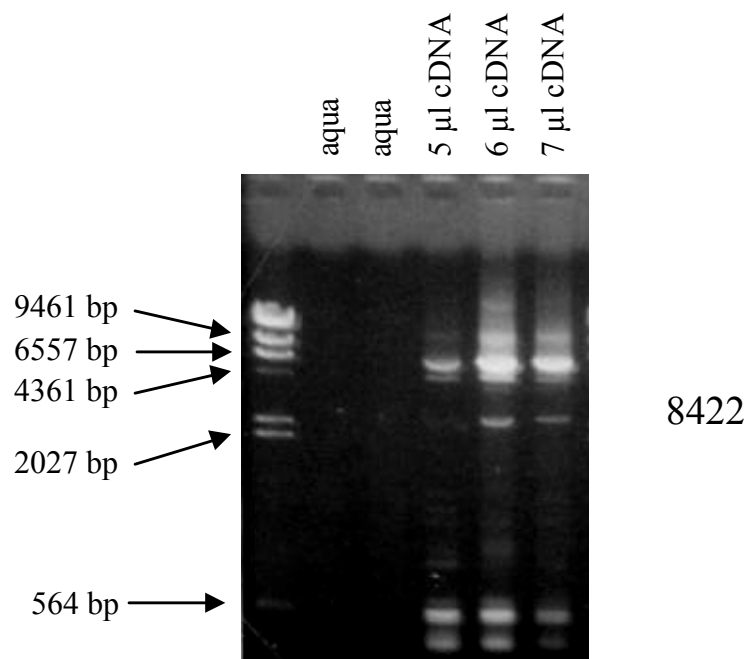


**Abb. 6.10.** Lange PCR des Patientenserums 8036. Die PCR wurde aus frischen RNA Extrakten angefertigt (200 µl Serum auf 30 µl Eluierungsvolumen). Die Reihen sind mit der Menge des Produktes, das jeweils aus der RT Reaktion in die PCR I überführt wurde und mit den verwendeten antisense Primern beschriftet. Als sense Primer kamen 8036-full-s1 (PCR I) und 8036-full-s2 (PCR II) zum Einsatz. Als inneren antisense Primer wurde 8036-full-a1 verwandt. Während bei der semi-nested PCR mit ausschliesslich 8036-full-a1 als antisense Primer keine Ergebnisse zustande kamen, war die full-nested PCR mit 1b-NS5B-a3 als äusserem antisense Primer erfolgreich, wobei auch die extreme Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA Menge sichtbar wurde. Bei 2 µl Übertrag zeigt sich keine einzige Bande, bei 4 µl Übertrag sind bereits viele unspezifische Banden sichtbar, darunter auch eine schwache in der erwarteten Länge. Bei 6 µl Übertrag ist eine hochspezifische Bande mit grossen Mengen an DNA der erwarteten Länge (ca. 6000 bp) zu sehen, die jedoch mit 8 µl Übertrag bereits nicht mehr zu reproduzieren ist.

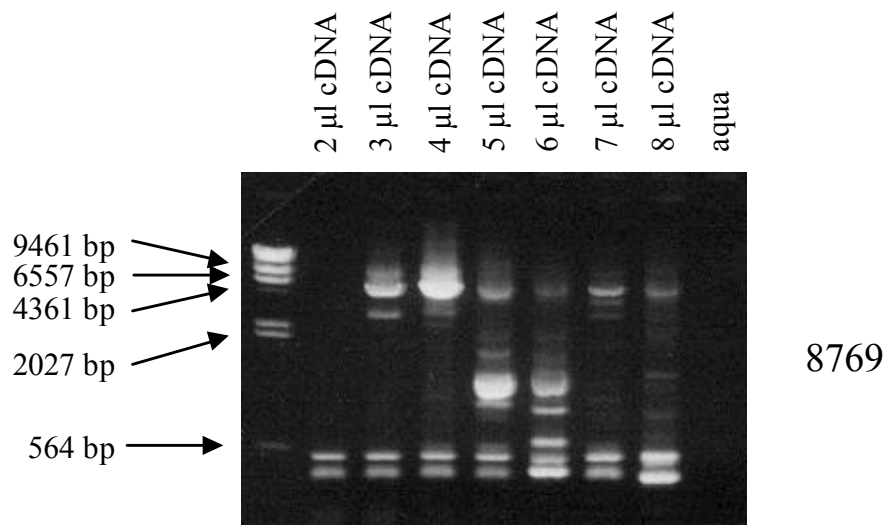
6.2.2. Erstellung von Amplifikaten der nichtstrukturellen HCV 1b Gene von ausgewählten Patientenseren

Aus der Serumbank wurden Serumproben von Patienten ausgewählt, deren Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie klar definiert werden konnte entweder als dauerhaftes virologisches Ansprechen (sustained Responder, SR), oder als fehlendes virologisches Ansprechen (Non-Responder, NR). Sustained Responder waren durch einen negativen HCV-RNA Nachweis im Serum sowohl am Ende der Therapie als auch der mindestens 24 wöchigen Nachbeobachtung definiert, Non-Responder durch einen weiterhin positiven HCV-RNA Nachweis unter der Behandlung und am Ende der Therapie.

Nach diesen Vorgaben wurden die Seren mit den Nummern 3423, 8036, 8422, 8467, 8757 und 8769 ausgewählt. Nach obigem Protokoll (Tab. 6.3) wurden dann lange PCR der jeweiligen Seren angefertigt. Erfolgreiche Amplifikationen gelangen jedoch nur aus den Seren 8036 (Abb. 6.10), 8422 (Abb. 6.11) und 8769 (Abb. 6.12).



**Abb. 6.11.** Erste erfolgreiche lange PCR aus dem Patientenserum 8422. Es wurden die Primer 8422-full-s1 und 1b-NS5B-a3 für die äussere PCR (I) sowie 8422-full-s2 und 8422-full-a1 für die innere PCR (II) verwandt.

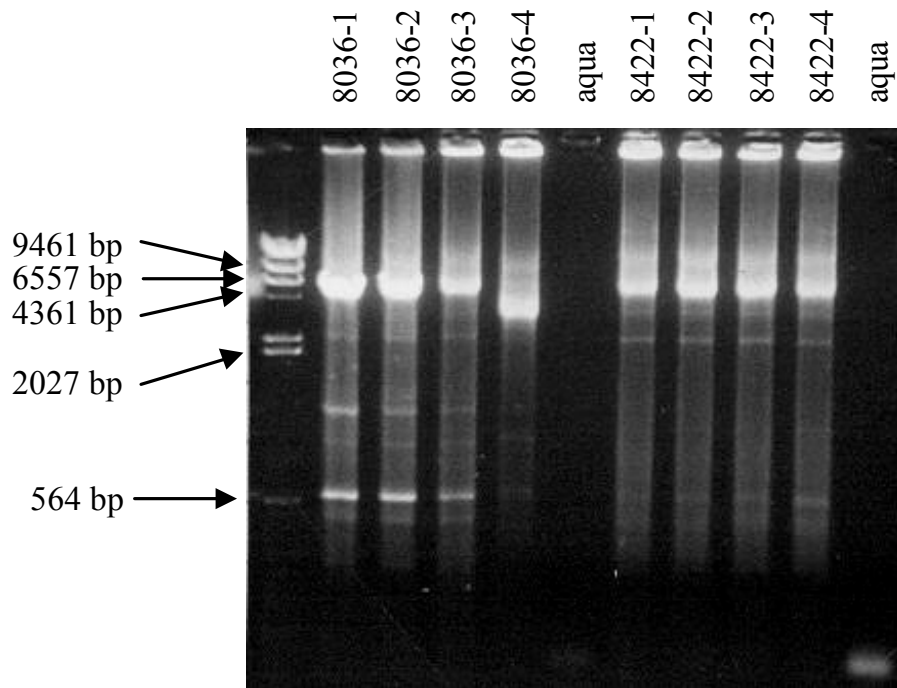


**Abb. 6.12.** Erste erfolgreiche lange PCR aus dem Patientenserum 8769. Auch hier ist wieder die starke Abhängigkeit von der Übertragenen cDNA Menge aus der RT Reaktion in die PCR I deutlich zu erkennen. 4 µl Übertrag liefert eine sehr gute Bande bei der erwarteten Länge, während bei 5 µl und mehr die Spezifität und Effizienz stark absinkt. Es wurden die Primer 8036-full-s1 und 1b-NS5B-a3 für die äussere PCR (I) sowie 8036-full-s2 und 8422-full-a1 für die innere PCR (II) verwandt.

