

# Untersuchungen zur Tumor Pathogenese des Hepatitis C Virus

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Brigitte Inge Rüster  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 1998

Teile dieser Arbeit wurden unter den folgenden Titeln veröffentlicht:

- Zeuzem S., Rüster B., Roth W. K.** Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay (Amplicor™ HCV) for detection of hepatitis C virus. *Z. Gastroenterol.* 1994, 32: 342 - 347
- Rüster B., Zeuzem S., Roth W. K.** Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript. *Analytical Biochemistry* 1995, 224: 597 - 600
- Zeuzem S., Rüster B., Lee J.-H., Stripf T., Roth W. K.** Evaluation of a reverse hybridization assay for genotyping of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 1995, 23: 654 - 661
- Zeuzem S., Schmidt J. M., Lee J.-H., Rüster B., Roth W. K.** Effect of interferon alpha on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996, 23: 366 - 371
- Roth W. K., Lee J.-H., Rüster B., Zeuzem S.** Comparison of two quantitative hepatitis C virus reverse transcriptase PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 261 - 264
- Rüster B., Zeuzem S., Roth W. K.** Hepatitis C virus sequences encoding truncated core proteins detected in a hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219: 911 - 915
- Zeuzem S., Franke A., Lee J.-H., Herrmann G., Rüster B., Roth W. K.** Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology* 1996, 24: 1003 - 1009

Die vorliegende Arbeit wurde am Georg-Speyer-Haus, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Frankfurt am Main, unter Anleitung von Herrn PD Dr. W. K. Roth angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Roth für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. Zeuzem, Universitätsklinikum Frankfurt, der durch seinen Einsatz den Weg für wichtige Untersuchungen ebnete und durch seine Diskussionsbereitschaft die Durchführung der Arbeiten nachhaltig unterstützte.

Herrn Prof. Dr. Fasold danke ich für die Betreuung meiner Arbeit am Fachbereich 16.

Mein besonderer Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Molekulare Diagnostik" am Georg-Speyer-Haus, die durch ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft die Durchführung dieser Arbeit unterstützten und durch die Schaffung eines kollegialen Arbeitsklimas die Arbeiten enorm erleichterten. Insbesondere möchte ich Frau K. Severin danken, welche mich während der gesamten Dauer der Durchführung dieser Arbeit seelisch und moralisch unterstützte.

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
1.1	1
1.1.1	2
1.1.2	4
1.1.3	5
1.1.4	6
1.1.4.1	6
1.1.4.2	7
1.1.4.3	7
1.1.5	9
1.1.5.1	10
1.1.6	10
1.2	12
1.2.1	12
1.2.2	14
1.3	15
2	17
2.1	17
2.2	18
2.3	20
2.4	20
2.5	21
2.6	21
2.7	23
2.8	23
2.9	23
2.10	24
2.11	25
2.11.1	25
2.11.2	25
2.11.3	26
2.11.4	27
2.11.5	27

2.12	Allgemein verwendete Puffer	27
3	METHODEN	28
3.1	Allgemeine Methoden	28
3.1.1	Extraktion von HCV-RNA aus Serum mittels Trisolv	28
3.1.2	Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.1.2.1	Reverse Transkription	28
3.1.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	29
3.1.2.3	Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	32
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.1.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	33
3.1.3.2	Bestimmung der Primerkonzentration	33
3.1.3.3	Entsalzen der Oligonukleotide	34
3.1.4	Sequenzierung	34
3.1.4.1	Reinigen der PCR-Produkte für die Sequenzreaktion	34
3.1.4.2	Sequenzreaktion	35
3.1.4.3	Aufreinigen der Sequenzamplifikate	35
3.1.4.4	Herstellen des Sequenzgels	36
3.1.4.5	Elektrophorese und Detektion	36
3.1.4.6	Auswertung der Sequenzdaten	37
3.2	Quantifizierung von Hepatitis C Virus RNA	37
3.2.1	Synthese des HCV-RNA-Standards	37
3.2.1.1	Isolierung und Aufreinigung von PCR-Produkten	37
3.2.1.2	Kombinierte Hybridisierungs- und PCR-Reaktion	38
3.2.1.3	Selektion des HCV-cDNA-Standards mittels Dynabeads	38
3.2.1.4	Anhängen eines T7-Promotors und einer Poly-A-Sequenz an die Standard-cDNA	39
3.2.1.5	Abtrennen überschüssiger Primer mittels Centricon 100	40
3.2.1.6	Umschreiben von cDNA in RNA mittels T7-Polymerase	40
3.2.1.7	Aufreinigen von RNA über Oligo-dT-Zellulose	41
3.2.1.8	DNase- Verdau	41
3.2.2	Detektion und Auswertung der quantitativen RT-PCR	42
3.2.2.1	Slot-Blot	42
3.2.2.2	Hybridisierung mit biotinylierten Sonden	42
3.2.2.3	Detektion der PCR-Produkte	44
3.3	<i>In vitro</i> Replikation und Untersuchungen zur Tumorigenität von HCV	44
3.3.1	Isolierung von HCV-RNA aus Formalin-fixiertem Lebergewebe	44

3.3.1.1	Mikrodissektion	45
3.3.1.2	Makroskopisches Trennen von Tumor- und Peritumorzellen	45
3.3.2	Klonieren von PCR-Produkten	46
3.3.2.1	Kulturbedingungen	46
3.3.2.2	Direktes Klonieren von PCR-Produkten in prokaryontische Vektoren	46
3.3.2.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	48
3.3.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.3.2.5	Umklonieren der PCR-Produkte in einen eukaryontischen Expressionsvektor	50
3.3.3	Isolierung und Reinigung von Plasmiden	50
3.3.3.1	Schnellisolierung von Plasmiden mittels alkalischer Lyse	50
3.3.3.2	Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	51
3.3.3.3	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	51
3.3.4	Herstellen polyklonaler Antikörper	52
3.3.5	<i>In vitro</i> Translation	52
3.3.6	Western-Blot	53
3.3.7	Methoden der eukaryontischen Zellkultur	56
3.3.7.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen für die HCV <i>in vitro</i> Replikation	56
3.3.7.2	Inkubieren der Zellen mit HCV-positivem Serum	56
3.3.7.3	Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Collagen I bzw. Gelatine	57
3.3.7.4	Kultivierung von Zellen aus EDTA-Blut	58
3.3.7.5	Kultivierung von NIH/3T3- und Fisher-rat l-Zellen	58
3.3.7.6	Transfektion von NIH/3T3- und Fisher-rat l-Zellen	59
3.3.7.7	Weichagar-Koloniebildungstest	60
3.3.7.8	Transformationstest in Medium mit 0,5 FCS	60
3.3.7.9	Abimpfen von Weichagar-Kolonien und Foci	60
3.3.7.10	Isolieren von DNA aus eukaryontischen Zellen	61
3.3.7.11	Tumorbildung in der Nacktmaus	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	Etablierung einer sensitiven RT-PCR zum Nachweis von HCV	63
4.1.1	Austesten verschiedener RT-PCR-Verfahren	63
4.1.2	Selektion der Primer	67
4.2	Quantitative PCR	69
4.2.1	Herstellung von HCV-Standard-RNA	69
4.2.1.1	Austausch von 25 Nukleotiden in der cDNA	71
4.2.1.2	Umschreiben des cDNA-Standards in RNA	72
4.2.1.3	Prüfen der Standard-Sequenz	74
4.2.2	Austesten der Empfindlichkeit der RT-PCR	75

4.2.3	Austesten der Linearität der PCR	76
4.2.4	Durchführung der kompetitiven quantitativen RT-PCR	78
4.2.5	Reproduzierbarkeit der quantitativen RT-PCR	81
4.2.6	Anwendungen der quantitativen RT-PCR	81
4.3	Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Replikation von HCV	82
4.3.1	Austesten verschiedener Zelllinien	82
4.3.2	Einfluß von PEG auf die <i>in vitro</i> Replikation von HCV	84
4.3.3	Einfluß von Lipoproteinen auf die <i>in vitro</i> Replikation von HCV	85
4.3.4	Aufbau einer HCV-replizierenden Zelllinie aus metastasierenden HCV-positiven Zellen eines hepatozellulären Karzinoms	86
4.4	Tumorigenität von HCV	87
4.4.1	Beschreibung des Patienten	87
4.4.2	Sequenzierung der 5'-NC-Region	89
4.4.3	Sequenzierung der NS-5-Region	90
4.4.3.1	Direkte Sequenzierung der NS-5-Region	90
4.4.3.2	Sequenzierung der NS-5-Region von HCV-Isolaten aus verschiedenen Bereichen des Tumor- bzw. Peritumorgewebes	92
4.4.3.3	Verteilung von HCV-Varianten im Serum, Tumor- und Peritumorgewebe anhand der NS5-Region	93
4.4.4	Sequenzierung der Core-Region	95
4.4.5	Computeranalysen der resultierenden Core-Sequenzen	100
4.4.6	Malignitätstests	102
4.4.6.1	Generierung einer Gesamt-Core-Sequenz als Kontrolle für die Transformationsversuche	102
4.4.6.2	Expression der veränderten Core-Sequenzen in eukaryontischen Zellsystemen	104
4.4.6.3	Wachstum der transfizierten Zellen in 0,5 FCS und Austesten der Fähigkeit der Focus-Bildung	105
4.4.6.4	Weichagar-Koloniebildungstest	111
4.4.6.5	Nachweis der transfizierten HCV-Core-Sequenzen in den transformierten Zellen	115
4.4.6.6	Nachweis eines 10 kDa Proteins in transformierten Zellen	115
4.4.6.7	Nacktmausversuche	117
5	DISKUSSION	119
5. 1	Aufbau einer HCV-RT-PCR	119
5.1.1	Qualitative RT-PCR	119
5.1.2	Quantitative RT-PCR	120

5.2	Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Replikation und zur Tumorigenität des Hepatitis C Virus	126
5.2.1	<i>In vitro</i> Replikation von HCV	126
5.2.2	Tumorigenität von HCV	127
5.2.2.1	Sequenzierung der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus	129
5.2.2.2	Isolierung verschiedener HCV-Varianten aus Tumor- und Peritumorgewebe	129
5.2.2.3	Veränderte Core-Sequenzen von HCV-Isolaten aus dem Tumorgewebe	131
5.2.2.4	Transformierendes Potential von HCV-Core-Sequenzen aus Tumorgewebe	135
5.3	Ausblick	138
6	ZUSAMMENFASSUNG	140
6.1	RT-PCR zur Detektion von HCV	140
6.2	<i>In vitro</i> Replikation von HCV und Untersuchungen zur Tumorigenität	141
7	LITERATURVERZEICHNIS	142



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat.
AS	Aminosäure(n)
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymidin
ATP	Adenosin-5' -triphosphat
bidest	Zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rindersemmalbumin
C	Kern(Core)-Protein
cDNA	copy-DNA
COOH	Carboxy-
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxyethan-3,2-(5 chloro)trichloro (3.3. 1. 1 )decan)-4-yl)phenylphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Hüll(Envelope)-Protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum
G418	Geneticin
gp	Glykosyliertes Protein
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HDV	Hepatitis D Virus

---

HEV	Hepatitis E Virus
HGV	Hepatitis G Virus
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	Luria Broth
LDL	Low Density Lipoprotein
MW	Molekulargewicht
5'NC	5'-nichtkodierend
Neo	Neomycin
NH <sub>2</sub> -	Amino-
NS	Nichtstruktur-Protein(e)
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBML	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RIBA	Recombinant-immunoblot-assay
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss-DNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Triton-x 100	Octylphenolpolyethylenglycolether
t-RNA	transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β -D-Galaktosid

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Hepatitis C Virus

Der Einsatz serologischer Marker für Hepatitis A und B erbrachte die Erkenntnis, daß neben dem Hepatitis A (HAV) und dem Hepatitis B Virus (HBV) noch weitere hepatotrope Erreger existieren. 1977 entdeckten Rizzetto et al. (1977) bei Immunfluoreszenzuntersuchungen zum Nachweis von HBV-Antigen ein neues Antigen, daß sich von den HBV-Antigenen unterschied. Es handelte sich um ein viersähnliches Partikel aus einem RNA-Molekül und assoziierten Proteinen, die durch das Hepatitis B Surface-Antigen (HBsAg) eingekapselt sind. Das als Hepatitis D Virus (HDV) bezeichnete Virus ist in bezug auf die Replikation und Expression abhängig von der HBsAg-Synthese. Bis 1988 führten Versuche der Isolierung weiterer möglicher Erreger zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die klinische Diagnose der Non-A-Non-B-Hepatitis basierte auf dem serologischen Ausschluß von A- und B-Hepatitis. 1989/90 konnte einer dieser Erreger, das Hepatitis E Virus (HEV), charakterisiert werden (Reyes et al., 1990). HEV verursacht eine epidemische Form der Lebererkrankung. In den USA, Europa und Japan spielt das Hepatitis E Virus eine nur untergeordnete Rolle, während in Entwicklungsländern aufgrund der schlechteren hygienischen Bedingungen epidemische Infektionen auftreten. Berichte über die Charakterisierung eines sogenannten Hepatitis E Virus konnten nicht bestätigt werden (Deka et al., 1994 und Pillot et al., 1996). Über ein erst kürzlich charakterisiertes Hepatitis G Virus (HGV) aus der Familie der Flaviviren sind bisher noch wenig Daten vorhanden (Simons et al., 1995). Zur Zeit ist noch unklar, ob HGV tatsächlich mit einer Leberentzündung assoziiert ist.

Mit molekularbiologischen Methoden gelang 1988 die Isolierung des viralen Genoms des Hepatitis C Virus (HCV) (Choo et al., 1989). Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des HCV-Genoms diente Plasma eines experimentell infizierten Schimpansen. Nach Extraktion der Gesamt-RNA und reverser Transkriptasereaktion wurde mit den gewonnenen cDNA-Sequenzen eine Genbank in Lambda-Bakteriophagen etabliert. Die Klone wurden in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurde nach Proteinen gesucht, die mit Seren von Patienten mit gesicherter Non-A-Non-B-Hepatitis reagierten. Die nachfolgende Sequenzierung eines positiven Klons war der Grundstein für die Charakterisierung des HCV-Genoms. Es handelt sich bei HCV um ein umhülltes einzelsträngiges Plusstrang-RNA-Virus, dessen Genom aus

ca. 9500 Basen besteht. Sequenzvergleiche mit anderen Viren zeigten Homologien zu Flavi- und Pestiviren (Miller et al., 1990). Das Hepatitis C Virus wurde als dritte eigenständige Gruppe mit der Bezeichnung Hepacivirus der Familie der Flaviviridae zugeteilt.