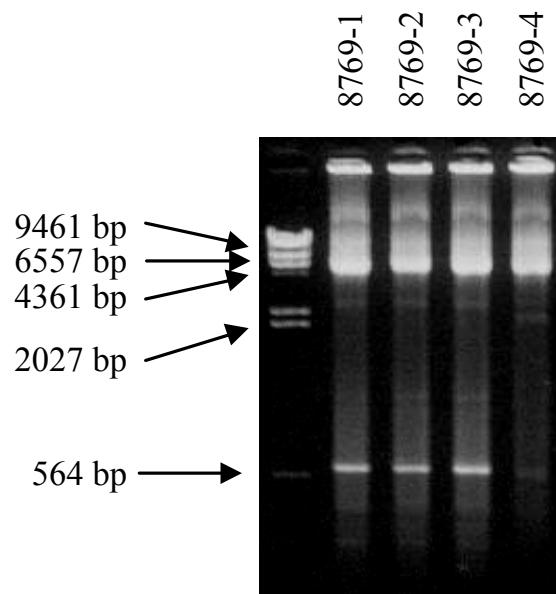
### 6.3. Erstellung der Konsensklone

#### 6.3.1. Klonierung der Lang-PCR Produkte

Die verbliebenen 45 µl der langen PCR Produkte, die in der mit Ethidiumbromid gefärbten Kontroll PCR die besten Banden geliefert hatten, wurden vollständig mittels einer mit Methylblau gefärbten, Ethidiumbromid-freien Elektrophorese aufgereinigt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA extrahiert (siehe 5.4.1). Anschliessend wurden die aufgereinigten Nukleinsäuren mit dem pCR XL-TOPO Klonierungskit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Um für spätere Versuche eine genügende Menge an Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben, wurden jeweils vier Klone gepickt und daraus Maxi Preps angefertigt. Zur Verifizierung des Klonierungserfolges wurden dann aus jedem Plasmid eine PCR angefertigt. Durch die hohe Reinheit und Konzentration der Plasmid DNA war hierbei eine einfache non-nested PCR ausreichend (Abb. 6.13 und Abb. 6.14).



**Abb. 6.13.** Kontroll PCR von jeweils vier Klonen von 8036 und 8422 aus Plasmid DNA. Im Klon 8036-4 scheint eine ca. 2000 Basen umfassende Deletion vorzuliegen. Der Klon wurde daraufhin verworfen und durch einen anderen, vollständigen ersetzt.



**Abb. 6.14.** Kontroll PCR von vier Klonen von 8769. Die Klone zeigen alle die erwartete Länge.

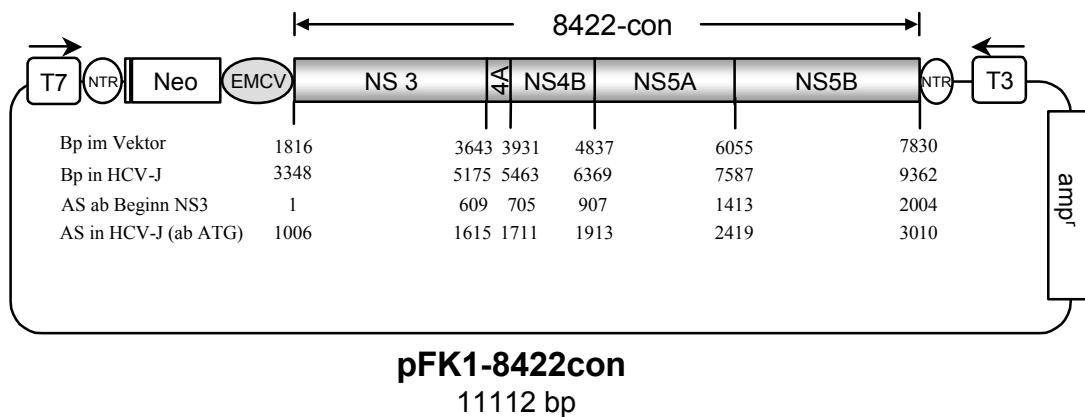
### 6.3.2. Sequenzierung der Klone und Erstellung der Konsensussequenzen

Zur Erstellung der Konsensussequenzen mussten zunächst die vier Klone aus jedem Patientenserum vollständig sequenziert werden. Dazu wurden im Abstand von ca. 300 Basenpaaren kurze Sequenzierprimer erstellt, so dass zwecks späterer Zusammenfügung mit einer sicheren Überlappung der erzeugten Sequenzen gerechnet werden konnte. Die Primer wurden dabei – genau wie bei der Erstellung der Vorprimer für die Lang-PCR – zunächst aus der Konsensussequenz der drei veröffentlichten HCV 1b Prototypen HCV J, HCV J4 und HCV con1 erstellt. Mit diesen Primern wurden dann die ersten Sequenz-PCR durchgeführt. Lücken in den Sequenzen wurden später durch neue, aus erfolgreichen Sequenzen erstellte und exakt passende Primer aufgefüllt. Teilstücke, die sich vermutlich aufgrund einer ungünstigen Sekundärstruktur des Nukleinsäurestranges an dieser Stelle auch nach mehreren Versuchen nicht sequenzieren liessen, konnten aus der anderen Leserichtung mit Hilfe eines antisense Sequenzierprimers gelesen werden.

Nachdem die komplette Basensequenz aller Klone bekannt war, wurde sie zunächst in den Aminosäurecode übersetzt und daraus nach dem Alignment die Aminosäure-Konsensussequenz erstellt. Abweichungen auf Nukleotidebene, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes keine Auswirkungen auf die Aminosäureabfolge hatten, wurden nicht berücksichtigt. Der dritte Klon aus dem Patientenserum 8422 wurde als Ausgangsbasis für die Herstellung des Konsensusklones ausgewählt, da er die geringsten Abweichungen von der gewünschten Sequenz aufwies. Insgesamt mussten sieben Änderungen an der Aminosäuresequenz vorgenommen werden, um den Konsens aus den vier Einzelklonen zu erreichen. Dazu kam noch eine stumme Änderung auf Nukleotidebene, um eine für die spätere Umklonierung in den pFK 1 Vektor wichtige *Sca I* Restriktionsenzymstrecke zu eliminieren. Die einzufügenden Mutationen wurden als Mut1 bis Mut7 bzw. Sca bezeichnet.

Die nötigen Änderungen wurden mittels der site-directed Mutagenese erzeugt. Nach jeder Mutagenese wurde das Produkt neu in TOP10 Zellen transfiziert und ein Miniprep angefertigt, aus welchem dann die nächste Mutagenese durchgeführt wurde. Nach Abschluss aller Mutagenesen wurde dann der komplette Klon erneut sequenziert, um den

Erfolg der Mutagenese zu verifizieren. Dabei ergab sich das Problem, dass bei Mut5 und Mut6 die Mutagenese zwar erfolgreich verlaufen war, also die gewünschte Basenänderung korrekt durchgeführt wurde, doch fanden sich bei der Kontrollsequenzierung ein zusätzlicher (Mut5P) bzw. sogar doppelt zusätzlicher (Mut6PP) Einbau der Mutageneseprimer. Da die Mutationen zusammen mit der *Sca* I Site jedoch günstig für eine Überlapp-PCR lagen, wurde entschieden, die Mutagenese nicht zu wiederholen, sondern die überschüssigen repetitiven Teilstücke per Überlapp-PCR und Umklonierung zu entfernen. Des weiteren war eine gänzlich neue Mutation aufgetreten, was durch die häufigen PCR nicht verwunderlich war. Auch diese Mutation wurde durch Umklonierung eines Teilstückes eines Klon, der diese neue Mutation noch nicht enthielt, wieder entfernt. Das exakte Vorgehen für den Konsensusklon von Serum 8422 ist in 5.12 beschrieben. Mit den Klonen aus dem Serum mit der Nummer 8769 wurde analog verfahren. Das Endprodukt dieser Arbeit ist in Abb. 6.15 dargestellt.



**Abb. 6.15.** Schematische Darstellung des in dieser Arbeit erzeugten pFK1-8422con Vektors. Der Vektor enthält den Konsensusklon 8422 mit den nichtstrukturellen Proteinen eines HCV 1b Non-Responders, mit vorgeschalteter EMCV-IRES und abschliessender 3' NTR, flankiert von T7/T3 Promotern. Der Klon ist in dieser Form bereit zur direkten Einbringung in Zellkultursysteme. Mit Hilfe des ebenfalls enthaltenen Neomycin-Resistenzgens (G418) können dabei replizierende Kulturen selektioniert werden. Die Schnittstellen des Polyproteins zu den einzelnen nichtstrukturellen Proteinen sind sowohl in Basenpaaren (Bp) als auch in Aminosäurezahlweise (AS) angegeben. Das Isolat des in dieser Arbeit parallel dazu erzeugten Vektors pFK1-8769con eines HCV 1b sustained Responders unterscheidet sich vom pFK1-8422con nur auf Basen- bzw. Aminosäuresequenzebene, die Vektorstruktur sowie die angegebenen Schnittstellen sind identisch. Aus diesem Grund wird auf eine weitere Abbildung verzichtet.



## 7. DISKUSSION

### 7.1. Methodik

#### 7.1.1. Lange RT-PCR

Bei der Erstellung der langen DNA Amplifikate aus extrahierter Virus RNA mittels langer RT PCR zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Effizienz der PCR vom übertragenen Volumen an Produkt aus der Reverse Transkriptase Reaktion in die erste nested PCR. Die Ergebnisse waren reproduzierbar, jedoch nicht speziell im Hinblick auf die Menge des übertragenen cDNA Volumens. Ein zweiter Reaktionsansatz aus dem selben RNA Extrakt mit identischem Protokoll brachte zwar ebenfalls positive Banden, diese wurden jedoch nicht unbedingt mit dem selben Übertragsvolumen wie in der ersten Reaktion erzeugt. Der Grund hierfür liegt vermutlich im enger werdenden Toleranzbereich des Systems bei steigender Länge des zu amplifizierenden DNA Abschnittes. Während ein suboptimales Milieu bei einer kurzen PCR noch zu kaum merklichen Einbußen der Effizienz führt, so kann es bei langen Amplifikationen zum völligen Versagen der Reaktion führen (41). Kurze Fehlamplikate können dabei die Primer binden und sie so aus dem Reaktionsgemisch entfernen, bis für die eigentlichen langen Amplifikate nicht mehr genügend vorhanden sind. Dieser Mechanismus erklärt auch die oft auftretenden unspezifischen kurzen Banden in der Elektrophorese. Je mehr Parameter sich nicht im idealen Bereich befinden, desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit für einen Misserfolg, und desto schwieriger ist es, den entscheidenden Faktor ausfindig zu machen. Um optimale Grundvoraussetzungen zu schaffen, wurden daher die Konzentrationen aller eingesetzten Reagenzien exakt bestimmt und festgelegt. Es zeigte sich, dass die Hauptunsicherheit in der RT Reaktion lag, die wiederum von der Konzentration der Virus RNA im Extrakt abhing. Diese variierte erheblich, sowohl aufgrund unterschiedlicher Viruslasten der Serumproben, als auch der schnellen Degradation der RNA während der Lagerung der Extrakte. Nicht zu unterschätzen sind sicher auch Pipettenungenauigkeiten bei Volumina im Bereich von unter zwei Mikrolitern sowie Reagenzienreste aus dem Extraktionsprozess. Tellier beschrieb in einer Studie ebenfalls die starke

Abhängigkeit der PCR von der RT-Reaktion (107), doch wurde in dieser Studie als Ausgangsmaterial ein Serumstock benutzt, dessen Titer exakt bekannt war. Dadurch liessen sich über Verdünnungsreihen die optimalen Konzentrationen finden, was hier aufgrund der immer anderen Virustiter nicht möglich war. Indirekt wurde diese Fehlerquelle auch dadurch bestätigt, dass nachfolgende PCR aus Plasmiden, deren Konzentration und Reinheit ungleich höher waren, keinerlei Problem darstellten. Da eine genaue Quantifizierung der generierten cDNA mit hohem Aufwand verbunden gewesen wäre, wurden stattdessen mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Übertragungsvolumina hergestellt und die besten Banden ausgeschnitten.

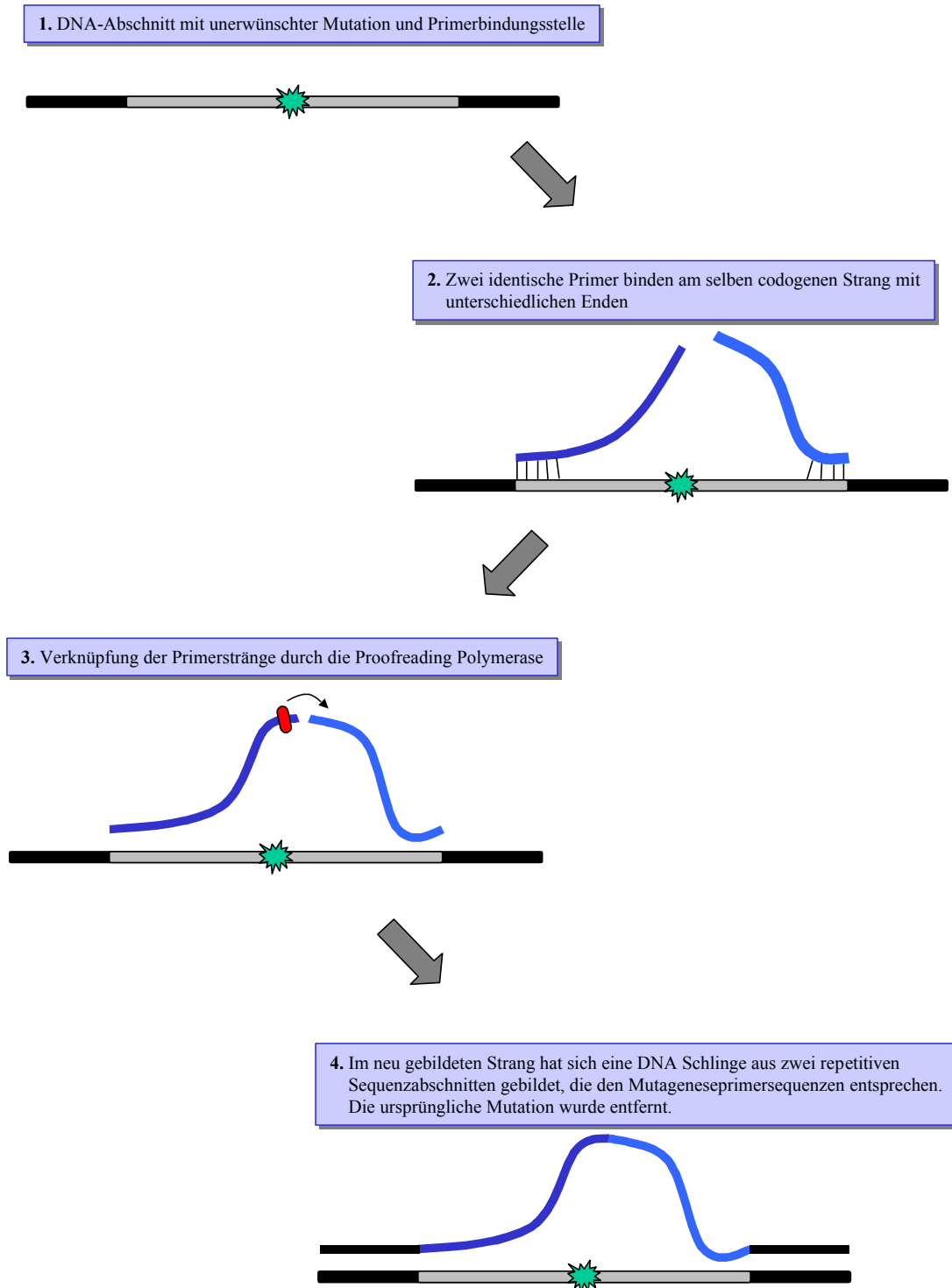
### *7.1.2. Sequenzierung*

Bei der Sequenzierung der Ausgangsklone für die Konsensussequenz kam es bei allen Isolaten an der gleichen Stelle zu einem abrupten Abbruch der Sequenz PCR. Es war trotz mehrerer unterschiedlicher Primer, die nach vorhergehenden Sequenzen exakt passend erstellt wurden, nicht möglich, diese Stelle zu sequenzieren. Ein solches Vorkommen scheinbar unüberwindlicher Bereiche in der Sequenz PCR ist häufig durch DNA Abschnitte bedingt, die eine starke Sekundärstruktur ausbilden, welche von der Polymerase nicht überwunden werden kann. Diese Sekundärstrukturen können sich prinzipiell an jeder Stelle des Nukleinsäurestranges ausbilden, jedoch treten sie gehäuft in Abschnitten auf, die sehr reich (>65%) an Guanin und Cytosin sind. Dieses Problem ist bereits gut bekannt und in mehreren anderen Arbeiten beschrieben worden. Als Lösungsvorschläge wurden einerseits eine forcierte Auffaltung der DNA durch hohe Konzentrationen an DMSO genannt (23) oder ein Aufbrechen der Sekundärstrukturen durch Fragmentation der kritischen DNA Abschnitte in kurze Teilstücke und Sequenzierung dieser (71). In der vorliegenden Arbeit gelang es, die Abschnitte unter Einsatz eines reverse Primers ohne weitere Abänderung des PCR Protokolls problemlos zu lesen. Ein besonders hoher GC Gehalt stellte sich dabei nicht heraus, so dass der Grund für die starke Sekundärstrukturbildung nicht geklärt werden konnte. Interessanterweise bereitete besagter Abschnitt bei einer Nicht-Sequenz-PCR, wie beispielsweise der langen PCR, keinerlei Probleme. Daher kommt als Ursache die Temperatur während der Expansions-

zyklen in Betracht, die bei der Sequenz-PCR 60°C, bei der Standard-PCR 72°C und bei der langen PCR 68°C betrug. Vermutlich reichte die niedrigere Temperatur der Sequenz-PCR nicht aus, eine ausreichende Auffaltung der DNA aufrecht zu erhalten. Die reverse Sequenzierung mittels eines antisense Primers kann dabei trotzdem möglich sein, da der anticodogene Strang in denaturiertem Zustand nicht zwangsläufig die gleiche Struktur ausbilden muss wie der codogene Strang.