Die meisten Fälle von Posttransfusions-Hepatitis werden durch eine HCV-Infektion verursacht. Das Virus ist in Ländern, in denen Blutkonserven mit empfindlichen Verfahren auf Hepatitis B Surface-Antigen (HBsAg) untersucht werden, für mehr als 80 % der Posttransfusions-Hepatitis verantwortlich.

### **1.1.1 Genomaufbau und Replikation des Hepatitis C Virus**

Der Aufbau des Genoms ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Genomsequenz des Hepatitis C Virus besitzt ein offenes Leseraster und kodiert für ein Polyprotein von etwa 3100 Aminosäuren. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich eine ca. 320 bis 340 Basen umfassende Sequenz, welche nicht in Aminosäuren umgeschrieben wird (5'-nichtkodierende Region, 5'-NC). Diese Region ist hoch konserviert (Sequenzhomologie zwischen 95 bis 99 % zwischen den verschiedenen HCV-Subtypen) und hat bei der Replikation und der Translation eine zentrale Bedeutung. (Cha et al., 1992; Choo et al., 1989; Fuchs et al., 1991 und Han et al., 1991). Aufgrund computerunterstützter Untersuchungen konnte die Sekundärstruktur der 5'-NC-Region aufgeklärt werden (Brown et al., 1992 und Tsukiyama-Kohara et al. 1992). Die Region weist verschiedene Domänen mit konservierten Stamm-Loop-Strukturen auf, vergleichbar den Eintrittsstellen von Ribosomen bei Pestiviren. Am 3'-Ende des HCV-Genoms befindet sich eine poly-(A)-Sequenz von etwa 60 Nukleotiden, gefolgt von einer 98 Basen umfassenden Sequenz, die ebenfalls nicht translatiert wird. Möglicherweise dient die poly-(A)-Sequenz als Schutz vor der Exonukleaseaktivität verschiedener RNasen. Die sich anschließende 98 Basen nichtkodierende Region hat nach heutigem Kenntnisstand eine wichtige Funktion bei der Replikation des Virus (Tanaka et al., 1995 und Yamada et al., 1996).

Aufgrund proteolytischer Spaltung durch zelluläre (Signalpeptidasen des endoplasmatischen Retikulums) und virale Proteasen entstehen aus dem Vorläufer-Polyprotein die drei strukturbildenden Proteine C (Nukleokapsid), E1 und E2 (glykosylierte Hüllproteine; gp33 und gp72) sowie die Nichtstrukturproteine NS2 (Protease), NS3 (Serinprotease, Helikase),

NS4A und NS4B und NS5A und NS5B. Die Funktion des NS4A und NS4B Genproduktes ist zur Zeit noch nicht geklärt, jedoch scheint das NS4A-Protein bei der Spaltung des Polyproteins eine Helferfunktion zu besitzen (Failla et al., 1994). Die am 3'-Ende liegende NS5B-Region kodiert für eine RNA-abhängige-RNA-Polymerase. Die Funktion des NS5A-Genproduktes ist ebenfalls zur Zeit noch nicht geklärt (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993 und Takahashi et al., 1992). Zwischen E2 und NS2 wird ein weiteres Spaltprodukt (p7) mit noch unklarer Funktion prozessiert (Lin et al., 1994).

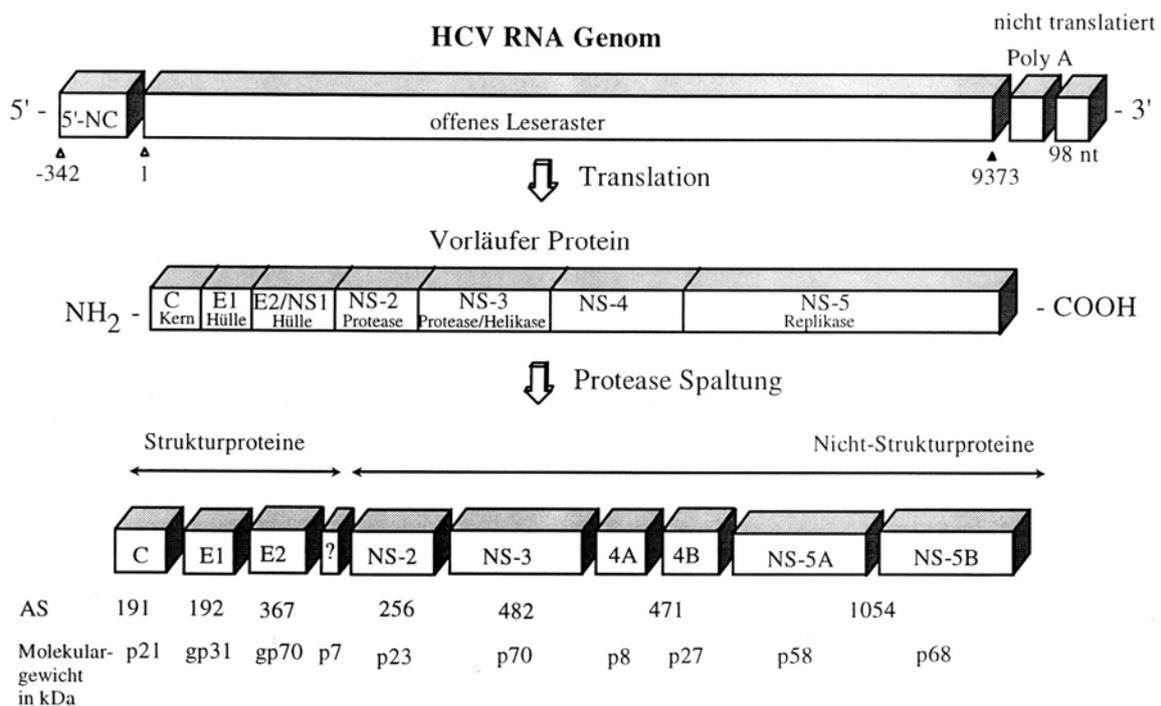


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Hepatitis C Virusgenoms.

Am HCV RNA Genom ist mit einem Dreieck (A) die Nukleotidposition nach Choo et al. (1989) angegeben. Unter den resultierenden Proteinen C bis NS5B ist, mit AS bezeichnet, die Größe der verschiedenen Translationsprodukte des Hepatitis C Virus dargestellt. Die Anzahl der Aminosäuren der NS4- bzw. NS5-Region ist nicht weiter in A und B unterteilt.

Die Replikation des Hepatitis C Virus erfolgt über die Synthese eines Minusstrang-RNA-Intermediates. Von einem RNA-Minusstrang können mehrere Plusstrang-RNA-Genome gebildet werden (Shimizu et al., 1992). Bei HCV wird ein ähnlich stringenter Tropismus für

die Leber angenommen wie er für das Hepatitis B Virus gilt. Nur in Lymphozyten konnten ebenfalls replikative Minusstrang-Intermediate nachgewiesen werden (Bartolome et al., 1993; Müller et al., 1993 und Qian et al., 1992).

### **1.1.2 Variabilität des Hepatitis C Virus**

Zur Zeit sind je nach Autor 6-12 verschiedene HCV Genotypen bekannt, welche Nukleotid-Sequenzunterschiede von über 30 in den Hüllproteinen aufweisen (Bukh et al., 1993; Chan et al., 1992 und Simmonds et al., 1993b). Die Genotypen können zum Teil noch in Subtypen (zur Zeit über 100 verschiedene) unterteilt werden, deren Homologie - über das gesamte Genom betrachtet - innerhalb eines Genotypes zwischen 80 und 90 % liegt (Bukh et al., 1993; Chan et al., 1992; Mori et al., 1992 und Simmonds et al., 1993b). Die größten Sequenzunterschiede befinden sich innerhalb der hypervariablen Regionen (HVR1 und HVR2) der E2-Region. Die Unterscheidung des Hepatitis C Virus in Genotypen und Subtypen (Bukh et al., 1992 und Simmonds et al., 1993c) ist sowohl für die Diagnostik, als auch möglicherweise für den klinischen Verlauf und die Ansprechraten auf eine  $\alpha$ -Interferon-Therapie von Bedeutung (Chemello et al., 1994; Dusheiko et al., 1994; Pozzato et al., 1994 und Tsubota et al., 1994).

Die Mutationsrate bei RNA-Viren liegt bei etwa  $2 \times 10^{-3}$  Mutationen pro Nukleotidposition pro Jahr (Ogata et al., 1991). Diese ist bedingt durch das Fehlen einer "proof-reading"-Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Daher existieren RNA-Viren *in vivo* aus einer heterogenen Mischung von zirkulierenden verwandten Genomen (Quasispezies), die zumeist aus einer dominierenden Sequenz und einem großen Spektrum von Varianten bestehen (Domingo et al., 1985 und Martell et al., 1992).

In Deutschland findet man folgende Verteilung der HCV-Subtypen: HCV-1a: 20 %, 1b: 50 %, 2a: 5 %, 2b: 3 %, 2c: 5 %, 3a: 15 %, 4: 2 % (Zeuzem et al., 1994). Genotypen 5 und 6, welche erstmals in Südafrika und Hongkong beschrieben wurden (Simmonds et al., 1993a), wurden bisher in Deutschland noch nicht dokumentiert. Die Genotypen 7 bis 9 wurden bisher nur in Vietnam beschrieben (Tokita et al., 1994).

### 1.1.3 Epidemiologie und Transmission des Hepatitis C Virus

Nach heutigen Schätzungen sind weltweit etwa 100 Millionen Menschen chronische Träger des Hepatitis C Virus. Der Anteil der HCV-assoziierten Hepatitiden an der Gesamtzahl der Virus-bedingten Lebererkrankungen ist abhängig von der geographischen Lokalisation und den betroffenen Risikogruppen. Man schätzt, daß in Afrika und Asien HCV die Ursache von etwa 50 % der Fälle von viraler Hepatitis ist. In Europa und Nordamerika liegt der Anteil etwa bei 10 - 20 %. In Deutschland liegt die Anzahl der chronischen Hepatitis C-Virussträger bei etwa 500.000. 0,3 bis 1 % der Blutspender in der BRD sind HCV-Antikörper positiv (Kühnl et al., 1989 und Roggendorf et al., 1989).

Die Übertragung des Hepatitis C Virus kann parenteral über Blutkonserven, Plasmaprodukte oder durch Mehrfachverwendung von Injektionskanülen (Reihenimpfungen, intravenöser Drogen Abusus) erfolgen. Es wurden aber auch perinatale Übertragungen beschrieben (Ohto et al., 1994 und Thaler et al., 1991). Auch eine sexuelle Übertragung des Virus ist nach neueren Untersuchungen sehr wahrscheinlich (Utsumi et al., 1995). Jedoch ist bei etwa 30 % der HCV infizierten Patienten der Übertragungsweg des Virus unbekannt (Alter et al., 1990; Kuo et al., 1989 und Shimoyama et al., 1993).

Nach einer Latenzzeit von 2 - 26 Wochen (im Mittel 8 Wochen; Van der Poel et al., 1989) verläuft die akute HCV-Infektion in ca. 2/3 der Fälle asymptomatisch. Die Häufigkeit eines "gesunden" HCV-Trägerstatus, d. h. Nachweis einer Hepatitis C Virämie ohne Erhöhung der leberspezifischen Enzyme und Vorliegen einer unauffälligen Leberhistologie, wird kontrovers diskutiert (Brillanti et al., 1992 und Persico et al., 1993). Die Chronifizierungsrate von HCV liegt bei etwa 50 - 75 % (Alter et al., 1992 und DiBisceglie et al., 1991) im Vergleich zur Chronifizierungsrate von 5 - 10 % bei HBV-Infektionen (Jeffers et al., 1992). Zwischen dem Infektionszeitpunkt und der Diagnosestellung der chronisch aktiven Hepatitis liegen im Durchschnitt 13 Jahre. Die Inzidenz scheint regional erheblich zu schwanken. Langfristig entwickeln 20 - 30 % der Patienten mit chronischer Hepatitis C eine Leberzirrhose (DiBisceglie et al., 1991). Verschiedene Wirtsfaktoren (Alter, Rasse, Geschlecht, Immunstatus, genetische Einflüsse) und Kofaktoren, wie z. B. Infektionen mit weiteren hepatotropen Erregern, Alkoholkonsum sowie die Einnahme hepatotoxischer Medikamente haben einen gesicherten negativen Einfluß auf den klinischen Verlauf der HCV-Infektion. Ein

Zusammenhang zwischen HCV-Infektion und der Entwicklung eines Leberzellkarzinoms wird angenommen.

Der Mechanismus der viralen Leberschädigung ist zur Zeit noch unklar. Jedoch scheint die Leberzellschädigung im Gegensatz zu HBV-Infektionen nicht rein immunvermittelt, sondern auch durch eine direkte Rolle des Virus bedingt zu sein. Verantwortlich für die immunologische Leberzellschädigung sind unter anderem zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die mit Core- und NS-Protein-Epitopen des HCV reagieren (Shirai et al., 1992) und die Apoptose vermitteln. Für den immunvermittelten Mechanismus spricht auch die Assoziation der Hepatitis C Infektion mit Autoimmunphänomenen, Autoantikörpern einer Kryoglobulinämie, sowie die in den Portalfeldern und im Leberparenchym der infizierten Leber nachgewiesenen lymphatischen Infiltrate von aktivierten B- und T-Zellen (Carson et al., 1993 und Johnson et al., 1993).

#### **1.1.4 Diagnostik der HCV-Infektion**

##### **1.1.4.1 Serologischer Nachweis der HCV-Infektion**

Als Routinediagnostikverfahren zur Detektion einer Hepatitis C Virus-Infektion dient im allgemeinen der indirekte Antikörper-Nachweis mittels eines Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA). Die zur Zeit eingesetzten Testsysteme (ELISA der 2. und 3. Generation) zeigen eine Sensitivität von etwa 90 % (Lavanchy et al., 1994). Der Bestätigung positiver ELISA-Ergebnisse dienen verschiedene Immunoblot-Techniken mit mehreren membran-gebundenen HCV-Proteinen, sogenannte RIBA-Systeme (Bresters et al., 1993; Lavanchy et al., 1994 und van der Poel et al., 1991). Jedoch läßt sich auch mit den derzeit benutzten ELISA-Tests der 2. und 3. Generation nicht immer eine akute Infektion diagnostizieren. Bei der Mehrzahl der Infizierten werden die Tests erst innerhalb von 8 bis 16 Wochen nach Infektion positiv. Bei Menschen mit ausgeheilten Hepatitis C Virus-Infektionen verschwinden die Antikörper wahrscheinlich erst innerhalb von einigen Jahren, so daß mit diesen Testsystemen nicht zwischen einer noch vorhandenen oder ausgeheilten Infektion unterschieden werden kann (Jilg et al., 1993).



#### **1.1.4.2 Direkter HCV-Nachweis mittels reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion**

Zum direkten Nachweis einer HCV-Infektion dient die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach vorheriger reverser Transkription (RT) der HCV-RNA. Hepatitis C-spezifische RNA kann mittels RT-PCR innerhalb der ersten Woche nach Infektion in Patientenserum nachgewiesen werden (Farci et al., 1991 und Shindo et al., 1992). Aufgrund der hohen Konservierung der 5'-nichtkodierenden Region des HCV-Genoms eignen sich für die Diagnostik Primer, die zu diesem Genomabschnitt komplementär sind (Bukh et al., 1992 und Inchauspe et al., 1991).

Ein großes Problem bei der Anwendung der PCR gerade in der Diagnostik stellt die Gefahr von Produktkontaminationen dar. Schon einige wenige Amplifikate aus anderen Reaktionen reichen aus, um ein falsch positives Resultat zu erzielen. Dies ist besonders bei Anwendung einer "nested" PCR der Fall, da hier die Reaktionsgefäße nach einer ersten Amplifikationsreaktion geöffnet werden, um ein Aliquot dieser Reaktion in eine zweite PCR zu überführen.

Die PCR zeichnet sich gegenüber den Immunoassays durch eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität aus. Jedoch kann gerade unter einer antiviralen Therapie der Virustiter unter die Nachweisgrenze der PCR sinken. Das Ergebnis sind falsch negative Resultate.

#### **1.1.4.3 Quantitativer HCV-Nachweis**

Da die Viruskonzentration einen Einfluß auf den klinischen Verlauf der Infektion zu haben scheint, ist es notwendig eine quantitative Nachweismethode zur Verfügung zu haben. Verschiedene Studien deuten darauf hin, daß die Höhe des Virustiters ebenfalls mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit  $\alpha$ -Interferon assoziiert ist. So stellt unter anderem eine hohe Hepatitis C Virämie vor Behandlung mit  $\alpha$ -Interferon einen prognostisch ungünstigen Parameter der Therapie dar (Lau et al., 1993; Magrin et al., 1994 und Yoshioka et al., 1992). Eine niedrige Hepatitis C-Virämie hingegen ist ein günstiger Prädiktor sowohl für das Ansprechen auf  $\alpha$ -Interferon als auch für einen langfristigen Therapieerfolg nach Absetzen der Behandlung.

Eine Möglichkeit, den Titer des Hepatitis C Virus in infizierten Patienten festzustellen, ist die Durchführung einer quantitativen RT-PCR. Der Nachweis PCR-amplifizierter DNA (bzw. RNA nach reverser Transkription) läßt sich quantitativ durchführen, indem zum eigentlichen PCR- bzw. RT-Ansatz eine bekannte Menge an Standard-DNA bzw. -RNA zugegeben wird. Der Einsatz interner Standards bei der Durchführung quantitativer Polymerase-Kettenreaktionen soll verhindern, daß Variationen der PCR-Reaktion in den verschiedenen Reaktionsgefäßen durch z. B. Inhibitoren in den eingesetzten RNA-Extrakten, bzw. Temperaturngenauigkeiten im Thermocycler die Quantifizierung der verschiedenen Proben verfälschen. Verschiedene Ansätze zur Virusquantifizierung mittels interner Standards wurden bisher beschrieben. Die Verwendung eines DNA-Standards zur Quantifizierung von HCV-RNA im Serum hat den Nachteil, daß die Effizienz der reversen Transkription nicht in die Auswertung der Quantifizierung mit eingeht. Die Umschreibreaktion von RNA in cDNA erfolgt nicht 100 %ig. Nur etwa 10 % der RNA-Moleküle werden in cDNA umgeschrieben. Bei Einsatz eines RNA-Standards wird diese Fehlerquelle bei der Ermittlung des Virustiters ausgeschlossen.

Die Unterscheidung zwischen Amplifikaten des internen Standards und der HCV-Wildtyp-RNA kann durch verschiedene Längen der Amplifikate (Wang et al., 1989) oder durch Einfügen von Restriktionsschnittstellen in den Standard erfolgen (Hagiwara et al., 1993 und Kato et al., 1993). Unterschiedlich große Amplifikate können zu einer bevorzugten Amplifikation der kürzeren Zielsequenz führen. Interne Standards mit einer integrierten Restriktionsschnittstelle haben den Nachteil, daß es aufgrund der Bildung von Heteroduplexstrukturen zwischen Standard- und Wildtyp-HCV-Sequenz zu einer falsch hohen Virus-RNA-Bestimmung kommen kann. Beide Systeme haben zusätzlich den Nachteil, daß die gleiche Anzahl an kürzeren DNA-Fragmenten in einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel ein weniger starkes Signal geben, als die gleiche Anzahl an größeren DNA-Fragmenten. Das Amplifikationsprodukt eines idealen internen Standards sollte demnach die gleiche Länge, wie das Amplifikat der HCV-Wildtyp-RNA besitzen; die Signalstärke sollte nicht durch die Bildung von Heteroduplexstrukturen beeinflußt werden.

Eine weitere Methode, um HCV-RNA im Serum von Patienten zu quantifizieren, ist die Anwendung der "branched-DNA" (b-DNA)-Technologie (Chiron Corporation). Die Quantifizierung mit Hilfe der b-DNA-Technologie basiert auf der Hybridisierung von HCV-RNA

mit komplementären Oligonukleotiden zur hochkonservierten 5'-NC-Region und einem Teil der Core-Region des Hepatitis C Virus. Nach Hybridisierung der HCV-RNA und somit der Fixierung der RNA an eine Festphase, wird erneut mit sogenannten b-DNA-"Amplifier"-Molekülen hybridisiert. Die Verstärkung des HCV-RNA-Signals wird durch Bindung vieler Alkalische-Phosphatase-gekoppelter Oligonukleotide an die b-DNA-"Amplifier"-Moleküle erreicht. Durch Zugabe eines Substrates für die Alkalische Phosphatase werden die RNA-Moleküle quantitativ detektiert. Der Nachteil dieser Methode liegt in der (im Vergleich zur quantitativen RT-PCR) niedrigen Sensitivität (> 120000 Moleküle / ml).

### **1.1.5 Therapie der chronischen HCV-Infektion**

Aufgrund des hohen Risikos der Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines HCCs erfordert die chronische Hepatitis C eine effektive Therapie mit dem Ziel der Besserung der histologischen Entzündungsanzeichen bzw. der Viruselimination. Der Einsatz immunsuppressiver Therapeutika (Kortikosteroide) erzielte ebenso wie der Einsatz von Urodesoxycholsäure nur vermeintliche Therapieerfolge (Abfall der Transaminasen) (Magrin et al., 1994 und Takano et al., 1994). Diese Therapeutika werden jedoch aufgrund der Förderung der Viruspersistenz und Chronifizierung heute nicht mehr zur Behandlung der HCV-Infektion eingesetzt (Bellentani et al., 1993 und Dienstag et al., 1986). Ebenso zeigten antivirale Substanzen wie Aciclovir (Stremmel et al., 1991) oder Ribavirin (DiBisceglie et al., 1993) nicht die erhofften Erfolge. Zur Therapie der chronischen Hepatitis C hat sich nur die Behandlung mit  $\alpha$ -Interferon bewährt (Di Bisceglie et al., 1989 und Davis et al., 1989). Möglicherweise stellen Kombinationstherapien (z. B.  $\alpha$ -Interferon plus Ribavirin) eine Optimierung der Therapie dar. Die initialen Ansprechraten einer  $\alpha$ -Interferontherapie liegen bei etwa 50 %; nach Absetzen der Therapie kommt es bei etwa der Hälfte der Patienten zu einem Rückfall mit Wiederanstieg der Transaminasen und Nachweis von HCV-RNA. Der Langzeiterfolg einer  $\alpha$ -Interferonbehandlung, der auch histologisch belegt werden kann, liegt insgesamt bei 15 - 25 % (Di Bisceglie et al., 1989; Davis et al., 1989 und Marcellin et al., 1991),

### 1.1.5.1 Prädiktive Parameter

Bezüglich des Erfolges einer  $\alpha$ -Interferontherapie bei chronischer Hepatitis C sind verschiedene prognostische Faktoren bekannt. So sind ein jüngeres Lebensalter der Patienten (unter 50 Jahren), eine möglichst kurze Krankheitsdauer sowie nur mäßig erhöhte Transaminasen prognostisch günstige Faktoren. Negative Prädiktoren einer  $\alpha$ -Interferonbehandlung sind ein zirrhotischer Leberumbau, erhöhte Lebereisen- und Serumferritin-Konzentration sowie eine Erhöhung der Gamma-Glutamyl-Transpeptidase ( $\gamma$ -GT) (Camps et al. 1993; Causse et al., 1991; Jouet et al., 1994; Piperno et al., 1993; Pagliaro et al., 1994; Tsubota et al., 1994 und Van Thiel et al. 1992). Eine hohe Hepatitis C Virämie vor der Behandlung stellt einen weiteren prognostisch ungünstigen Parameter der  $\alpha$ -Interferonbehandlung dar (Lau et al., 1993; Magrin et al., 1994 und Yoshioka et al. 1992). Eine niedrige Hepatitis C Virämie ist ein günstiger Prädiktor sowohl für das Ansprechen auf  $\alpha$ -Interferon als auch den langfristigen Therapieerfolg nach Absetzen der Behandlung (Hagiwara et al., 1993; Lau et al., 1993 und Tsubota et al., 1994). Die verschiedenen HCV-Genotypen bzw. Subtypen beeinflussen wahrscheinlich unabhängig von der Virämie die Ansprechrates. Patienten, die mit dem Subtypen HCV-1b infiziert sind, zeigen deutlich schlechtere Therapieerfolge als Patienten, die mit den HCV-Genotypen 2 oder 3 oder dem Subtypen 1a (Klassifikation nach Simmonds) infiziert sind (Chemello et al., 1994; Kanal et al., 1992; Tsubota et al., 1994 und Yoshioka et al., 1992). Das Ausmaß der Heterogenität in der hypervariablen Region (HVR1) im E2-kodierten Genomabschnitt, und das Auftreten von bestimmten Punktmutationen in der NS5A-Region (bei dem Subtypen HCV-1b) stellen weitere virusbedingte Prädiktoren des Ansprechens auf eine  $\alpha$ -Interferonbehandlung dar (Okada et al., 1992 und Weiner et al., 1992).

### 1.1.6 HCV-Infektion und Leberzellkarzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der weltweit häufigsten malignen Tumoren (Parkin et al., 1984). Mit der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms sind chronische Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (ohne und mit einer Hepatitis D Virus Koinfektion) und dem Hepatitis C Virus assoziiert (Feitelson et al., 1992; Ikeda et al., 1993; Saito et al., 1990; Sherlock et al., 1994 und Tsukuma et al., 1993). Die Prävalenz der anti-HCV-

Antikörper bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom liegt mit deutlichen geographischen Schwankungen zwischen 13 und 76 %. Hohe Prävalenzraten (55 bis 76 %) sind insbesondere in Italien, Spanien und Japan beschrieben worden. Das HCC-Risiko bei Patienten mit chronischer Hepatitis C ist mehr als 4-fach erhöht (Tsukuma et al., 1993). Eine Koinfektion mit Hepatitis B und C Virus beinhaltet eine deutliche Steigerung des Risikos zur Entwicklung eines Leberzellkarzinoms im Vergleich zu einer alleinigen Hepatitis C-Virusinfektion (Poenaru et al., 1991 und Yuki et al., 1992).

In den meisten Fällen entwickelt sich ein HCC bei HCV-infizierten Patienten mit einer Latenzzeit von vielen Jahren nach einem zirrhotischen Leberumbau. Leberzellnekrosen und gesteigerte Mitoseraten bei chronischer Hepatitis können zur nodulären Regeneration und zu Dysplasie und Entartung führen. Allerdings wurden bereits vielfach auch HCV-assoziierte Tumoren beschrieben, die sich ohne Vorliegen einer Leberzirrhose entwickelt haben (Bruix et al., 1989; De Mitri et al., 1995; Herr et al., 1993 und Ruiz et al., 1992). Die Latenzzeit zwischen Infektion und Entstehung eines HCC scheint bei Infektion mit dem HCV im Vergleich zu HBV eher kürzer zu sein (20 - 30 Jahre) (Kiyosawa et al., 1990). Eine Erklärung für die niedrigere Inzidenz des HCC in westlichen gegenüber südostasiatischen Ländern könnte der Infektionszeitpunkt sein. In westlichen Ländern erfolgt die Virusinfektion eher im Erwachsenenalter, während z. B. in Südostasien die vertikale Transmission sowie Infektionen im frühen Kindesalter eine größere Bedeutung haben. Insgesamt wird, Autopsiestudien zeigen das, bei Patienten mit chronischer Hepatitis C die Häufigkeit des HCC aufgrund der schwierigen Frühdiagnostik eher unterschätzt (Blum et al., 1990).

Therapeutische Optionen für die Behandlung hepatozellulärer Karzinome umfassen die chirurgische Resektion, lokale Chemotherapie, die Tumorembolisation sowie sonographisch gesteuerte Alkoholinjektionen. Die Prognose nach einer Lebertransplantation wird insgesamt zurückhaltend eingestuft (Otlhoff et al., 1990 und Yokojama et al., 1990) und ist abhängig vom Tumor-Stadium.

## 1.2 Malignitätstests

Gegenwärtig gibt es noch keinerlei Vorstellung über die molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese im Zusammenhang mit einer HCV-Infektion. Analog zur Karzinogenese anderer Tumoren werden die Überexpression von Wachstumsfaktoren (z. B. TGF- $\alpha$ , EGF, PDGF) und Wachstumsfaktorrezeptoren, eine Aktivierung von Onkogenen (z. B. myc, fos, ras, sis usw.) sowie der (Funktions-) Verlust von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53, Rb, DPC4 usw.) diskutiert. Im Gegensatz zu HBV besitzt das Hepatitis C Virus keine reverse Transkriptase und kann sich nicht in das humane Genom integrieren. In hepatozellulären Karzinomen von HCV-positiven Patienten wurden replizierende HCV-Sequenzen gefunden (Nachweis von (-)-Strang) (Gerber et al, 1992; Kobayashi et al., 1994; Nouri Aria et al., 1993 und Paterlini et al., 1993). Trans-Effekte als Ursache der HCV-assoziierten Tumorigenese könnten sowohl durch native als auch veränderte virale Proteine vermittelt werden.

Verschiedene eukaryontische Zellkulturen bzw. das Modell der athymischen Nacktmaus stellen Systeme dar, um das transformierende Potential von DNA (RNA)-Sequenzen bzw. der entsprechenden Proteine zu testen.