### 7.1.3. Mutagenese

Die Ursache der bei der site-directed Mutagenese aufgetretenen Primerdoppelungen, die letztendlich zum Umschwenken auf eine Überlapp-PCR zur Mutagenese führten, konnte nicht endgültig eruiert werden. Bei einer Durchsicht der Literatur zur site-directed Mutagenese fand sich bislang keine Beschreibung dieses Problems. Auch beim Hersteller des Kits selbst waren solche Ergebnisse unbekannt. Als wahrscheinlichste Theorie kommt in Betracht, dass aufgrund der grossen Länge der Primer von bis zu 40 Basenpaaren zwei Primer gleichzeitig am selben komplementären DNA-Strang binden konnten, und zwar einer mit dem 3'-Ende, der andere mit dem 5'-Ende. Durch die proofreading-Aktivität der für die Reaktion verwandten *Pfu* Polymerase kam es dann vermutlich zu einer Reparatur des vermeintlichen „Strangbruchs“, wodurch ein Schleife (Loop) aus zwei hintereinandergeschalteten Primersequenzen entstand (Abb. 7.1). Eine Verringerung der Primerkonzentrationen hätte hier eventuell Abhilfe schaffen können, wobei jedoch die ohnehin schon geringe Ausbeute der Mutagenesen sicher noch weiter gefallen wäre. Daher und mit Blick auf die Gesamtstrategie zur Umklonierung wurde in der vorliegenden Arbeit entschieden, die Loops mittels Überlapp-PCR und Umklonierung zu entfernen.



**Abb. 7.1.** Möglicher Mechanismus der Entstehung von DNA-Schleifen durch Primerdoppelungen bei der Mutagenese PCR

#### 7.1.4. Umklonierung

Umklonierungen haben im Vergleich zu anderen Techniken zum Einbau genetischen Materials in Plasmide den Vorteil, dass dabei die Vervielfältigung der DNA zwischen den einzelnen Schritten von den die Plasmide tragenden Zellen übernommen wird. Dadurch geschieht die Amplifikation über zelleigene Polymerasesysteme, die auch effiziente Korrekturmechanismen beinhalten. Die Rate an neu eingebauten Fehlern während der Amplifikationsschritte kann so minimiert werden. Bei einer Amplifikation über PCR, wie beispielsweise der Überlapp-PCR, ist die Fehlerrate erheblich höher. Aus diesem Grund wurde für die endgültige Erstellung des Konsensusklons wo immer möglich eine Umklonierung mittels Restriktionsenzymen vorgenommen. In einem Plasmid von etwa 10 kb Grösse kommen jedoch naturgemäss sehr viele Restriktionsenzymstellen vor. Dies machte es schwierig, geeignete Klonierungsstrategien zu entwerfen. Während die Primerdoppelungen noch recht nahe beieinander lagen und damit günstige Voraussetzungen zur Umklonierung gegeben waren, war die letztendliche Umklonierung des gesamten Konsensusklons in den pFK1 Vektor deutlich schwieriger. Mehrere Strategien mit teils exotischen Restriktionsendonukleasen waren nötig, bevor die in 5.12 angegebene Strategie den Erfolg brachte.

## 7.2. Replikons

### 7.2.1. HCV vermittelte Resistenzmechanismen

Die antivirale Wirkung von Interferon  $\alpha$  wird vermittelt über einen membranständigen Rezeptor (IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor), der seinerseits über Aktivierung der Januskinase 1 (Jak1) und Signaltransduktionsfaktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT) zur Bildung des interferonstimulierten Genfaktors 3 (ISGF3) sowie von interferonregulierenden Faktoren (IRF) führt. Diese induzieren dann die Expression Interferon-induzierter Gene durch Bindung an ein interferonstimuliertes regulatorisches Element (ISRE) (21, 47).

Nach Untersuchungen, die hochsignifikante Unterschiede in den Ansprechraten verschiedener HCV Subtypen auf eine Interferon-basierte Therapie zeigten (32, 40, 66) (siehe 1.3.2), liegt die Vermutung nahe, dass diese unterschiedliche Sensitivität gegenüber Interferon (HCV 1 vs. HCV 2/3) zumindest teilweise genomisch kodiert ist und zu einer Beeinträchtigung des Interferon-Signaltransduktionsweges führt. Bereits 1995 fanden Enomoto und seine Arbeitsgruppe signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Mutationen in einem bestimmten Bereich des NS5A Proteins und dem Therapieansprechen. Diese 40 Aminosäuren umfassende Region wurde „Interferon-Sensitivität determinierende Region“ genannt (ISDR) (28, 29). Weiterführende Arbeiten identifizierten diese ISDR als Teil einer 66 Aminosäuren umfassenden, im carboxyterminalen Bereich des NS5A Proteins gelegenen Domäne, die als Bindungsstelle für eine Interferon- $\alpha$ -induzierte Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (PKR) dient. Durch Bindung an dieser Domäne des viralen NS5A Proteins kommt es zu einer Hemmung der PKR, woraus eine verminderte zelluläre Proteinbiosynthese von Interferon-stimulierten Peptiden resultiert (33, 34). Auch im Hüllprotein E2 existiert eine mit der PKR interagierende Domäne. Diese 12 Aminosäuren umfassende PKR/eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierungs-Homologie-Domäne (PePHD) führt *in vitro* bei HCV-1a/b-Isolaten ebenfalls zu einer verminderten Proteinbiosynthese, nicht jedoch bei HCV-2- oder 3-Isolaten, was als eine Ursache der erhöhten Resistenz von Subtyp-1-Isolaten gegenüber Interferon vermutet wurde (97, 105, 106). Auch die NS3/4A-Serinprotease scheint bei der Sensibilität gegenüber Interferon eine Rolle zu spielen. Hier wurde eine Hemmung der Phosphorylierung des interferonregulierenden Faktors 3 (IRF3) mit konsekutiv verminderter Expression Interferon-stimulierter Gene nachgewiesen (30). Andere Untersuchungen zu Regionen des HCV Genoms, bei denen versucht wurde, Korrelationen von Mutationen zum Therapieansprechen herzustellen, ergaben widersprüchliche Ergebnisse, die vermutlich auf regionalen Unterschieden zwischen amerikanischen, europäischen und japanischen Patienten zurückzuführen sind.

Zu bemerken ist, dass all diese Untersuchungen an klinisch uncharakterisierten Isolaten durchgeführt wurden und somit keine Aussagen darüber getroffen werden können, inwiefern die unterschiedlichen Therapieansprechraten von sustained Respondern und Non-Respondern ein- und desselben HCV Subtyps mit den oben genannten Erkenntnis-

sen zusammenhängen. Es stellt sich die Frage, ob bestimmte Mutationen innerhalb der Subtypen eine Vorhersage über den Therapieerfolg zulassen oder ob die Ursachen für Sensibilität oder Resistenz gegenüber einer Therapie überhaupt endgültig geklärt werden können. Dazu sind klinisch charakterisierte Isolate gleicher Subtypgruppen sicherlich von grosser Hilfe.

### 7.2.2. Replikonsysteme

Mit der Entdeckung der Übertragbarkeit der Non-A-non-B-Hepatitis auf Schimpansen wurde 1978 erstmals die Möglichkeit geschaffen, das bis dato unbekannte infektiöse Agens in einem replizierenden *in vivo* System zu untersuchen (45, 103). Trotz vielerlei Problemen, wie des im Vergleich zum Menschen deutlich kürzeren und benigneren Verlaufs sowie den hohen Kosten und des Aufwands der Schimpansenhaltung, führte es schliesslich zur Isolation des Hepatitis C Virus (24). Nur sehr wenige andere Tierarten lassen sich mit HCV infizieren, doch ist die Infektion nur in einem Bruchteil der Fälle überhaupt erfolgreich, und nach geglückter Infektion sind die Virustiter meist zu niedrig für eine effiziente Forschung. Daher sind Schimpansen auch heute noch unverzichtbar in der Erforschung und Erprobung von Impfstoffen, da sie die einzigen bekannten Lebewesen neben dem Menschen sind, die ohne genetische Manipulation empfänglich für eine Infektion mit HCV sind. Auch kommt es bei Schimpansen ähnlich wie beim Menschen in einem gewissen Prozentsatz zu einer Chronifizierung der Infektion mit schwankenden Virustitern ohne die Ausbildung einer suffizienten Immunantwort. Diese komplexe Reaktion des gesamten Organismus kann keine Zellkultur ersetzen.

Mäuse, als weltweit mit grossem Abstand am häufigsten genutzte Labortiere, sind für eine Infektion mit HCV vollkommen unempfindlich. Es ist jedoch gelungen, transgene Mäuse zu züchten, die bestimmte HCV Proteine exprimieren. Die Ergebnisse sind widersprüchlich, weisen aber auf eine direkte Toxizität bestimmter HCV Proteine hin, insbesondere im Zusammenhang mit der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (57, 76). In neuerer Zeit ist es auch gelungen, Mäuse mit chimären humanen Lebern zu züchten, die eine stabile Infektion mit HCV erlauben (73).