### 1.2.1 NIH/3T3- und Fisher-rat1-Zellen

Etablierte Zelllinien verhalten sich in vieler Hinsicht anders als primäre Zelllinien. Ein Unterscheidungsmerkmal ist die Kontakt-Hemmung bei primären Zellen. Etablierte Zelllinien sind in der Lage, in mehreren Schichten übereinander zu wachsen. Dagegen stellen primäre Zellen das Wachstum ein, wenn sie mit benachbarten Zellen in Berührung kommen (Bildung eines „Monolayers“). Wenn Primärzellen transformiert werden, ist eine ihrer bedeutensten Eigenschaften der Verlust oder die starke Verminderung dieser Kontakt-Hemmung (Paul et al., 1980).

Eine Eigenschaft transformierter Zellen ist, daß sie bereits bei sehr geringen Aussaatdichten (20 Zellen / ml) anwachsen und sich teilen. Dagegen wachsen die meisten primären Zellen bei Aussaatdichten von weniger als 20000 Zellen / ml überhaupt nicht. Zellen, die eine hohe Aussaatdichte benötigen, um sich zu teilen, sind von Substanzen abhängig, welche von benachbarten Zellen ausgeschieden werden (parakrine Substanzen) und so erst bei einer

größeren Anzahl von Zellen in genügender Konzentration vorhanden sind. Transformierte Zellen bilden diese Substanzen autokrin und können daher z. B. einzeln kloniert werden (Paul et al., 1980).

Einige Primärzelllinien, besonders menschliche Fibroblasten, sind sehr stabil und transformieren niemals spontan. Andererseits können sich Mäusefibroblasten schnell einer spontanen Transformation unterziehen und die Kontakt-Hemmung nach einigen Passagen verlieren. Als Ergebnis systematischer Passagierung entdeckten Todaro und Green (1963), daß primäre Mäusefibroblasten ihre Kontakt-Hemmung über sehr viel mehr Passagen beibehalten, wenn sie alle 3 Tage mit einer Einsaatdichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm Kunststoff-Petrischale übertragen werden. Für das Verfahren, alle 3 Tage  $3 \times 10^5$  Zellen einzusähen, benutzten Todaro und Green den Fachausdruck 3T3. Die Folge dieses Passagierens ist, daß die Zellen nicht dicht wachsen, was für die Erhaltung des nicht-transformierten Zustands von entscheidender Bedeutung ist. Läßt man diese Zellen wiederholt zu einem geschlossenen Zellrasen zusammenwachsen, ändern sich die Eigenschaften dieser Zellen zunehmend; so geht unter anderem die Kontakt-Hemmung verloren. Sogar bei sorgfältigster Behandlung kommt diese Änderung nach einer größeren Zahl von Passagen zustande. Daher sind bei Arbeiten mit diesem Zellkultursystem sehr viele Kontrollen notwendig.

Neben der ursprünglichen 3T3 Zelllinie wurden viele andere in gleicher Weise etabliert (z. B. Fisher-ratl-Zellen). Zellen dieses Typs werden für Malignitätstests eingesetzt, da sie eine deutliche Kontakt-Hemmung aufweisen und eine hohe Aussaatdichte benötigen. Beide Eigenschaften gehen nach einer Transformation verloren.

Viele transformierte Zellen können in Kulturmedien wachsen, die sehr viel weniger Serum enthalten (0,5 bis 1 %) als die entsprechenden nicht-transformierten Zellen benötigen (10 %). Dies bestätigt, daß die transformierten Zellen weniger Wachstumsfaktoren von außerhalb (parakrin) benötigen als nicht-transformierte Zellen. Daher wird das Wachstum in 0,5 bzw. 1% FCS als ein Selektionssystem für transformierte Zellen eingesetzt, welche autokrin die für das Wachstum notwendigen Substanzen bilden können.

Ein weiteres charakteristisches Kriterium für transformierte Zellen ist die Focus-Bildung. Da die transformierten Zellen die Kontakt-Hemmung verloren haben und für das Wachstum nicht

mehr an Oberflächen adsorbieren müssen, wachsen diese Zellen nicht mehr als Monolayer, sondern bilden Kolonien, die in das Medium hineinragen (Foci).

Ein weiterer Test zur Überprüfung des transformierten Zustands ist der Weichagar-Koloniebildungstest. Dabei werden die Zellen durch Trypsin-Behandlung vereinzelt und in geringer Zelldichte (etwa 2000 Zellen / ml) in 0,33 %igen Weichagar eingebettet. Transformierte Zellen, die nicht auf Substanzen benachbarter Zellen angewiesen sind und nicht auf einer festen Oberfläche haften müssen, um anzuwachsen, bilden in diesem Testsystem Kolonien. Nicht-transformierte Zellen gehen nach einigen Tagen bis Wochen ohne Koloniebildung zugrunde (Macpherson et al., 1964 und Paul et al., 1980).

### **1.2.2 Nacktmausversuche**

Die Bezeichnung Nacktmaus (nude-Maus, *nu/nu*-Maus) resultiert aus einer genetisch determinierten Haarlosigkeit. Das Fehlen des Fells ist kombiniert mit einem angeborenen Defekt der Thymusreifung. Die erste eingehende Beschreibung als "haarlose Mausmutante" erfolgte durch Flanagan (1966). Er erkannte die Haarlosigkeit als autosomal rezessiv vererbt und führte hierfür das Gen-Symbol "*nu*" ein (homozygote Tiere: *nu/nu*). Die zweite mit der Haarlosigkeit untrennbar verbundene, für Forschungszwecke weitaus interessantere Eigenschaft, die Thymuslosigkeit, stellte Pantelouris (1968) fest. Aufgrund des Thymusdefektes wurde die Formulierung "absence of the thymus" bzw. "thymusless" gewählt, so daß die Nacktmaus im allgemeinen Sprachgebrauch als "thymuslos" bezeichnet wird, obwohl ein Thymusrudiment vorhanden ist.

Das mutierte Gen "*nu*" beeinflußt den Thymus auch heterozygoter Anlagenträger: Das Organ ist kleiner und leichter als in normal ausgereiftem Zustand. Die Zahl der Lymphozyten sowohl in der Rinde wie im Mark des Thymus ist signifikant reduziert. Nacktmäuse sind ausgeprägt immundefizient; ihre Abwehrschwäche resultiert aus dem Fehlen bestimmter Zellgruppen. So besitzt die Nacktmaus nur T-Zell-Vorläufer, jedoch keine funktionellen T-Zellen. Aufgrund der Thymusaplasie unterbleibt die abschließende Prägung der Zellen. Nur 1 % bis 5 % der Lymphozyten tragen die für T-Lymphozyten charakteristischen Oberflächenmarker Thy-1, deren Abstammung jedoch unbekannt ist. Das Allel "*nu*" übt offensichtlich keinerlei direkten



oder indirekten Einfluß auf Aufbau, Lebensdauer und immunologische Funktion der B-Lymphozytengeneration aus. Die Ursache der Unfähigkeit zur Bildung von spezifischem IgE ist zur Zeit noch nicht geklärt. Die NK-Zellen (natural killer cells) finden sich vor allem in der Milz. Generell weisen Nacktmäuse höhere Zahlen an NK-Zellen auf als nicht mutierte Tiere. Die Rolle der NC-Zellen (natural cytotoxic cells) und der Makrophagen bei der Abwehr transplantiertes Gewebe ist noch nicht geklärt. Die Makrophagen scheinen partiell in den *nu/nu*-Mäusen stärker wirksam zu sein als bei anderen Mäusen (Bundschuh et al., 1988).

Da Nacktmäusen Thymus-abhängige Immunreaktionen (weitgehend) fehlen, kann bei geeigneter Versuchsanordnung der Anteil der T-Lymphozyten am gesamten Immungeschehen im Verlauf bestimmter Infektionen besser erkannt werden als bei normalen Tieren. Im Gegensatz zum normalen Organismus können die fehlenden Thymus-abhängigen Anteile des Immunsystems nicht zu Transplantationsabstoßungen führen, so daß die Transplantation von Tumoren und Zellen verschiedenster Spezies in diese Tiere möglich ist. Daher ist das Nacktmausmodell besonders gut geeignet, um das tumorbildende Potential von mutierten (auch gentechnisch veränderten) Zellen auch anderer Spezies zu untersuchen.

### **1.3 Aufgabenstellung**

Im Rahmen einer Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe PD Dr. Roth des Georg-Speyer-Hauses, Frankfurt am Main, und PD Dr. Zeuzem, Abteilung für innere Medizin des Universitätsklinikums, Frankfurt am Main, sollten Untersuchungen zur Pathogenese insbesondere zur Tumorphagenese des Hepatitis C Virus durchgeführt werden.

Für die Durchführung der geplanten Arbeiten war es notwendig, eine zuverlässige und sensitive RT-PCR zur Detektion von HCV zu etablieren. Zudem sollte mit Hilfe dieser PCR die Diagnose der HCV-Infektion verbessert werden. Der Nachweis HCV-spezifischer Antikörper ist bei der Mehrzahl der HCV-infizierten Personen erst innerhalb von acht bis sechzehn Wochen nach Infektion im Serum möglich. Dagegen kann mit Hilfe der RT-PCR HCV-RNA innerhalb der ersten Woche nach Infektion im Patientenserum nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der viralen Leberzellschädigung durch das Hepatitis C Virus bis hin zur Entstehung hepatozellulärer Karzinome ist zur Zeit noch nicht geklärt. Der Aufbau eines *in vitro* Replikationssystems für HCV sollte Untersuchungen zur Pathogenese des Virus ermöglichen. Die Replikation des Virus und somit auftretende Virusfluktuationen sollten mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR festgestellt und überwacht werden. Daher sollte aufbauend auf die qualitative RT-PCR zum HCV-Nachweis eine quantitative kompetitive RT-PCR etabliert werden. Mit Hilfe dieser PCR sollten zusätzlich Untersuchungen über den Zusammenhang von Virustiter und Krankheitsverlauf (z. B. unter  $\alpha$ -Interferontherapie) durchgeführt werden, welche möglicherweise ebenfalls Aussagen über pathogene Mechanismen des Virus zulassen. Das hierzu benötigte Patientenmaterial (Serum von HCV-infizierten Patienten ohne und mit Interferonbehandlung) sollte von der Universitätsklinik Frankfurt in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. Zeuzem zur Verfügung gestellt werden.

Weiterhin sollte der direkte Einfluß des Hepatitis C Virus auf die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen untersucht werden. Hierzu sollten mit Hilfe der PCR HCV-Isolate aus dem Tumorgewebe mit Isolaten aus dem Peritumorgewebe verglichen werden. Möglicherweise vorkommende Sequenzvariabilitäten zwischen Isolaten aus Tumor- und Peritumorgewebe sollten in geeigneten Malignitätstests auf ihr transformierendes Potential hin untersucht werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

Agarose-Gelapparaturen	Gibco BRL
Analysenwaage	Sartorius, R 160P-D1
Autoklav	Integra Biosciences, Technomara GmbH
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -begast	Sanyo, MCO-17 AI
Elektrophorese-"power supply", ST 606	Gibco BRL
Filmentwicklungseinrichtung	Koch & Sterzel
Foto-Apparatur	Polaroid
Hybridisierungsöfen	Biometra
Hyperfilm ECL	Amersham
Kühlzentrifuge	Beckmann, J2-21
Laserdensitometer	Molekular Dynamics, Image Quant <sup>TM</sup> , Krefeld
Magnetständer	Dynal
Mikroskop, Axiovert 100	Zeiss
Mikrowellenofen	Sharp
pH-Meßgerät	Knick Calimatic 761
Schüttelinkubator	Certomat®U, B. Braun
Schüttler, Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Semi-dry-Blotter, Multiphor II	Pharmacia
Sequenzierautomat, 370A	Applied Biosystems
Slot-Blot-Apparatur	Millipore
Spektrophotometer	Beckmann DU-64
Sterilbänke	Clean Air Typ CA/RE14, Haan Envirco, Ceag Shisp, Reinraumechnik
Thermomixer, 5436	Eppendorf
Thermocycler	Perkin Elmer 480
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf

Transilluminator, FLX-20M	Fröbel
UV-Linker	Stratagene
Vertikal-Gelelektrophoresekammer	Protean II, Biorad
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL 1083

## 2.2 Verzeichnis der Chemikalien und Biochemikalien

Sofern nicht anders angegeben, liegt die Reinheit der verwendeten Chemikalien bei > 98 % (pro analysi).

Acrylamidlösung 40	Roth
Agarose (FMC Seakem LE)	Biozym
AmberlitMB-1	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
BSA	Boehringer Mannheim
Chloroform	Merck
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMSO	Sigma
dNTP(10mM)	Applied Biosystems
DTT	Boehringer Mannheim
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (absolut)	Riedel de Hën
Ethidiumbromid	Merck
Ficoll	Pharmacia
Forinamid	Sigma
Glycerin	Roth
Glykogen	Boehringer Mannheim

---

Harnstoff	Roth
Isopropanol	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid 25 mM	Perkin Elmer
Mineralöl	Perkin Elmer
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat-Trihydrat	Merck
Natriumhydroxid (flüssig)	Merck
Natriumhydroxid (Plättchen)	Merck
PCR-Puffer (10x)	Perkin Elmer bzw. Boehringer Mannheim
Phenol/Chloroform/H <sub>2</sub> O-Gemisch	Applied Biosystems
Reinstwasser	Millipore
rNTP(10mM)	Boehringer Mannheim
Saccharose	Roth
Salzsäure	Riedel de Hën
SDS	Merck
TEMED	Serva
Tris-Base	USB
Tris-HCl	Roth
Trisolv	Angewandte Gentechnologie. Systeme GmbH
t-RNA	Boehringer Mannheim
Triton-x100	Serva
Tween 20	Merck
Xylol	Roth
X-Gal	Roth

### 2.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

Eco RI	Boehringer Mannheim
Apal	Pharmacia
XhoI	Boehringer Mannheim
BamHI	Boehringer Mannheim

Weitere. Enzyme:

Alkalische Phosphatase	Serva
Lysozym	Sigma
(angesetzt in einer Stammlösung von 50 mg / ml in sterilem H <sub>2</sub> O)	
Proteinase K	Boehringer Mannheim
(angesetzt in einer Stammlösung von 10 mg / ml mit DEPC-behandeltem H <sub>2</sub> O)	
DNase(RQ1)	Promega
Reverse Transkriptase	Gibco, BRL
RNase	Boehringer Mannheim
RNase Inhibitor	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	Invitrogen / Promega
<i>Taq</i> -Polymerase	Boehringer Mannheim
Trypsin/EDTA 10x	Gibco, BRL

### 2.4 Membranen

Tropilon - 45 <sup>TM</sup>	Serva
Tropilon-plus	Serva
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll

## 2.5 DNA

DNA-Molekulargewichtsmarker VI      Boehringer Mannheim  
(pBR328 DNA, Bgl I und Hinf I geschnitten)

Random Hexamere      Perkin Elmer-

## 2.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden zum Teil der Literatur entnommen oder direkt aufgrund vorhandener HCV-Sequenzen (EMBL-Datenbank) ausgewählt. Die Primer wurden am Georg-Speyer-Haus von Herrn Dr. H. Kühnel mit dem ABI 381 Synthesizer (Applied Biosystems) oder von den Firmen Pharmacia und Biometra synthetisiert. Modifizierte Primer (5'-Biotin) bzw. Primer mit mehr als 40 Basen wurden HPLC-gereinigt von den genannten Firmen geliefert.