Erste Zellkultursysteme nutzten primäre, ausdifferenzierte humane Hepatozyten als Wirtszellen. Diese haben jedoch den Nachteil der schlechten Verfügbarkeit und – weit wichtiger – der begrenzten Lebensdauer. Die Entwicklung eines regulierbaren Systems in Osteosarkomzellen konnte diesen Nachteil eliminieren, doch war die Vergleichbarkeit von Osteosarkomzellen zu Hepatozyten, die *in vivo* den Hauptreplikationsort des Hepatitis C Virus darstellen, fraglich. Das erste stabil replizierende Zellkulturmodell in humanen Hepatomzellen (Huh-7) umfasste, wie auch das in dieser Arbeit erstellte Replikon, die nichtstrukturellen Gene eines HCV 1b Isolates, das allerdings nicht klinisch charakterisiert war (62). Von anderen plus-Strang RNA Viren, insbesondere Pestiviren, ist bekannt, dass die strukturellen Gene nicht für die RNA Replikation erforderlich sind (9). Der Vorteil eines Replikons der nichtstrukturellen Gene gegenüber einem – etwas später ebenfalls etablierten – full-length-Replikon inklusiver aller strukturellen Gene liegt darin, dass die Hüllproteine eine zytotoxische Komponente aufweisen, die eine längere Kultivierung oft behindert (84). Trotzdem stellt natürlich ein Replikon, welches das komplette Genom beinhaltet, ein den Umständen *in vivo* näher kommendes Modell dar.

Alle Replikonsysteme in Huh-7 Zellen haben bislang das Problem, dass die initiale Replikationseffizienz recht niedrig ist. Durch Einfügen adaptiver Mutationen konnte sie beträchtlich gesteigert werden (53, 61), doch wird dadurch die Infektiosität *in vivo* stark beeinträchtigt und damit die Übertragbarkeit auf klinische Aspekte fragwürdig. Interessanterweise wurden bei erfolgreichen Infektionen mit Isolaten, welche adaptive Mutationen enthielten, nach wenigen Tagen sogar eine spontane Rückmutation zur ursprünglichen Sequenz beobachtet (19).

### 7.2.3. Konsensussequenzen klinisch charakterisierter Isolate

Wie bereits erwähnt, existierten bislang zwar stabil und regulierbar replizierende Zellkulturmodelle des Hepatitis C Virus, doch war ihr Nutzen hauptsächlich auf präklinische Grundlagenforschung beschränkt. Durch die in dieser Arbeit generierten Replikonsysteme stehen nun klinisch klar definierte Zellkulturmodelle zur Verfügung, anhand



derer auch direkte Rückschlüsse auf das klinische Verhalten der Viren möglich sein sollten. Signifikant unterschiedliche Ansprechraten bei identischer Therapie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Mutationen im viralen Erbgut zurückzuführen, die das Virus zu unterschiedlicher Resistenz gegenüber einer antiviralen Therapie befähigen. Durch replikative Zellkulturmodelle aus dem Serum von Patienten mit bekanntem Therapie-Ansprechverhalten unter Studienbedingungen kann nun gezielt nach diesen Unterschieden gesucht werden. Wie in 7.2.1 dargelegt, wurden in vorhergehenden Untersuchungen bereits Hinweise auf Mutationen in bestimmten Regionen gefunden, die mit der Sensitivität des Virus gegenüber einer Interferon basierten Therapie korrelieren. Jedoch ist zu beachten, dass diese Untersuchungen nicht auf Konsensussequenzen basierten, sondern auf Sequenzen, die direkt aus Patientenserum extrahierter Virus RNA erstellt wurden. Auch wurde keine Lang-PCR mittels einer proofreading Polymerase durchgeführt, sondern viele kurze, sich überlappende herkömmliche PCR mit einer *Taq* Polymerase, was die Gefahr von artifiziellen Amplifikationsmutationen birgt.

Jedoch ist auch bei den in dieser Arbeit neu generierten, definierten Replikons zu beachten, dass sie niemals exakt der im Patienten zirkulierenden Population an Viruspartikeln entsprechen können. Wie bereits erwähnt, besteht durch die hohe Mutationsrate des Hepatitis C Virus *in vivo* niemals eine Infektion mit einer Reinkultur an genetisch identischen Erregern, sondern es bildet sich eine Population aus Quasispezies (67, 80, 100, 120). Eine Quasispezies entsteht durch kleine, zufällige Mutationen im Erbgut, die nicht stark genug sind, eine eigene Spezies zu definieren, jedoch sehr unterschiedliche Auswirkungen haben können. So sind die meisten Mutationen selbstlimitierend, da sie wichtige Schlüsselenzyme verändern und eine weitere Replikation des Virus unmöglich machen. Andere jedoch können evolutionäre Vorteile im Sinne von Resistenzen bedeuten. Durch die Immunreaktion des Patienten, die meist nicht stark genug ist, das Virus komplett zu eliminieren, entsteht ein natürlicher Selektionsdruck, der die Chronifizierung der Infektion begünstigt. Unter antiviraler Therapie erhöht sich dieser Selektionsdruck noch und bedingt eine weitere Drift der Quasispeziespopulation (118).

Aus diesem Grund muss für die Herstellung von Replikonsystemen auf Konsensusklone zurückgegriffen werden. Ob solch eine „Durchschnittssequenz“ der häufigsten Quasi-

spezies tatsächlich auch einen Durchschnitt der Haupteigenschaften – insbesondere des Ansprechverhaltens auf eine antivirale Therapie – darstellt, ist nicht geklärt. Dagegen spricht, dass bereits einzelne Punktmutationen eine Veränderung des Translationsverhaltens und / oder des posttranslationellen Processings bewirken können. Ausserdem wären für eine statistisch gesicherte Konsensussequenz eine extrem hohe Anzahl an Einzelklonen als Ausgangssequenzen vonnöten, was aus rein technischen Gründen bislang unmöglich erscheint. Die in dieser Arbeit zugrundeliegenden vier Einzelklone, aus denen der Konsens erstellt wurde, müssen daher als Kompromiss gesehen werden. Einerseits sollte verhindert werden, zufällig eine eher seltene, womöglich sogar defiziente Quasispezies als Ausgangssequenz herzunehmen, andererseits sollte der Aufwand vertretbar bleiben. Hinzu kommt, dass die Replikationseffizienz der bislang verfügbaren Replikons sehr niedrig war und sich erst durch adaptive Mutationen steigern liess (7, 59, 61). Diese Adaptierungen an die Wirtszellen sind ebenfalls kritisch zu betrachten, da dadurch die letztendlich replizierenden Sequenzen des Virusgenoms nicht mehr der Konsensussequenz entsprechen. Ob diese Adaptationsmutationen in den in dieser Arbeit erstellten Klonen ebenfalls nötig sein werden, bleibt zunächst abzuwarten. Ein grosser Vorteil der Konsensussequenz ist auch, dass zufällige, während der Amplifikation der DNA aufgetretene Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Konsens ausgeschlossen werden.

Als Ausgangsmaterial zur Erstellung der Replikons wurden Serumproben herangezogen, die vor Beginn der Therapie asserviert wurden, um die ursprünglichen Unterschiede der Isolate von sustained Respondern zu Non-Respondern zu erfassen. Unter Interferon-basierter Therapie aufgetretene adaptive Mutationen, die zu einem veränderten Ansprechen auf die Therapie geführt haben, sind daher nicht nachweisbar. Da solche adaptiven Mutationen theoretisch rein zufällig in jedem Isolat entstehen können, kann es durchaus sein, dass trotz klinischer Charakterisierung kein Unterschied in den Replikons bezüglich ihrer Interferon-Sensitivität nachweisbar ist, da diese Unterschiede zum Zeitpunkt der Extraktion aus dem Serum noch gar nicht vorhanden waren. Andererseits muss ebenfalls die Möglichkeit bedacht werden, dass während der Amplifikationsschritte, die vor der ersten kompletten Sequenzierung durchgeführt wurden, solche Mutationen zufällig entstanden oder auch ausgelöscht worden sein können. Auch ein langes

Bestehen eines Replikons in Zellkultur führt trotz der zelleigenen Reparaturmechanismen mit der Zeit zu Mutationen des Replikons. Kato et al. konnten zeigen, dass die Mutationsrate eines HCV Replikons in Huh-7 Zellen  $3 \cdot 10^{-3}$  pro Jahr beträgt (50). Dabei lassen sich zwar dynamische Anpassungsprozesse gut beobachten, doch eine Untersuchung der Ausgangssituation wird dadurch erschwert.

Trotzdem stellen die hier generierten Replikons erstmalig eine Möglichkeit dar, *in vitro* nach Ursachen für ein unterschiedliches Therapieansprechen einer HCV 1b Infektion bei identischem Therapieregime zu forschen und damit eventuell neue Ansätze in der Therapie zu finden. Mit der Generierung weiterer definierter Zellkultursysteme anderer Hepatitis C Genotypen wird es dann auch möglich werden, nach den Gründen für das generell sehr unterschiedliche Verhalten der Genotypen untereinander bei antiviraler Therapie zu suchen. Foy et al. konnten mit Hilfe eines (nicht klinisch charakterisierten) Zellkultursystems zeigen, dass virale Proteine direkt in die zelleigene antivirale Signalkaskade eingreifen und so eine Interferonresistenz erzeugen können (30). Diese Mechanismen an Isolaten von sustained Respondern und Non-Respondern zu untersuchen, könnte eventuell entscheidende Unterschiede zutage fördern.