Tab. I: Primer

Primer	Nukleotidsequenz (5' →3')	Anlagerungs- temperatur (°C)	Nukleotid- position*
<b>5'-NC region</b>			
A1 <sub>sense</sub>	ACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT	50	-285 - -256
A1 <sub>antisense</sub>	<sup>1)</sup> <u>CCTCAACACAGTTTGAGGCGGCGCCGGGG</u> -GGTCCTGGAGGCTGCACGACA		-217 - -241
A2 <sub>sense</sub>	<sup>1)</sup> <u>GGCGCCGCCTCAA</u> ACTGTGTTGAGGCGGAA -CCGGTGAGTACACCGGAATT	50	-191 - -167
A2 <sub>antisense</sub>	CGAGACCTCCCGGGGCACTCGCAAGCACC		-14 - -43
B <sub>sense</sub>	ACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGT	72	-276 - -245
B <sub>antisense</sub>	TCCCGGGGCACTCGCAAGCACCCTATCAGG		-21 - -50
C <sub>sense</sub>	CGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTC.TCG	72	-265 - -236
C <sub>antisense</sub>	CTCGCAAGCACCCTATCAGGCAGTACCACA		-31 - -60
B/CO <sub>antisense</sub>	CGTCCTGTGGGCGACGGTTGGTGTACG	72	37 - 64
T7-A1 <sub>sense</sub>	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGTCT- TCACGCAGAAAGCGTCTAGC	50	-285 - -256
A1 <sub>antisense</sub> -Oligo- dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAGACCTCCC- GGGGCACTCGCAAGCACCC	50	-14 - -43
C-HCV	(B)-CAGACCACTATGGCTCTCCCGGGAG	50	-216 - -192
C-Standard	(B)-CCTCAACACAGTTTGAGGCGGCGCC	50	
<b>Core region</b>			
C1 <sub>external sense</sub>	GTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGAT	50	-45 - -74
C1 <sub>external antisense</sub>	CAGCTAGGCCGAGAGCCACGGGGAG		297 - 321
C1 <sub>internal sense</sub>	AGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCT	50	-37 - -66
C1 <sub>internal antisense</sub>	AGCCACGGGGAGACAGGAGCCATCC		284 - 309
C2 <sub>antisense</sub>	GTTGCATAGTTCACGCCGTCTCCAGAACC	50	469 - 498
C <sub>ges. antisense</sub>	TTATTAAGAGCAACCAGGAAGGTTCCCTG	45	498 - 520
C <sub>überlan</sub>	CAGGAAGGTTCCCTGTTGCATAGTTCACGC	45	483 - 512
<b>NS-5 region</b>			
N5/1 <sub>external sense</sub>	TGGGGTTCTCGTATGATACCCGCTGCTTTG	50	7904 - 7933
N5/1 <sub>external antisense</sub>	TTCACGGAGGCTATGACCAGGTACTCCGCC		8275 - 8304
N5/1 <sub>internal sense</sub>	CTCCACAGTCACTGAGAGCGACATCC	55	7935 - 7960
N5/1 <sub>internal antisense</sub>	GGCGAGCCTGAGAGCCTTACGGAGGCTAT		8259- 8288
N5/2 <sub>external sense</sub>	GGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTG	50	8209 - 8233
N5/2 <sub>external antisense</sub>	CCTTATAGCCAGGGACCAGCTTGAA		8555 - 8579
N5/2 <sub>internal sense</sub>	GTTATCTGTGAAAGCGCGGGGGTCC	50	8224 - 8248
N5/2 <sub>internal antisense</sub>	CCATTTCTTTAGCGTCCTTATAGCC		8540 - 8564
T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAC	50	
Sp6	TAGATGCATGCTCGAGCGGCGCC	50	

\*Die HCV Oligonukleotide sind auf HCV-RNA-Nukleotidpositionen bezogen und nach Choo et al. (1989) nummeriert.

1) unterstrichen = nicht zu HCV komplementäre Standard-Sequenz

(B) = Biotin



## 2.7 Patientenmaterial

Das für die verschiedenen Versuchsansätze benötigte Patientenmaterial (Serum, Leberbiopsien, Lebergewebe) stellte die Medizinische Klinik n der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, zur Verfügung. Die histologische Untersuchung der Gewebeproben führte Herr PD Dr. med. Herrmann am Senckenbergischen Zentrum für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität durch.

## 2.8 Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *E.coli* K-12 Stämme verwendet:

Tab. 2: Verwendete Stämme von *E.coli*

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Firma</i>
JM109	<i>endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r<sup>-k</sup>, m<sup>+k</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Promega
INVαF'	<i>endA1, recA1, hsdR17(r<sup>-k</sup>, m<sup>+k</sup>), supE44, λ<sup>-</sup>, thi-1, gyrA, relA1, Φ80lacZαΔM15Δ(lacZYA-argF), deoR+, F'</i>	Invitrogen (Stamm ist abgeleitet von DH5a)

## Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

<i>Plasmid</i>	<i>Größe</i>	<i>Marker</i>	<i>Firma</i>
pGEM® -T	3004 bp	<i>amp<sup>r</sup></i>	Promega
pCR™ II	3932 bp	<i>amp<sup>r</sup>, km<sup>r</sup></i>	Invitrogen
pcDNA3	5400 bp	<i>amp<sup>r</sup>, neo<sup>r</sup></i>	Invitrogen

**Medien für die Bakterienkultur**

Die aufgeführten Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. In sterilem Zustand benötigte Lösungen wurden 30 Minuten bei 1 bar, Medien für 20 Minuten autoklaviert.

LB-Medium:	Fertigpulver der Firma Gibco BRL	25 g
	(10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl)	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
LB-Agar:	Fertigpulver der Firma Gibco BRL	37 g
	(10 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 12 g Agar)	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
SOC-Medium:	Fertigmedium der Firma Invitrogen	
	(20 g Pepton aus Fleisch, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 0,186 g KCl, 2,4 g MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O, 20 mM Endkonzentration Glukose) bezogen auf 1 l.	

Ampicillin wurde als konzentrierte Stamm-Lösung (40 mg / ml) angesetzt, steril filtriert und bei -20° C aufbewahrt. Die Endkonzentration an Ampicillin in Platten bzw. in Flüssigmedium betrug 40 µg / ml.

## 2.11 Material und Medien für die eukaryontische Zellkultur

### 2.11.1 Zelllinien

- Molt 4 (Humane Lymphoblasten (Leukemiezellen), ECACC-Nr. 8501 1413, GSH-Stammsammlung)
- Raji (Humane Zellen aus einem Burkitt's Lymphom, ECACC-Nr. 85011429, GSH-Stammsammlung)
- Hep3B (Epitheliale Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms, HBsAg-positiv, GSH-Stammsammlung)
- HepG2 (Epitheliale Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms, GSH-Stammsammlung)
- Huh7 (Epitheliale Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms, Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Theilmann, Universität Heidelberg)
- NIH3T3 (Embryonale Mäusefibroblasten, kontaktinhibiert, ATCC CRE 1658, GSH-Stammsammlung)
- Fisher-rat1 (Embryonale Rattenfibroblasten, kontaktinhibiert, Thymidin-Kinase-Mutante, GSH-Stammsammlung)
- immortalisierte Hepatozyten (Stammsammlung Strauß, Berlin)
- PBML (über Ficoll-Gradienten aus Blut aufgereinigt)
- primäre humane Hepatozyten (Zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Chirurgie der Universität Frankfurt / Main)

### 2.11.2 Allgemein verwendete Zellkulturmaterialien

Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Falcon / Greiner
Gewebekulturschalen (0 35 mm, 94 mm)	Falcon / Nunc
Mikrotiterplatten, 6 Vertiefungen	Costar
Auslaufpipetten, Kunststoff (1, 5, 10 ml)	Falcon / Greiner
Zellschaber	Costar
Zählkammer	Greiner
Eintrierröhrchen, 1,8ml	Nunc

---

Fötales Kälberserum	Gibco, BRL
Dulbeccos PBS	Gibco, BRL
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 14 und 50 ml	Falcon
RPMI-1640 Medium	Gibco, BRL
Dulbeccos MEM (DMEM)	Gibco, BRL
10xDulbeccos MEM	Gibco, BRL
Glutamin	Gibco, BRL
High Density Lipoprotein (HDL)	Sigma
Low Density Lipoprotein (LDL)	Sigma
Very Low Density Lipoprotein (VLDL)	Sigma
Polyethylenglykol (PEG, MW 6000)	Riedel De Haen
Lipofektamin	Gibco, BRL
Antibiotik / Antimykotik-Lsg. (Penicillin, Streptomycin, Fungizone)	Gibco, BRL
Geneticin	Gibco, BRL
Natriumcarbonat (7x flüssig)	Gibco, BRL
Natriumpyruvat	Gibco, BRL
Agar	Difco

#### Gefrierschutzmedium

FCS plus 10 % DMSO

### **2.11.3 Material und Medien für die Transfektion**

Für die Transfektion von NIH/3T3- bzw. Fisher-rat 1-Zellen wurde DMEM-Medium ohne Zusatz von Antibiotika eingesetzt. Pro 1 µg DNA wurden 5 µl Lipotektamin (2 mg / ml) zugegeben.

#### 2.11.4 Material und Medien für die Selektion auf Geneticin-Resistenz

Zum Selektieren der erfolgreich transformierten Zellen wurde dem Medium Geneticin

zugesetzt:	NIH/3T3	800 mg / ml
	Fisher-rat1	400 mg / ml

#### 2.11.5 Material und Medien für den Weichagar-Koloniebildungstest

1 % Agar

2x DMEM-Medium

1x DMEM-Medium

#### 2.1.2 Allgemein verwendete Puffer

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

TBE:	5-fach konzentriert	
	Tris-HCl, pH 8,0	445 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
	Borsäure	445 mM

DNA-Proben-Puffer:	Bromphenolblau	30 mM
	Saccharose	1750 mM
	EDTA, pH 8,0	20 mM
	Harnstoff	6000 mM

Für Arbeiten mit RNA wurde Diethylpyrocarbonat(DEPC)-behandeltes Wasser eingesetzt, 1 g DEPC wurde in einem Liter deionisiertem H<sub>2</sub>O bei 37°C über Nacht gelöst und anschließend für 30 Minuten bei 1 bar autoklaviert.

### **3       METHODEN**

#### **3.1       Allgemeine Methoden**

##### **3.1.1     Extraktion von HCV-RNA aus Serum mittels Trisolv**

Die Patientenseren wurden unter einer Sterilbank aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt. Für die Extraktion von HCV-RNA aus Patientenseren wurde jeweils 100 µl Serum eingesetzt.

Zur Isolierung von HCV-RNA wurden zu 100 µl Serum 500 µl Trisolv und 1,5 µl Glykogen (entspricht 30 µg) gegeben, 15 s gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben und erneut 15 s gemischt. Nach 2minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4°C und 12300 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 250 µl eiskalter Isopropanol (-20° C) zugegeben. Ein erneuter Zentrifugationsschritt folgte bei gleichen Bedingungen. Anschließend wurde das Präzipitat mit 75 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

##### **3.1.2     Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Da es sich bei HCV um ein Virus mit einzelsträngiger RNA als Erbsubstanz handelt, erfolgte vor der eigentlichen Amplifikation von Virus-Sequenzen eine Umschreibung der Virus-RNA in cDNA (reverse Transkription).

###### **3.1.2.1   Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription der 5'-NC-Region von HCV-RNA in cDNA wurde der Antisense-Primer eingesetzt; für alle anderen Umschreibreaktionen von RNA in cDNA wurden random synthetisierte Hexamere (randome Hexameres) als Primer (Perkin Eimer) verwendet.

Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 37°C (bei Verwendung der random Hexamere) bzw. 42°C (bei Einsatz des Antisense-Primers) in einem Hybridisierungs-Ofen. In Tabelle 4 ist das Pipettierschema für die reverse Transkription dargestellt.

Tab. 4: Pipettierschema des reversen Transkriptions-Ansatzes

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer (Perkin Elmer)	2 µl	10 mM Tris-HCl, pH8,3; 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl	5 mM
dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)	4 µl	500 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	6,75 µl	
Primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Reverse Transkriptase	0,25 µl	10 U
RNase Inhibitor	0,5 µl	100 U
Template-RNA	2 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

### 3.1.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Tab. 5: Pipettierschema einer einfachen PCR-Reaktion (One-Tube-PCR bzw. I. PCR)

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer (Boehringer Mannheim)	4 µl	10 mM Tris-HCl, pH8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
DEPC-H <sub>2</sub> O	24,75 µl	
Primer <sub>sense</sub> (10µM)	0,5 µl	0,1 µM
Primer <sub>antisense</sub> (10µM)	0,5 µl	0,1 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,25 µl	1,25 U
cDNA (aus RT-Ansatz)	20 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Für die Amplifikation der meisten HCV-Genombereiche wurde eine "nested"-PCR durchgeführt. Hierzu wurde eine PCR, wie in Tabelle 5 dargestellt, durchgeführt (I. PCR). Als

Primer für die I. PCR dienten die mit "external", bezeichneten Oligonukleotide. Anschließend wurden 10 µl der ersten Amplifikationsreaktion als Template für eine 2. Amplifikation (II. PCR, siehe Tabelle 6) eingesetzt. Diese Reaktion wurde mit den "internal" Primern durchgeführt. Da die verwendeten "internal" Primer innerhalb der in der I. PCR amplifizierten Region liegen, spricht man von einer "nested"-PCR. Die Zyklenzahl einer einfachen PCR betrug im Normalfall 50 Zyklen. Bei einer nested-PCR wurden je 35 Zyklen in der I. und in der II. PCR durchgeführt.

Tab. 6: Pipettierschema einer "nested"-PCR-Reaktion (II. PCR)

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer (Boehringer Mannheim)	4 µl	10 mM Tris-HCl, pH8,3; 50 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
DEPC-H <sub>2</sub> O	34,75 µl	
Primer <sub>sense</sub> (10 µM)	0,5 µl	0,1 µM
Primer <sub>antisense</sub> (10 µM)	0,5 µl	0,1 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,25 µl	1,25 U
Amplifikat der I. PCR	10 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Eine Variante der oben dargestellten nested-PCR stellt die Booster-PCR dar. Bei dieser PCR wurde nach der ersten Amplifikationsrunde (Durchführung siehe "einfache PCR" (I. PCR)) zu dem Reaktionsgemisch 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase und jeweils 0,5 µl des zweiten Primerpaares (10 µM Ausgangskonzentration) zugegeben und für weitere 35 Zyklen amplifiziert.

Eine PCR, bei welcher die reverse Transkription und die Amplifikation in dem selben Puffer durchgeführt wird, stellt die Single-Step-PCR (Tabelle 7) dar. Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 37°C bzw. 42°C (je nach eingesetztem Primer). Nach Erhitzen auf 95°C (Inaktivierung der RT und Denaturierung des gebildeten RNA-DNA-Hybrid) wurde direkt - ohne das Reaktionsgefäß öffnen zu müssen - die PCR angeschlossen.



Tab. 7: Pipettierschema einer "Single-Step-PCR"

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer (Perkin Elmer)	2 $\mu$ l	10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l	5 mM
dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)	4 $\mu$ l	500 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	6,15 $\mu$ l	
Primer (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,25 $\mu$ M
Reverse Transkriptase	0,25 $\mu$ l	10 U
RNase Inhibitor	0,5 $\mu$ l	100 U
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,1 $\mu$ l	0,5 U
Template-RNA	2 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l	

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten (aufgereinigte PCR-Produkte, Plasmide) wurden im Allgemeinen 25 Zyklen durchgeführt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Pipettierschema für eine DNA-PCR

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10x-PCR-Puffer (Boehringer Mannheim)	5 $\mu$ l	10 mM Tris-HCl, pH8,3; 50 mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)	4 $\mu$ l	500 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	37,75 $\mu$ l	
Primer <sub>sense</sub> (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,1 $\mu$ M
Primer <sub>antisense</sub> 10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,1 $\mu$ M
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,25 $\mu$ l	1,25 U
DNA	2 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l	

Die Anlagerungstemperaturen für die verschiedenen PCR-Primer sind in der Tabelle 1 angegeben. Ein Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten: Denaturierung des PCR-Produktes, Anlagerung der Primer und Elongation der Primer mittels *Taq*-Polymerase. Die Zeiten für die einzelnen PCR-Schritte waren:

---

Denaturieren (95° C)	40s
Anlagern der Primer	40s
Elongation mittels der <i>Taq</i> -Polymerase (72° C)	40s

Die PCR-Reaktionen wurden im Allgemeinen in einem PE 9600 Cycler (Perkin Eimer, Langen, FRG) durchgeführt. Bei Verwendung des PE 480 Cyclers (Perkin Eimer, Langen, FRG) wurden die Zeiten der einzelnen PCR-Schritte auf 1 min ausgedehnt. Nach Einsetzen der Probengefäße wurden die Reaktionsgemische 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach dem letzten Zyklus wurden 10 Minuten 72°C angeschlossen. Die 10 Minuten lange Elongation nach dem letzten Zyklus sollte eine vollständige DNA-Synthese gewährleisten.

Abweichungen von den genannten Angaben sind bei der entsprechenden Methode vermerkt.

### 3.1.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung von PCR-Produkten (ca. 200 bis 600 bp) wurden 2 %ige Agarosegele eingesetzt. Zur Auftrennung von Plasmidmolekülen wurden 1 %ige Gele genutzt.

Für ein 2 %iges Agarosegel wurde 1,4 g Agarose in 70 ml 0,5xTBE-Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen, 2 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg / ml) zugegeben und nach Abkühlung auf etwa 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Anschließend wurden ein bis zwei Probenkämme mit 14 bzw. 20 Zähnen eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in die mit 0,5xTBE-Puffer aufgefüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt, und die mit DNA-Proben-Puffer versetzten Proben in die Geltaschen gegeben. Zur Bestimmung der Größe diente der DNA-Längenstandard VI der Firma Boehringer Mannheim. Die DNA-Fragmente wurden mit einer Feldstärke von etwa 1 bis 5 V / cm<sup>2</sup> getrennt. Anschließend wurden die Banden im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht, da das zugegebene Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und im UV-Licht intensiv orange fluoresziert.

### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 3.1.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA wurde photometrisch durchgeführt. Hierzu wurde die Absorption der Nukleinsäure bei 260 und 280 nm gemessen. Ein Absorptionsverhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  von 1,8 bis 2,0 bedeutete, daß die Nukleinsäure frei von Proteinen war (Ausubel et al. 1990).

Berechnung der Konzentration:

Doppelstrang-DNA:  $1 A_{260} = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$

RNA:  $1 A_{260} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$

#### 3.1.3.2 Bestimmung der Primerkonzentration

Die Primerkonzentration wurde durch photometrische Messung bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde folgende Gleichung eingesetzt:

$$\frac{\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100}{1,54 \times \text{Adenin} + 0,75 \times \text{Cytosin} + 1,17 \times \text{Guanin} + 0,92 \times \text{Thymin}} = x \mu\text{M}$$

Für die PCR wurden die Primer auf eine Ausgangskonzentration von  $10 \mu\text{M}$  eingestellt.

### 3.1.3.3 Entsalzen der Oligonukleotide

Zum Entsalzen der am Haus synthetisierten Oligonukleotide wurden mit Sephadex G-35 gepackte NAP<sup>TM</sup>-10-Säulen der Firma Pharmacia verwendet.

Hierzu wurde die Säule dreimal mit je 5 ml DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O äquilibriert. Anschließend wurde 1 ml des Primers aufgetragen. Die Elution der Oligonukleotide erfolgte mit 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O.

### 3.1.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenterminationsmethode von Sanger et al. (1977).

Die von der *Taq*-DNA-Polymerase (Ampli *Taq*-DNA-Polymerase) katalysierte Sequenzreaktion (*Taq*-Cycle-Sequencing) wurde in einem Perkin-Elmer "DNA Thermal Cycler 480" durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels des Applied Biosystems Sequencer 370A. Bei der hier durchgeführten Methode werden Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide eingesetzt. Aufgrund der jeweils unterschiedlichen Markierung der vier Didesoxynukleotide kann die Basenabfolge in einer einzigen Elektrophoresespur detektiert werden. Hierbei werden die Markierungen durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und von einem Detektionsgerät empfangen. Anschließend werden die so erhaltenen Daten mittels Computer analysiert.

#### 3.1.4.1 Reinigen der PCR-Produkte für die Sequenzreaktion

Die erhaltenen Amplifikate mußten vor der Sequenz-PCR von Enzym, Primerresten und Nukleotiden gereinigt werden. Die Reinigung erfolgte mittels Centricon-100-Säulen (Amicon). Die Centricon-Säulen wurden laut Vorschrift des Herstellers zusammengesetzt. Anschließend wurden 40 µl Amplifikat in 1,5 ml steriles H<sub>2</sub>O gegeben und auf die Säule aufgetragen. Die Öffnung wurde mit Parafilm verschlossen, und die Säule für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann-Kühlzentrifuge, JA20-Rotor). Da die Zentrifugation in einem Festwinkelrotor durchgeführt wurde, blieb eine definierte Menge (40 bis 50 µl) über dem Filter stehen. Das untere Auffanggefäß wurde entfernt, der Filter umgedreht auf ein entsprechendes

Auffanggefäß aufgesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1000 rpm und 4°C. Die Auffanggefäße enthielten nun 40 bis 50 µl des aufgereinigten Amplifikates.

### 3.1.4.2 Sequenzreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem "Prisma-Sequencing-Kit" der Firma Applied-Biosystems durchgeführt. Der Kit enthält neben den benötigten Nukleotid-Gemischen und Puffern die *Taq*-Polymerase, welche die Polymerisationsreaktion katalysiert. Pro Amplifikat wurden zwei Sequenzreaktionen angesetzt, um die Sequenz des sense- und antisense-Stranges zu ermitteln. Zu 9,5 µl Sequenzmix (*Taq*-Polymerase schon enthalten) wurden 0,5 µl Primer (Ausgangskonzentration 10 µM) und je nach Konzentration des PCR-Produktes 4 bis 9 µl Amplifikat gegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und mit 40 µl Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem 480-Cycler von Perkin Elmer für 30 Zyklen durchgeführt.

Amplifikationsbedingungen:

Denaturierung des PCR-Produktes:	95°C	30 sec
Anlagerung der Primer:	50°C	15 sec
Elongation der Polymerase:	60°C	4 min

### 3.1.4.3 Aufreinigen der Sequenzamplifikate

Um nicht-eingebaute markierte Didesoxynukleotide abzutrennen, wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Sequenziergel mittels eines Phenol-Chloroform-Wasser-Gemisches (Applied-Biosystems) aufgereinigt.

Hierfür wurden zu 20 µl Reaktionsprodukt 80 µl steriles H<sub>2</sub>O gegeben, gut gemischt und kurz zentrifugiert. Die 100 µl Amplifikat-Wasser-Gemisch wurden zu 100 µl des Phenol-Chloroform-Wasser-Gemisches pipettiert, gemischt und für 5 min bei 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nochmals zu 100 µl Phenol-Chloroform-Wasser-Gemisch gegeben und bei gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß wurden 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 320 µl Ethanol (absolut) zugegeben und gut gemischt. Im

Anschluß erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 20 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 75 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Präzipitat bei Raumtemperatur gut getrocknet war, konnte es für längere Zeit (bis zu einem Monat) bei -20° C aufbewahrt werden.

#### **3.1.4.4 Herstellen des Sequenzgels (6 %iges Polyacrylamidgel mit 8,3 M Harnstoff)**

Zu 30 g Harnstoff wurden 9 ml einer 40 %igen Acrylamidlösung und 23,5 ml steriles H<sub>2</sub>O pipettiert. Um den Harnstoff zu lösen, wurde das Gemisch auf 50°C unter Rühren erhitzt. Nach dem Auflösen wurde 1 g Amberlite zugegeben, weitere 10 min bei 50°C inkubiert, um störende Ionen zu entfernen, dann die Lösung filtriert (Filterpapier von Schleicher & Schüll) und schließlich 6 ml 10xTBE (ebenfalls filtriert), 180 µl 10 %ige frisch angesetzte APS-Lösung und 24 µl TEMED zugegeben. Die Lösung wurde sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt (Polymerisationszeit etwa 2 Stunden).

#### **3.1.4.5 Elektrophorese und Detektion**

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, die Glasplatten noch einmal von außen gut gesäubert und für etwa 15 Minuten eine Spannung von 1700 V angelegt, um eine Betriebstemperatur von 50°C zu gewährleisten. Die präzipitierten, aufgereinigten Proben wurden in 4 µl Ladepuffer gelöst (40 µl deionisiertes Formamid plus 8 µl 50 mM EDTA, pH 8,0), im Wasserbad 5 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1700 V. Die aufgetrennten Sequenzproben wurden beim Gellauf mit einem Scanner abgelesen. Das verwendete Software-Programm analysierte die Daten, so daß die anschließend erhaltenen Sequenzdrucke direkt ausgewertet werden konnten.

### **3.1.4.6 Auswertung der Sequenzdaten**

Die Auswertung der Sequenzdaten (Nukleinsäuresequenz und sich ergebende Proteinsequenz) erfolgte mittels des Computerprogramms PC-Gene.

## **3.2 Quantifizierung von Hepatitis C Virus RNA**

### **3.2.1 Synthese des HCV-RNA-Standards**

#### **3.2.1.1 Isolierung und Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Isolierung der synthetisierten PCR-Fragmente für die Generierung von Standard-cDNA erfolgte mittels Elutip-d (Ionenaustauscher-Säule) von der Firma Schleicher & Schüll. 40 µl des PCR-Produktes wurden auf ein 2 %iges "low-melting"-Gel aufgetragen und nach Auftrennung die gewünschte DNA-Bande mittels eines sterilen Skalpell herausgeschnitten. Zu dem ausgeschnittenen Gelblock wurden 5 ml Niedrig-Salz-Puffer gegeben. Anschließend wurde der Gelblock bei 65°C für 10 Minuten im Wasserbad geschmolzen. In der Zwischenzeit wurde eine 5 ml Spritze mit 2 ml Hoch-Salz-Puffer gefüllt. Nach Entfernen der Spitze der Elutip-d-Säule wurde die Säule auf die Spritze aufgesteckt und die Hoch-Salz-Lösung zum Äquilibrieren der Säule langsam durch die Säule gedrückt. Anschließend wurden 5 ml des Niedrig-Salz-Puffers in eine frische Spritze gegeben und die Elutip-d-Säule auf die Spritze aufgesteckt. Um den Hoch-Salz-Puffer zu entfernen, wurde der Niedrig-Salz-Puffer nun langsam durch die Säule gedrückt. Anschließend wurde die Säule von der Spritze entfernt und ein 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter zwischen Spritze und Filter eingebaut. Danach wurden die 5 ml DNA-Lösung in die Spritze gegeben und langsam durch den Filter und die Säule gedrückt, damit die Nukleinsäure sich an die Matrix binden konnte. Die Durchflußrate lag bei 1 bis 2 ml pro Minute. Anschließend wurde die Spritze mit 3 ml des Niedrig-Salz-Puffers gefüllt und dieser ebenfalls durch den Filter und die Elutip-d-Säule gedrückt. Zum Eluieren der DNA wurde der Filter von der Elutip-d-Säule entfernt und eine Spritze mit 0,4 ml Hoch-Salz-Puffer gefüllt. Nach Aufstecken der Säule auf die Spritze wurde der Puffer vorsichtig durch die Säule gedrückt und in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die darin enthaltene DNA wurde mit zwei Volumeneinheiten 100 %igem eiskaltem Ethanol (-20° C) gefällt und bei 13000 rpm für 20 min und 4°C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Niedrig-Salz-Puffer:	NaCl	200 mM
	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	EDTA	1 mM
Hoch-Salz-Puffer:	NaCl	1M
	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	EDTA	1mM

### 3.2.1.2 Kombinierte Hybridisierungs- und PCR-Reaktion

Für die Synthese des HCV-Standards wurden zunächst mit den Primern A1<sub>sense</sub> und A1<sub>antisense</sub> bzw. A2<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> zwei separate PCR-Produkte hergestellt, welche eine 25 Basen umfassende, überlappende komplementäre Sequenz besitzen (Primer siehe Tabelle 1). In einer folgenden kombinierten Hybridisierungs- und PCR-Reaktion wurden die beiden PCR-Produkte miteinander verknüpft. Hierzu wurde jeweils 1 µl der aufgereinigten PCR-Produkte in PCR-Puffer mit den Primern A1<sub>sense</sub> und A1<sub>antisense</sub> (siehe Tabelle 1) gegeben. Nach Denaturierung der PCR-Produkte bei 95°C für 1 Minute erfolgte die Hybridisierung der überlappenden Sequenzen und die Anlagerung der Primer bei 45°C für 2 Minuten. Die anschließende Elongationszeit für die *Taq*-Polymerase betrug 2 Minuten bei 72° C. Nach 25 Zyklen wurde das resultierende PCR-Produkt (272 bp) in einem 2 %igen Agarosegel analysiert.