Darüber hinaus können klinisch charakterisierte Isolate von grossem Nutzen sein bei der Untersuchung von Fragestellungen hinsichtlich weiterer vermutlich virusbedingter Veränderungen, wie zum Beispiel der Kryoglobulinämie oder anderer HCV-assoziiierter Autoimmunerkrankungen (94). Auch Untersuchungen zur Replikationseffizienz und Viruskinetik vor sowie unter Therapie könnten im Vergleich sustained Responder / Non-Responder neue Aufschlüsse geben.

Unabhängig von der Forschung zur Interferonwirkung und –resistenzmechanismen bieten definierte Zellkulturmodelle auch einen grossen Vorteil bei der Erprobung anderer, direkt antiviral wirksamer Substanzen. Durch die einfache Handhabung von Zellkulturmodellen können erstmals Grossversuchsreihen zur Findung von neuen Virustatika gegen das Hepatitis C Virus durchgeführt werden, die vormals nur an aufwändigen Tiermodellen oder an nicht-HCV-Zellkulturmodellen (mit zweifelhafter Übertragbarkeit) vorgenommen werden konnten.

## **8. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY**

### **8.1. Zusammenfassung**

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist Auslöser einer oftmals chronisch verlaufenden Leberentzündung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und deren Folgen. Die weltweite Prävalenz der Hepatitis C beträgt ca. 3%; allein in Deutschland treten jährlich mehr als 5000 Neuinfektionen auf. Das HCV lässt sich aufgrund phylogenetischer Untersuchungen in mindestens 6 Genotypen und jeweils mehrere Subtypen einteilen, wobei der HCV Subtyp 1b in Europa am häufigsten vorkommt. Die Hepatitis C Forschung wurde lange Zeit durch das Fehlen eines geeigneten Zellkulturmodells erschwert. Mit der Etablierung eines stabil replizierenden Zellkulturmodells in humanen Hepatomazellen 1999 durch Lohmann et al. wurden erstmals molekularbiologische Untersuchungen in grossem Umfang möglich. Die seither existierenden Zellkulturmodelle haben jedoch den Nachteil, dass nicht definiert ist, wie sich das Isolat, aus dem das Replikon geschaffen wurde, klinisch verhält. Unter einer Interferonbasierten Therapie sprechen manche Patienten mit einer dauerhaften Negativierung der HCV RNA Konzentration an (sustained responder, SR), während bei anderen sowohl während als auch nach Therapieende weiterhin HCV RNA im Blut nachweisbar ist (non-responder, NR), obwohl beide Patienten mit demselben Subtyp von HCV infiziert sind und dieselbe Therapie erhalten. Die Ursachen für dieses unterschiedliche Therapieansprechen sind basierend auf Mutationsstudien von HCV Isolaten von Patienten mit unterschiedlichem Therapieansprechen zumindest teilweise genomisch bedingt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Konsensusklone zur Einbringung in ein replikatives Zellkulturmodell aus HCV Subtyp 1b Isolaten geschaffen, deren klinisches Verhalten unter Therapie klar charakterisiert ist. Dazu wurde Serum von je einem Patienten herangezogen, der unter definierten Studienbedingungen als SR oder NR bekannt war. Aus den Sera wurde die Virus-RNA extrahiert und mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten RT-PCR-Protokolls und anschließender Klonierung in *E. coli* vervielfältigt. Um zufällige Mutationen und seltene Quasispezies auszuschließen, wurde dann nach vollständiger Sequenzierung von jeweils vier Einzelklonen mittels gezielter Mutagenese

und Umklonierung eine Konsensussequenz geschaffen, die einen Durchschnitt der am häufigsten vorkommenden Quasispezies darstellt. Diese Konsensusklone wurden in einen Vektor zur Herstellung von RNA Transkripten eingefügt, so dass die Transkripte direkt zur Einbringung als Replikons in Zellkulturen genutzt werden können. Mit diesen klinisch charakterisierten Isolaten kann nun erstmals nach Unterschieden geforscht werden, die ursächlich für Therapieerfolg oder –misserfolg sein könnten. So können eventuell neue Therapieformen gefunden oder bereits vor Beginn einer Therapie eine Aussage zur Prognose getroffen werden.

## 8.2. *Summary*

Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the major causes of chronic liver disease, leading to liver cirrhosis and its sequelae. Worldwide the prevalence of positive HCV antibodies is approximately 3%. In Germany more than 5,000 new HCV infections per year are recorded. By phylogenetic sequence analyses HCV isolates can be divided into at least six genotypes and multiple subtypes. In Europe, HCV subtype 1b is most prevalent. Molecular and pharmacological studies on hepatitis C virus have been hampered for many years due to the lack of an efficient cell culture model. In 1999 a stable replicating cell culture model based on a human hepatoma cell line was established by Lohmann et al. However, all different HCV isolates for replication in this replicating cell culture model lack information about epidemiological, virological and therapeutic features of the patients they were originally isolated from. Interferon alpha-based therapy in some patients is leading to sustained virologic response (SR) with undetectable HCV RNA at the end of treatment and during follow up, while in other patients HCV RNA remains detectable in blood during and after treatment (non responders, NR), although patients are infected with the same HCV subtype and received the identical treatment schedules. Based on mutational analyses of HCV isolates of patients with and without virologic response to interferon-based therapies these differences are at least in part explained by HCV genomic mutations. Therefore in the present study, two clinical characterized HCV subtype 1b consensus clones were produced for cell culture replication. Pre-treatment serum samples of patients known as SR or NR were used to ex-

tract viral RNA for amplification by a newly established special long-RT-PCR protocol. Four single clones were respectively selected and fully sequenced. To eliminate the risk of random mutations and potentially replicational deficient isolates of HCV quasispecies, a consensus sequence was generated using site-directed mutagenesis and different cloning procedures. Consensus clones of NR and SR isolates were then introduced into a special vector for production of RNA transcripts and transfection to human hepatoma cells. With these clinical characterized HCV consensus isolates it is possible for the first time to investigate genomic differences causing treatment response or non response *in vitro*. On the basis of observed differences between interferon-sensitive and -resistant HCV isolates new antiviral therapies may be observed and a more refined prediction of treatment response before initiation of therapy may be possible.

**9. LITERATUR**

1. Hepatitis C--global prevalence (update). *Wkly.Epidemiol.Rec.* 2000; 75: 18-19.
2. Alter, M. J., Margolis, H. S., Krawczynski, K., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Gerber, M. A., Sampliner, R. E., and . The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N.Engl.J.Med.* 1992; 327: 1899-1905.
3. Attatippaholkun, W. H., Attatippaholkun, M. K., Nisalak, A., Vaughn, D. W., and Innis, B. L. A novel method for the preparation of large cDNA fragments from dengue-3 RNA genome by long RT-PCR amplification. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 2000; 31 Suppl 1: 126-133.
4. Bartenschlager, R. The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J.Viral Hepat.* 1999; 6: 165-181.
5. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J.Virol.* 1993; 67: 3835-3844.
6. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J.Virol.* 1994; 68: 5045-5055.
7. Bartenschlager, R., Kaul, A., and Sparacio, S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res.* 2003; 60: 91-102.
8. Bartenschlager, R. and Lohmann, V. Replication of hepatitis C virus. *J.Gen.Virol.* 2000; 81: 1631-1648.

9. Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G., and Tautz, N. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J.Virol.* 1998; 72: 2364-2372.
10. Berg, T., Hopf, U., Stark, K., Baumgarten, R., Lobeck, H., and Schreier, E. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *J.Hepatol.* 1997; 26: 484-491.
11. Blatt, L. M., Mutchnick, M. G., Tong, M. J., Klion, F. M., Lebovics, E., Freilich, B., Bach, N., Smith, C., Herrera, J., Tobias, H., Conrad, A., Schmid, P., and McHutchison, J. G. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J.Viral Hepat.* 2000; 7: 196-202.
12. Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., and Rice, C. M. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J.Virol.* 2003; 77: 3181-3190.
13. Blight, K. J., McKeating, J. A., and Rice, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J.Virol.* 2002; 76: 13001-13014.
14. Blumberg, B. S. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* 1977; 197: 17-25.
15. Boulant, S., Becchi, M., Penin, F., and Lavergne, J. P. Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 45785-45792.
16. Boulestin, A., Sandres-Saune, K., Payen, J. L., Rostaing, L., Pasquier, C., and Izopet, J. Genetic heterogeneity of the NS5A gene of hepatitis C virus and early response to interferon-alpha. *J.Infect.Dis.* 2003; 188: 1367-1370.



17. Bradley, D. W. Studies of non-A, non-B hepatitis and characterization of the hepatitis C virus in chimpanzees. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 1-23.
18. Büchen-Osmond, C. *Flaviviridae.* 2003
19. Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M., and Bartenschlager, R. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99: 14416-14421.
20. Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R. H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 8234-8238.
21. Caraglia, M., Marra, M., Pelaia, G., Maselli, R., Caputi, M., Marsico, S. A., and Abbruzzese, A. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J.Cell Physiol* 2005; 202: 323-335.
22. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., and Higuchi, R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91: 5695-5699.
23. Choi, J. S., Kim, J. S., Joe, C. O., Kim, S., Ha, K. S., and Park, Y. M. Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template. *Exp.Mol.Med.* 1999; 31: 20-24.
24. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
25. Cline, J., Braman, J. C., and Hogrefe, H. H. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 3546-3551.