### 3.2.1.3 Selektion des HCV-cDNA-Standards mittels Dynabeads

Um die synthetisierte Standard cDNA zu selektieren, wurde ein biotinyliertes Oligonukleotid mit der entsprechenden ausgetauschten Standard-Sequenz hergestellt. Mittels der 5'-Biotinylierung wurde die zur Standard-Sequenz komplementäre Sequenz (25 Basen) an Dynabeads M-280-Streptavidin (DynaL, Hamburg, FRG) gekoppelt. Zu diesem Zweck wurden die Dynabeads M-280-Streptavidin durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und 50 µl (etwa  $3 \times 10^7$  Dynabeads) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mittels eines Separators



(Reaktionsgefäßständer mit Magnet) wurden die Dynabeads an die Seitenwand des Reaktionsgefäßes gebunden, so daß der Überstand (PBS pH 7,4; 0,1 % BSA; 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ) abgezogen werden konnte. Nach zweimaligem Waschen mit PBS, pH 7,4 ; BSA 0,1 %, wurden die Dynabeads in 500  $\mu\text{l}$  des gleichen Puffers gelöst.

Für die Beschichtung der Dynabeads mit der 25 Basen umfassenden Standard-Sequenz wurden 50  $\mu\text{l}$  der zuvor gereinigten Beads zu 25  $\mu\text{l}$  des biotinylierten Oligonukleotides (0,1 nmol /  $\mu\text{l}$ ) gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die beschichteten Beads dreimal mit 5 mM Tris-HCl, pH 8; 0,5 mM EDTA pH 8; 1 M NaCl gewaschen, in 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und 75  $\mu\text{l}$  denaturierte Standard-cDNA (2 Minuten bei 95°C) zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei 68°C wurden die gebundenen cDNA-Stränge mittels Separator abgetrennt, und die Dynabeads mit den hybridisierten cDNA-Standards zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wurden die cDNA-Standards durch 5 minütige Inkubation bei 95°C und sofortigem Überführen auf Eis von den Dynabeads gelöst.

#### **3.2.1.4 Anhängen eines T7-Promotors und eines Poly-A-Schwanzes an die Standard-cDNA**

Um ein späteres Umschreiben der mittels Dynabeads gereinigten Standard-cDNA in RNA zu ermöglichen, wurde an die Sequenz des  $A1_{\text{sense}}$ -Primers ein 23 Basen umfassender T7-Promotor angehängt (T7- $A1_{\text{sense}}$ ; Sequenz siehe Tabelle 1). Als antisense Primer wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, welches der  $A2_{\text{antisense}}$ -Sequenz entsprach, jedoch am 5'-Ende eine Oligo-dT-Sequenz (20 Basen) besaß ( $A2_{\text{antisense}}$ -Oligo-dT). Zwei Mikroliter der gereinigten Standard-cDNA wurden mit diesen Primern in einer DNA-PCR amplifiziert (siehe 3.1.2.2.).

### 3.2.1.5 Abtrennen überschüssiger Primer mittels Centricon 100

Das Abtrennen überschüssiger Primer nach Beenden der PCR-Reaktion erfolgte durch Ultrazentrifugation mittels Centricon 100 Säulen (Amicon, Witten). Hierbei wurden niedermolekulare von hochmolekularen Lösungsbestandteilen durch Filtration mit einem feinporigen Filter in einem Schwerefeld getrennt. Zur Trennung der PCR-Produkte von den Primern verwendet man Filter, die Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 100 kD zurückhalten. Hierzu wurden 40 µl des PCR-Produktes in 1,5 ml H<sub>2</sub>O gegeben und auf die Säulen aufgetragen. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 1935 g. Anschließend wurde der Filter mit dem zurückgehaltenen aufgereinigten Amplifikat gedreht und der Rückstand (ca. 50 µl) in ein aufgestecktes Reaktionsgefäß mit 195 g 5 Minuten herunterzentrifugiert.

### 3.2.1.6 Umschreiben von cDNA in RNA mittels T7-Polymerase

Die Umschreibung der HCV-Standard-cDNA erfolgte für 2 Stunden bei 37°C mittels T7-Polymerase (Promega) in einer Reaktion mit folgenden Bestandteilen (Tabelle 9).

Tab. 9: Pipettierschema für die Umschreibung von DNA in RNA

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
5x-T7-Polymerase-Puffer	10 µl	40 mM Tris-HCl, pH 7,9; 6 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl; 2 mM Spermidin
DTT	5 µl	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	12 µl	
rNTPs (Boehringer Mannheim)	10 µl	0,5 mM
RNase-Inhibitor	2 µl	80 U
T7-Polymerase	1 µl	10 U
DNA	10 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

### 3.2.1.7 Aufreinigen von RNA über Oligo-dT-Zellulose

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mittels Oligo-dT-Zellulose-Säulen der Firma Pharmacia nach Anleitung des Herstellers. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Puffer wurde von der Firma nicht beschrieben. Die Säulen wurden mehrmals gekippt, um die Oligo-dT-Zellulose zu resuspendieren. Anschließend wurde die Säule auf ein 15 ml Röhrchen gesetzt. Nach Ablauf des Lagerungspuffers wurde die Säule mit 1 ml Hoch-Salz-Puffer equilibriert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. In der Zwischenzeit wurden 130 µl RNA (gesammelt aus mehreren T7-Reaktionen) in 1 ml Elutions-Puffer gegeben und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA auf Eis gegeben und 0,2 ml Proben-Puffer dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde 1 ml des RNA-haltigen Puffers auf die equilibrierte Säule aufgetragen. Nachdem der Puffer durchgelaufen war, wurde für 2 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Anschließend wurde 2 x 0,25 ml Hoch-Salz-Puffer auf die Säule gegeben und jeweils, wie zuvor erwähnt, zentrifugiert. Nach dreimaliger Zugabe von Niedrig-Salz-Puffer und jeweiliger Zentrifugation wurde durch 4malige Zugabe von vorgewärmtem Elutionspuffer und jeweils anschließender Zentrifugation die RNA von der Säule, eluiert. Anschließend wurde die RNA nach Zugabe von 1,5 µl Glykogen mit doppeltem Volumen Ethanol für 2 Stunden bei -20°C gefällt.

### 3.2.1.8 DNase-Verdau

Tab. 10: Pipettierschema für den DNase-Verdau

Zusammensetzung	Volumen	Endkonzentration
10xDNase-Puffer	2 µl	40 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM NaCl 6 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub>
DNase	5 µl	5 U
RNase-Inhibitor	1 µl	40 U
DEPC-H <sub>2</sub> O	12 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Um noch eventuell vorhandene DNA von der RNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau bei 37°C für 1 Stunde durchgeführt (Tabelle 10). Die RNA wurde anschließend nach Zugabe von 1,5 µl Glykogen für 2 Stunden bei -20° C mit doppeltem Volumen Ethanol gefällt und in 100 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **3.2.2 Detektion und Auswertung der RT-PCR**

#### **3.2.2.1 Slot-Blot**

10 µl der PCR-Produkte wurden in 450 µl 0,5 M NaOH, 1,5 M NaClI denaturiert. Anschließend wurden 450 µl der einzelsträngigen DNA auf eine in 0,25 M Dinatriumphosphat-Puffer equilibrierte Nylonmembran mittels einer Slot-Blot-Apparatur aufgetragen. Danach wurde die DNA mittels eines UV-Linkers auf der Membran fixiert, und die Membran 2 x 5 Minuten mit 2 x SSC-Puffer gewaschen.

25 x SSC-Puffer:	219,0 g NaCl
	110,0 g NaCitrat
	ad 1000 ml

Dinatriumphosphat-Puffer (0,5 M):	44,5 g Dinatriumphosphat
pH 7,2	2 ml 85 % Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
	ad 500 ml

#### **3.2.2.2 Hybridisierung mit biotinylierten Sonden**

Die zuvor hergestellte Membran mit den fixierten DNA-Proben wurde erneut in Dinatriumphosphat-Puffer (siehe oben) equilibriert und anschließend in Hybridisierungs-Puffer für 1 Stunde bei 50°C in einem Hybridisierungsofen prähybridisiert. Nach Erneuerung des Hybridisierungs-Puffers und Zugabe von tRNA (0,25 mg / ml, zum Blockieren der Membran) und biotinylierter Sonde (1 nM), wurden die Proben für 2 Stunden bei 50°C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 Minuten in 2 x SSC, 1 % SDS bei Raumtemperatur unter kräftigem Schütteln gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte a 15 Minuten in 1 x SSC, 1 % SDS bei 55°C in einem Schüttelwasserbad. Anschließend wurde zweimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur in 1 x SSC gewaschen.

Nachfolgend wurde die Membran zweimal bei Raumtemperatur für 5 Minuten unter Schütteln in Blockierungs-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten in Blockierungs-Puffer bei Raumtemperatur.

Hybridisierungs-Puffer:     1 mM EDTA  
                                  25 mM Dinatriumphosphat  
                                  7 % SDS

10 x PBS:                     82,3 g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>  
                                  23,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                  40 g NaCl  
                                  ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

Blockierungs-Puffer:       0,6 g I-Block-Reagenz (Serva Tropix)  
(immer frisch ansetzen)   30 ml 10 x PBS  
                                  7,5 ml 2.0 % SDS  
Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt, in der Mikrowelle etwa 2 Minuten gelöst (etwa 80°C) und mit H<sub>2</sub>O auf 300 ml aufgefüllt.

### 3.2.2.3 Detektion der PCR-Produkte

Um die Hybridisierungsprodukte zu detektieren, wurde Alkalische Phosphatase mittels Avidin an die biotinylierte Sonde gekoppelt. Mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase wurde ein Chemilumineszenzsubstrat (CSPD) umgesetzt und durch Exposition eines Röntgenfilms die Hybridisierungsprodukte sichtbar gemacht. Nach Zugabe von 6 µl Avidx-AP (Konjugat aus Alkalischer Phosphatase und Avidin; Serva Tropic) zu 30 ml Blockierungs-Puffer wurde die in Blockierungs-Puffer inkubierte Membran (siehe Kapitel 3.2.2.2) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde einmal 5 Minuten in Blockierungs-Puffer, dreimal 5 Minuten in Waschpuffer und zweimal 2 Minuten in Assay-Puffer inkubiert. Anschließend wurden 25 µl CSPD als Substrat für die Alkalische Phosphatase in den Assay-Puffer gegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran faltenfrei in Frischhaltefolie eingepackt. Anschließend wurde in der Dunkelkammer für 1 Stunde bzw. über Nacht ein Film (ECL-Film, Amersham) aufgelegt.

Die Auswertung des Films erfolgte mittels eines Laser-Densitometers.

Wasch-Puffer:                    50 ml 10 x PBS  
                                      12,5 ml 20 % SDS  
                                      ad 500 ml

Assay-Puffer:                    2,4 ml Diethanolamin  
                                      0,05 g MgCl<sub>2</sub>  
                                      ad 250 ml

## 3.3 In vitro Replikation und Untersuchungen zur Tumorigenität von HCV

### 3.3.1 Isolierung von HCV-RNA aus Formalin-fixiertem Lebergewebe

Für die Isolierung von HCV-RNA aus fixiertem Gewebe wurden zwei alternative Methoden angewandt. Die erste Methode - die Mikrodissektion - hat den Vorteil, daß man Tumor- bzw. Peritumorzellen sehr gut voneinander trennen kann. Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch

in der schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die zweite Methode (makroskopische Trennung von Tumor- und Peritumorgewebe) ermöglicht keine strikte Trennung der verschiedenen Zellen, hat jedoch den Vorteil einer guten Reproduzierbarkeit.

### **3.3.1.1 Mikrodissektion**

Das Lebergewebe war für routinemäßige histologische Untersuchungen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Für die Isolierung von HCV-RNA wurden von den Blöcken 10 µm Schnitte mittels Mikrotom angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Um Kontaminationen von verschiedenen Blöcken zu vermeiden, wurden die Messer für die einzelnen Schnitte ausgewechselt. Die Gewebeschnitte wurden in Xylol bei 37°C entwacht, mit 100 % Ethanol gewaschen und in 96 % und 75 % Ethanol rehydriert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hematoxilin / Eosin gefärbt. Unter mikroskopischer Sicht konnten nun mit Hilfe einer Pipettenspitze gezielt Zellen aus dem Tumorbereich bzw. dem Peritumorbereich entnommen werden. Die so gewonnenen Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 200µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; 0,5 % SDS) gegeben, mit 100 µl Öl überschichtet und für 4 Tage bei 37°C mit Proteinase K (100 µg / ml Enkonzentration) verdaut. Anschließend wurde das Öl vollständig abgenommen und eine RNA-Extraktion mit Trisolv durchgeführt (siehe unter 3.1.1). Als Fällungshilfe wurden 3 µl Glykogen (Ausgangskonzentration: 20 mg / ml; Boehringer Mannheim) zugesetzt. Das resultierende RNA-Präzipitat wurde in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -80°C gelagert. Verschiedene Bereiche der so erhaltenen RNA wurde mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend direkt sequenziert.

### **3.3.1.2 Makroskopisches Trennen von Tumor- und Peritumorzellen**

Als Alternative zur Mikrodissektion wurden bei Formalin-fixierten Geweben mit klar trennbaren Tumor- und Peritumor-Bezirken 2 µm Schnitte des Gewebes angefertigt, wie unter 3.3.1.1 beschrieben entparaffinisiert und mit Hematoxilin / Eosin gefärbt. Nach Untersuchung des Schnittes unter dem Mikroskop wurde der Paraffinblock mittels eines sterilen Skalpell in Tumor- bzw. Peritumorbereich aufgetrennt und die entstehenden Gewebestücke erneut separat in Paraffin eingebettet. Von diesen Blöcken wurden 10 µm Schnitte angefertigt und diese in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mittels 1 ml Xylol bei 37°C entparaffinisiert. Nach Behandlung

der Gewebestücke mit einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 75 % Ethanol) wurde der Rest-Ethanol bei 37°C für 10 min verdampft. Anschließend wurde wie unter 3.3. 1. 1 beschrieben, 200 µl Proteinase K-Puffer und Proteinase K (100 µg / ml) zugegeben, für 4 Tage bei 37°C verdaut und anschließend extrahiert (3.1.1). Nach Resuspendieren des RNA-Präzipitates in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurde, die RNA bei -80°C gelagert, und verschiedene Bereiche der so erhaltenen RNA mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend direkt sequenziert.