26. Dumoulin, F. L., von dem, Bussche A., Li, J., Khamzina, L., Wands, J. R., Sauerbruch, T., and Spengler, U. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 2003; 305: 260-266.
27. Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P. L., Sherlock, S., McIntyre, N., and Simmonds, P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19: 13-18.
28. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J.Clin.Invest* 1995; 96: 224-230.
29. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N.Engl.J.Med.* 1996; 334: 77-81.
30. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M., and Gale, M., Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; 300: 1145-1148.
31. Friebe, P. and Bartenschlager, R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J.Virol.* 2002; 76: 5326-5338.
32. Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., and Yu, J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N.Engl.J.Med.* 2002; 347: 975-982.

33. Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., and Katze, M. G. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol.Cell Biol.* 1998; 18: 5208-5218.
34. Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R., and Katze, M. G. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; 230: 217-227.
35. Gerlach, J. T., Diepolder, H. M., Jung, M. C., Gruener, N. H., Schraut, W. W., Zachoval, R., Hoffmann, R., Schirren, C. A., Santantonio, T., and Pape, G. R. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 117: 933-941.
36. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J.Virol.* 1993; 67: 1385-1395.
37. Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., and Rowlands, D. J. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003; 535: 34-38.
38. Grobler, J. A., Markel, E. J., Fay, J. F., Graham, D. J., Simcoe, A. L., Ludmerer, S. W., Murray, E. M., Migliaccio, G., and Flores, O. A. Identification of a key determinant of hepatitis C virus cell culture adaptation in domain II of NS3 helicase. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 16741-16746.
39. Gurtler, L. [Hepatitis C in Germany. More than 5000 new infections annually]. *MMW.Fortschr.Med.* 2002; 144: 26-28.

40. Hadziyannis, S. J., Sette, H., Jr., Morgan, T. R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H., Jr., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P. J., Lin, A., and Ackrill, A. M. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann.Intern.Med.* 2004; 140: 346-355.
41. Harris, S. and Jones, D. B. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br.J.Biomed.Sci.* 1997; 54: 166-173.
42. Herrmann, E. and Sarrazin, C. [Hepatitis C-virus --virus kinetics and resistance mechanisms]. *Z.Gastroenterol.* 2004; 42: 387-396.
43. Hofmann, W. P., Herrmann, E., Kronenberger, B., Merkwirth, C., Welsch, C., Lengauer, T., Zeuzem, S., and Sarrazin, C. Association of HCV-related mixed cryoglobulinemia with specific mutational pattern of the HCV E2 protein and CD81 expression on peripheral B lymphocytes. *Blood* 2004; 104: 1228-1229.
44. Hofmann, W. P., Sarrazin, C., Kronenberger, B., Schonberger, B., Bruch, K., and Zeuzem, S. Mutations within the CD81-binding sites and hypervariable region 2 of the envelope 2 protein: correlation with treatment response in hepatitis C virus-infected patients. *J.Infect.Dis.* 2003; 187: 982-987.
45. Hollinger, F. B., Gitnick, G. L., Aach, R. D., Szmunes, W., Mosley, J. W., Stevens, C. E., Peters, R. L., Weiner, J. M., Werch, J. B., and Lander, J. J. Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology* 1978; 10: 60-68.
46. Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y., and Jones, E. A. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N.Engl.J.Med.* 1986; 315: 1575-1578.

47. Horvath, C. M. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon alpha or interferon beta. *Sci.STKE*. 2004; 2004: tr10.
48. Ikeda, M., Yi, M., Li, K., and Lemon, S. M. Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J.Virol.* 2002; 76: 2997-3006.
49. Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; 87: 9524-9528.
50. Kato, N., Nakamura, T., Dansako, H., Namba, K., Abe, K., Nozaki, A., Naka, K., Ikeda, M., and Shimotohno, K. Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. *J.Gen.Virol.* 2005; 86: 645-656.
51. Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J.Virol.* 1994; 68: 4776-4784.
52. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., and Wakita, T. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 2003; 125: 1808-1817.
53. Krieger, N., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J.Virol.* 2001; 75: 4614-4624.
54. Kurosaki, M., Enomoto, N., Marumo, F., and Sato, C. Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology* 1993; 18: 1293-1299.

55. Lai, M. M. and Ware, C. F. Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 117-134.
56. Lee, K. J., Choi, J., Ou, J. H., and Lai, M. M. The C-terminal transmembrane domain of hepatitis C virus (HCV) RNA polymerase is essential for HCV replication in vivo. *J.Virol.* 2004; 78: 3797-3802.
57. Lerat, H., Honda, M., Beard, M. R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S. Y., Weinman, S. A., and Lemon, S. M. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2002; 122: 352-365.
58. Liu, C., Chopra, R., Swanberg, S., Olland, S., O'Connell, J., and Herrmann, S. Elongation of synthetic RNA templates by hepatitis C virus NS5B polymerase. *J.Biol.Chem.* 2004; 279: 10738-10746.
59. Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and Bartenschlager, R. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J.Virol.* 2003; 77: 3007-3019.
60. Lohmann, V., Koch, J. O., and Bartenschlager, R. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J.Hepatol.* 1996; 24: 11-19.
61. Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A., and Bartenschlager, R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J.Virol.* 2001; 75: 1437-1449.
62. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110-113.

63. Lohmann, V., Roos, A., Korner, F., Koch, J. O., and Bartenschlager, R. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J.Viral Hepat.* 2000; 7: 167-174.
64. Lundin, M., Monne, M., Widell, A., Von Heijne, G., and Persson, M. A. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J.Virol.* 2003; 77: 5428-5438.
65. Major, M. E. and Feinstone, S. M. Characterization of hepatitis C virus infectious clones in chimpanzees: long-term studies. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 279-298.
66. Manns, M. P., McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Rustgi, V. K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z. D., Koury, K., Ling, M., and Albrecht, J. K. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965.
67. Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J.Virol.* 1992; 66: 3225-3229.
68. Martinez, J. M., Breidenbach, H. H., and Cawthon, R. Long RT-PCR of the entire 8.5-kb NF1 open reading frame and mutation detection on agarose gels. *Genome Res.* 1996; 6: 58-66.
69. McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S., and Albrecht, J. K. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N.Engl.J.Med.* 1998; 339: 1485-1492.

70. McMahon, B. J., Hennessy, T. W., Christensen, C., Bruden, D., Sullivan, D. G., Homan, C., Deubner, H., Bruce, M. G., Livingston, S., Williams, J., and Gretch, D. R. Epidemiology and risk factors for hepatitis C in Alaska Natives. *Hepatology* 2004; 39: 325-332.
71. McMurray, A. A., Sulston, J. E., and Quail, M. A. Short-insert libraries as a method of problem solving in genome sequencing. *Genome Res.* 1998; 8: 562-566.
72. Mellor, J., Walsh, E. A., Prescott, L. E., Jarvis, L. M., Davidson, F., Yap, P. L., and Simmonds, P. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in South-east Asia by using a core-based genotyping assay. *J.Clin.Microbiol.* 1996; 34: 417-423.
73. Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., and Kneteman, N. M. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat.Med.* 2001; 7: 927-933.
74. Moradpour, D., Kary, P., Rice, C. M., and Blum, H. E. Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* 1998; 28: 192-201.
75. Moretti, T., Koons, B., and Budowle, B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 1998; 25: 716-722.
76. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat.Med.* 1998; 4: 1065-1067.



77. Njouom, R., Pasquier, C., Ayouba, A., Gessain, A., Froment, A., Mfoupouendoun, J., Pouillot, R., Dubois, M., Sandres-Saune, K., Thonnon, J., Izopet, J., and Nerrienet, E. High rate of hepatitis C virus infection and predominance of genotype 4 among elderly inhabitants of a remote village of the rain forest of South Cameroon. *J.Med.Virol.* 2003; 71: 219-225.
78. Nolte, F. S. Hepatitis C virus genotyping: clinical implications and methods. *Mol.Diagn.* 2001; 6: 265-277.
79. Ogata, N., Alter, H. J., Miller, R. H., and Purcell, R. H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991; 88: 3392-3396.
80. Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S., Yoshizawa, H., Iizuka, H., Tanaka, T., Muchmore, E. E., Peterson, D. A., Ito, Y., and Mishiro, S. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 1992; 190: 894-899.
81. Pavlovic, D., Neville, D. C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R. A., Fischer, W. B., and Zitzmann, N. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; 100: 6104-6108.
82. Pawlotsky, J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004; 12: 96-102.
83. Piccininni, S., Varaklioti, A., Nardelli, M., Dave, B., Raney, K. D., and McCarthy, J. E. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J.Biol.Chem.* 2002; 277: 45670-45679.

84. Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J.Virol.* 2002; 76: 4008-4021.
85. Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C., and Albrecht, J. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352: 1426-1432.
86. Preugschat, F., Averett, D. R., Clarke, B. E., and Porter, D. J. A steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J.Biol.Chem.* 1996; 271: 24449-24457.
87. Purcell, R. H. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993; 104: 955-963.
88. Reed, K. E. and Rice, C. M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 55-84.
89. Rijnbrand, R. C. and Lemon, S. M. Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 85-116.
90. Roingard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D., and Ait-Goughoulte, M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol.Cell* 2004; 96: 103-108.
91. Ross, R. S., Viazov, S., Renzing-Kohler, K., and Roggendorf, M. Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *J.Med.Virol.* 2000; 60: 122-125.

92. Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., and . Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; 87: 6547-6549.
93. Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; 100: 11646-11651.
94. Sansonno, D. and Dammacco, F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect.Dis.* 2005; 5: 227-236.
95. Sarrazin, C., Berg, T., Lee, J. H., Ruster, B., Kronenberger, B., Roth, W. K., and Zeuzem, S. Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J.Infect.Dis.* 2000; 181: 432-441.
96. Sarrazin, C., Berg, T., Lee, J. H., Teuber, G., Dietrich, C. F., Roth, W. K., and Zeuzem, S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J.Hepatol.* 1999; 30: 1004-1013.
97. Sarrazin, C., Bruckner, M., Herrmann, E., Ruster, B., Bruch, K., Roth, W. K., and Zeuzem, S. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 2001; 289: 150-163.
98. Sarrazin, C., Herrmann, E., Bruch, K., and Zeuzem, S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J.Virol.* 2002; 76: 11079-11090.

99. Sarrazin, C., Kornetzky, I., Ruster, B., Lee, J. H., Kronenberger, B., Bruch, K., Roth, W. K., and Zeuzem, S. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000; 31: 1360-1370.
100. Simmonds, P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21: 570-583.
101. Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., and Urdea, M. S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J.Gen.Virol.* 1993; 74 ( Pt 11): 2391-2399.
102. Smuts, H. E. and Kannemeyer, J. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. *J.Clin.Microbiol.* 1995; 33: 1679-1681.
103. Tabor, E., Gerety, R. J., Drucker, J. A., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H., Jackson, D. R., April, M., Barker, L. F., and Pineda-Tamondong, G. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* 1978; 1: 463-466.
104. Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., and Hotta, H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J.Gen.Virol.* 2004; 85: 959-969.
105. Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., and Lai, M. M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999; 285: 107-110.
106. Taylor, D. R., Tian, B., Romano, P. R., Hinnebusch, A. G., Lai, M. M., and Mathews, M. B. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J.Virol.* 2001; 75: 1265-1273.

107. Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S. U., Miller, R. H., and Purcell, R. H. Long PCR and its application to hepatitis viruses: amplification of hepatitis A, hepatitis B, and hepatitis C virus genomes. *J.Clin.Microbiol.* 1996; 34: 3085-3091.
108. Theodore, D. and Fried, M. W. Natural history and disease manifestations of hepatitis C infection. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 43-54.
109. Thomas, D. L. Hepatitis C epidemiology. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2000; 242: 25-41.
110. Van Pelt, J. F., Severi, T., Crabbe, T., Eetveldt, A. V., Verslype, C., Roskams, T., and Fevery, J. Expression of hepatitis C virus core protein impairs DNA repair in human hepatoma cells. *Cancer Lett.* 2004; 209: 197-205.
111. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D., Carsten, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. *Virus Taxonomy.* 2000: 867-878.
112. Vassilaki, N. and Mavromara, P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 40503-40513.
113. Waller, C. F., Dennebaum, G., Feldmann, C., and Lange, W. Long-template DNA polymerase chain reaction for the detection of the bcr/abl translocation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Clin.Cancer Res.* 1999; 5: 4146-4151.
114. Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., Crawford, K. A., and . Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; 89: 3468-3472.

115. Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J., and Ou, J. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 2001; 20: 3840-3848.
116. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., and Kohara, M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J.Virol.* 1998; 72: 6048-6055.
117. Zekri, A. R., Bahnassy, A. A., Ramadan, A. S., El Bassuoni, M., Badran, A., and Madwar, M. A. Hepatitis C virus genotyping versus serotyping in Egyptian patients. *Infection* 2001; 29: 24-26.
118. Zeuzem, S. Hepatitis C virus: kinetics and quasispecies evolution during anti-viral therapy. *Forum (Genova.)* 2000; 10: 32-42.
119. Zeuzem, S., Feinman, S. V., Rasenack, J., Heathcote, E. J., Lai, M. Y., Gane, E., O'Grady, J., Reichen, J., Diago, M., Lin, A., Hoffman, J., and Brunda, M. J. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N.Engl.J.Med.* 2000; 343: 1666-1672.
120. Zeuzem, S., Roth, W. K., and Herrmann, G. [Viral hepatitis C]. *Z.Gastroenterol.* 1995; 33: 117-132.
121. Zeuzem, S., Teuber, G., Lee, J. H., Ruster, B., and Roth, W. K. Risk factors for the transmission of hepatitis C. *J.Hepatol.* 1996; 24: 3-10.
122. Zhu, Q., Guo, J. T., and Seeger, C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J.Virol.* 2003; 77: 9204-9210.

## ***10. ANHANG***

### **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Privatdozent Dr. med. Christoph Sarrazin, der mich zu jeder Zeit hervorragend unterstützt hat, immer ein offenes Ohr für grosse wie kleine Probleme hatte, neuen Vorschlägen und Ideen nie abgeneigt war und mir darüberhinaus auch ausserhalb des Labors stets zur Seite stand.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. med. Stefan Zeuzem, der mich in seiner Arbeitsgruppe äusserst freundlich willkommen hiess und Labore und Gerätschaften zur Verfügung stellte.

Ebenfalls vielen Dank an den Direktor der Klinik Prof. Dr. med. Wolfgang Caspary für die freundliche Überlassung der Thematik.

Ein besonders grosses Dankeschön gilt allen Mitarbeitern im Labor, vor allem Katharina Bruch, Barbara Schönberger, Sandra Paßmann und Dr. rer. nat. Brigitte Rüster, ohne die ich sicherlich das eine oder andere Mal im Labor verzweifelt wäre und ohne die die Arbeit nicht halb so viel Spass bereitet hätte.

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **„Generierung von Konsensusklonen für die Etablierung eines Replikonsystems nach Amplifikation klinisch charakterisierter Hepatitis C Virus Isolate“**

in der Medizinischen Klinik II / Gastroenterologie und Hepatologie unter Betreuung und Anleitung von Privatdozent Dr. med. Christoph Sarrazin ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Im Rahmen der Dissertation ist folgende Publikation erschienen:

Sarrazin, C., **Bruckner, M.**, Herrmann, E., Ruster, B., Bruch, K., Roth, W. K., and Zeuzem, S. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology* 2001; 289: 150-163.

Frankfurt am Main, im. November 2005





## Curriculum vitae

*Markus Erwin Bruckner*

*geboren am 29. Dezember 1975 in Istanbul*

- Staatsangehörigkeit: *deutsch*
- Familienstand: *ledig*
- Eltern: *Ute Bruckner, Hausfrau*  
*Helmut Bruckner, Diplom-Chemiker*
- Geschwister: *Bettina Rinck, Diplom-Volkswirtin*
- Schulausbildung: *Grundschule Neu-Isenburg 1982 - 1986*  
*Heinrich-von-Gagern-Gymnasium Frankfurt am Main 1986 - 1993*  
*Freiherr-vom-Stein-Schule Frankfurt am Main 1993 - 20.06.1995*
- Wehrdienst: *Fallschirmjägerbattalion 251, Calw 01.07.1995 – 30.04.1996*
- Studium: *Humanmedizin, Universität Frankfurt am Main 01.10.1996 - 2003*
- Famulaturen: *Orthopädische Universitätsklinik (Stiftung Friedrichsheim) Frankfurt am Main 1999*  
*Medizinische Klinik II / Gastroenterologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main 2000*  
*Infraserv GmbH & Co Höchst KG, Arbeitsmedizinisches Zentrum, Industriepark Hoechst, Frankfurt am Main 2001*  
*Abt. für Gynäkologie und Geburtshilfe, St.-Markus-Krankenhaus, Frankfurt am Main 2001*  
*Medizinische Klinik II / Ambulanz, Universitätsklinikum Frankfurt am Main 2001*

Praktisches Jahr: *Chirurgie am Kantonalen Spital Sursee-Wolhusen, Sursee, Schweiz*  
*29.04. - 18.08.2002*  
*Innere Medizin am Universitätsklinikum Frankfurt am Main*  
*19.08. - 08.12.2002*  
*Anaesthesiologie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main*  
*09.12.2002 - 30.03.2003*

Ärztliche Prüfung: *Frankfurt am Main, 13.05.2003 mit der Gesamtnote sehr gut (1,00)*

Klinische Tätigkeit: *seit 01.09.2003 an der Klinik für Anaesthesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universitätskliniken Frankfurt am Main*

Zusatzqualifikation: *Fachkundenachweis „Rettungsdienst“ 27.01.2005*

*Carsten Bode*