### **3.3.2 Klonieren von PCR-Produkten**

#### **3.3.2.1 Kulturbedingungen**

Die *E. coli*-Stämme wurden in Flüssigmedium auf einem Schüttler bei 220 rpm bzw. auf Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Kompetente *E. coli* Zellen JM109 bzw. InvαF' wurden von den Firmen Promega bzw. Invitrogen bezogen (siehe Tabelle 2).

#### **3.3.2.2 Direktes Klonieren von PCR-Produkten in prokaryontische Vektoren**

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten erfolgte entweder mittels des "PCR-Cloning Kits" der Firma Promega oder des "TA-Cloning-Kits" der Firma Invitrogen. Diese Kits machen sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zunutze, an das 3'-Ende des Amplifikates ein zusätzliches Adenin anzuhängen (Clark et al. 1988). Die in den Kits enthaltenen Vektoren (pGEM-T (Abb. 2a) bzw. pCR II (Abb. 2b)) liegen linearisiert vor und besitzen an den freien 3'-Enden ein überhängendes Thymidin, welches mit dem 3' überhängenden Adenin des Amplifikates Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Durch T4-Ligase werden Vektor und PCR-Produkt verknüpft. Die Durchführung von Ligation und anschließender Transformation erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Jedoch wurden bei beiden Kits anstelle von 1 µl Ligationsprodukt 10 µl in die Transformation eingesetzt.





### Transformation:

Ein 50 µl Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Ligationsprodukt zu den Zellen gegeben und für weitere 20 min auf Eis stehen gelassen. Die eigentliche Aufnahme des Plasmids erfolgte mittels Hitzeschock (50 Sekunden Inkubation bei 45°C im Wasserbad). Anschließend wurden die Zellen erneut für mindestens 2 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Da alle verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen trugen, wurden 40 µg / ml dieses Antibiotikums und 80 µg / ml X-Gal (Blau-Weiß -Selektion) dem LB-Agar zugesetzt, um eine Selektion der Transformanten mit dem PCR-Fragment zu erreichen. 50 und 100 µl der in SOC-Medium vorinkubierten Zellen wurden auf die Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank vermehrt.

#### 3.3.2.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

10 x SuRE/Cut-Puffer (Boehringer Mannheim) pH 7,5:

500 mM Tris-HCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
1000 mM NaCl  
10 mM Dithioerythritol

10 x OPA-Puffer (Pharmacia) pH 7,5:

100 mM Tris-Acetat  
100 mM Magnesiumacetat  
500 mM Kaliumacetat

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke und zur Gewinnung linearer DNA-Fragmente durchgeführt. Ein Ansatz enthält den vom Hersteller der verwendeten Enzyme empfohlenen Reaktionspuffer (z. B. SuRE/Cut-Buffer von Boehringer Mannheim für EcoRI- bzw. XhoI-Verdau, oder One-for-all-Buffer von Pharmacia für Apal-Verdau), die Plasmid-DNA (etwa 1 bis 10 µg) und 1 - 10 U Enzym (maximal 10 % des Endvolumens). Der Restriktionsverdau erfolgte in der Regel 30 min bis

2 Stunden bei 37°C im Wasserbad. Mehrfachverdaus erfolgten seriell, wenn sie in verschiedenen Puffern durchgeführt wurden. Bei einheitlicher Pufferzusammensetzung enthielt der Restriktionsansatz mehrere Enzyme.

#### **3.3.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (z. B. Plasmide bzw. DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau) erfolgte mittels des "QIAquick-Gel-Extraction-Kit" von Qiagen. Diese Elutionsmethode beruht darauf, daß eine aus Silika-Gel bestehende Membran in Kombination mit einem speziellen Bindepuffer bis zu 10 µg DNA binden kann, die sich mit TE-Puffer bzw. Wasser wieder vom Säulenmaterial eluieren läßt. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen eingesetzten Puffer ist vom Hersteller nicht angegeben. Für die Isolierung spezieller DNA-Fragmente wurde das DNA-Gemisch nach dem Restriktionsverdau je nach Größe des gewünschten Fragmentes in einem 1 bzw. 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend die gewünschte DNA-Bande mittels eines sterilen Skalpell als möglichst kleines Stück herausgeschnitten. Der so erhaltene Gelblock mit der zu isolierenden DNA wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 600 µl QX1-Puffer zugegeben. Die Agarose wurde nun für 10 Minuten bei 50°C gelöst. Anschließend wurde die Probe auf eine QIAquick-Säule gegeben. Bei maximaler Geschwindigkeit wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die abzentrifugierte Suspension verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer (Zusammensetzung vom Hersteller nicht genau beschrieben) gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers wurde die Säule erneut bei Raumtemperatur für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde nun durch Zugabe von 50 µl TE-Puffer, pH 8,0 und erneute 1-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit vom Säulenmaterial eluiert. Durch Auftragen der so erhaltenen DNA auf ein Agarosegel wurde die Isolierung überprüft.

### 3.3.2.5 Umklonieren der PCR-Produkte in einen eukaryontischen Expressionsvektor

Die PCR-Produkte wurden aus der EcoRI-Schnittstelle des pCR™ II-Vektors herausgeschnitten, über ein Agarosegel getrennt und aufgereinigt (siehe unter 3.3.2.4). Die so erhaltene DNA wurde mittels 100 %igem Ethanol gefällt und im gleichen Verhältnis wie der Vektor in die Ligationsreaktion eingesetzt. Hierzu diente die EcoRI-Schnittstelle des in Abbildung 3 dargestellten pcDNA3 Vektors (Invitrogen). Auf diese Weise konnten die Fragmente durch den CMV-Promotor des pcDNA3 Vektors in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Das ATG-Startkodon befindet sich innerhalb der klonierten Fragmente, so daß die PCR-Produkte im richtigen Leseraster exprimiert werden konnten.

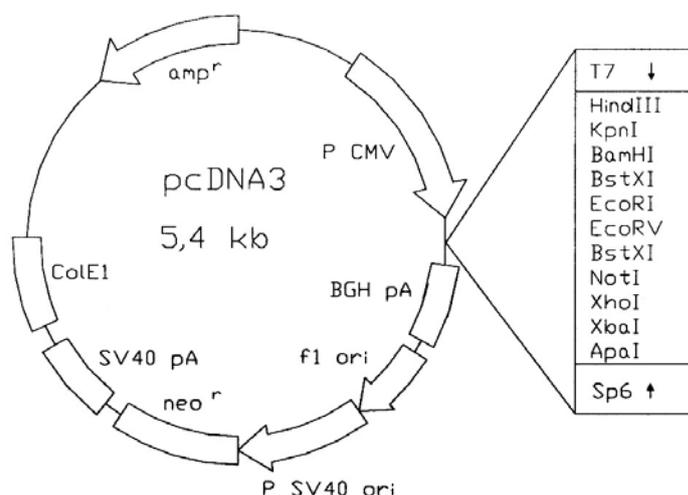


Abb. 3: Aufbau des pcDNA3-Vektors

### 3.3.3 Isolierung und Reinigung von Plasmiden

#### 3.3.3.1 Schnellisolierung von Plasmiden mittels alkalischer Lyse

Neben dem Restriktionsverdau von Plasmiden zur Analyse der klonierten PCR-Produkte wurde auch die PCR zur Charakterisierung eingesetzt. Hierzu wurden Bakterienklone mit Hilfe von Zahnstochern in Lysis-Puffer (1 % Triton-x 100; 10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA) gegeben. Nach Erhitzen der Proben für 5 Minuten auf 95°C wurden die Zelltrümmer

5 Minuten bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurden 2 µl des Überstandes in eine DNA-PCR eingesetzt.

### **3.3.3.2 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte durch Zugabe von Lysozym und durch Kochen nach der Methode von Maniatis (abgewandelte Methode von Holmes und Quigley (1981)).

Hierzu wurden 2 ml einer Übernachtskultur für 5 min bei 10000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert, das Medium abgeschüttet und das Präzipitat in 350 µl STET Puffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 5 % Triton-x 100) resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl Lysozym (10 mg / ml in 10 mM Tris Cl, pH 8,0) und kurzem Mischen, wurden die Zellen für 2 min in kochendes Wasser gestellt. Das Lysat wurde für 10 min bei 12000 rpm bei Raumtemperatur in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat, bestehend aus Zelltrümmern und Proteinen, mittels eines sterilen Zahnstochers entfernt, der Überstand mit 350 µl Isopropanol versetzt und gründlich gemischt. Das Ausfällen der DNA erfolgte innerhalb von 10 min bei -20°C. Die präzipitierte DNA wurde 10 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet und in 100 µl RNase-haltigem H<sub>2</sub>O gelöst. Nach dieser Methode isolierte Plasmid-DNA konnte ohne weitere Behandlung mit Restriktionsenzymen verdaut werden.

### **3.3.3.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Gewinnung und Reinigung größerer Plasmid-Mengen wurde der "Jetstar Maxi-Plasmid-Kit" der Firma Genomed eingesetzt. Die Präparation basiert auf der Verwendung einer Anionenaustauscher-Substanz. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Puffer ist vom Hersteller nicht angegeben. Eine 200 ml Übernachtskultur wurde für 15 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert und anschließend in 10 ml E 1-Puffer mit RNase (100 µg / ml) resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Lysis-Puffer (E2) zugegeben und vorsichtig mit der Zellsuspension vermischt. Nach 5minütiger Inkubation wurde das Lysat zur Neutralisation mit 10 ml E3-Puffer versetzt und

vorsichtig vermischt. Der nun folgende Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 rpm, Raumtemperatur) pelletierte Proteine, Membranbestandteile und die zelluläre DNA. In der Zwischenzeit wurde die Jet-Star-Säule mit 30 ml E4-Puffer äquilibriert. Der Überstand mit dem Plasmid wurde auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Säule vollständig leer gelaufen war, wurde sie mit 1 x 60 ml E5-Puffer gewaschen und anschließend die Plasmid-DNA mit 15 ml E6-Puffer eluiert.

Die im Eluat enthaltene DNA wurde mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol gefällt und 30 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut 15 Minuten zentrifugiert und getrocknet. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### **3.3.4 Herstellen polyklonaler Antikörper**

Polyklonale Antikörper gegen jeweils 15 Aminosäuren der N-terminalen Region des HCV-Core-Proteins wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt. Hierzu wurden 2 verschiedene Polypeptide synthetisiert und in Kaninchen injiziert.

SA 12 (AS-Position 3 - 17): Thr-Asn-Pro-Lys-Pro-Glu-Arg-Lys-Thi--Lys-Arg-Asn-Thi--Asn-Arg

SA14 (AS-Position 11 -25): Thr-Lys-Arg-Asn-Thr-Asn-Arg-Pro-Thr-Gly-Cys-Glu-Val-Pro-Gly

Für die Western-Blots wurden die aus den Kaninchen gewonnenen Antiseren nicht weiter aufgereinigt.

### **3.3.5 In vitro Translation**

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde mit dem TNT Retikulozyten-Lysat der Firma Promega nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Reaktionsansatz:

TNT-Rabbit-Retikulozyten-Lysat:	25 µl
Reaktionspuffer:	2 µl
T7-RNA-Polymerase	1 µl
Aminosäuremix ohne Leucin	1 µl
Aminosäuremix ohne Methionin	1 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg Endkonzentration
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Inkubation der Reaktionsgemische erfolgte für 90 Minuten bei 30°C

### 3.3.6 Western-BIot

Um in einem Proteingemisch ein bestimmtes Molekül zu identifizieren, kann man die Proteine aus einer SDS-PAGE auf eine feste Matrix (Nitrozellulose-Membran) überführen (blotten) und anschließend immunchemisch anfärben.

Dazu wurde ein 5 µl Aliquot der *in vitro* Translation bzw. mit 5 µl Polypeptid (10 µM) mit 20 µl Probenpuffer (Zusammensetzung siehe unten) vermischt, für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und auf ein 10 bis 20 %iges Acrylamid-Gradientengel (Fertiggele der Firma Biorad) unter Verwendung einer vertikalen Gelkammer aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Midrange-Marker" von Promega, bestehend aus Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (88,2 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (55,0 kDa), Ovalbumin (42,7 kDa), Aldolase (40,0 kDa), Carboanhydrase (31,0 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,4 kDa), verwendet. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1 : 20 in Probenpuffer verdünnt, ebenfalls für 2 Minuten bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) bei einer konstanten Spannung von 100 V für 15 Minuten und nachfolgend bei 200 V für 55 Minuten.

Anschließend wurde das Gel für 2,5 Stunden bei 55 mA mit einem Semi-dry-Blotter (Pharmacia) geblottet (Blotting-Puffer siehe unten). Die Membran wurde mit Ponceau S

angefärbt und die Spur mit dem Molekulargewichtsmarker für spätere Größenvergleiche abgeschnitten. Die Ponceau S (3 hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfophenylazo) phenyazo]-2,7-naphtalen-disulfidacid)-Färbung ist nicht permanent; die rote Farbe verschwindet im Verlauf der nachfolgenden Western-Blot-Schritte. Die Membran wurde für 2 min in Ponceau S inkubiert und nachfolgend mehrmals mit TBS gewaschen.

Probenpuffer:	Upper-Tris	2,5 ml
	0,5 M Tris	
	0,4 % SDS	
	mit Hcl auf pH 6,8 eingestellt	
	Glycerin	4,0 ml
	β-Mercaptoethanol	0,6 ml
	SDS	0,6 g
	Bromphenolblau	8,0 mg
	H <sub>2</sub> O ad	10 ml

LaernmH-Puffer:	Tris	3,0 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1,0 g
	H <sub>2</sub> O ad	1 l

Ponceau S-Stammlösung:	2 % Ponceau S
	30 % Trichloressigsäure
	30 % Sulfosalicylsäure

vor Gebrauch 1 : 10 mit H<sub>2</sub>O verdünnen



---

Blotting-Puffer:	Tris-Base	15 g
	Glycin	72 g
	Methanol	500 ml
	H <sub>2</sub> O ad	2,5 l

TBS-Puffer: pH7,6	Tris Base	2,4 g
	NaCl	8,0 g
	HCl, 1 M	3,8 ml
	H <sub>2</sub> O ad	1 l

TBS-T: 1 ml Tween 20 in 999 ml TBS

Blockierungslösung: TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver

Die Immunchemische Detektion wurde mit dem "ECL-Kit" der Firma Amersham nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blockierungslösung inkubiert. Der monoklonale Antikörper C7-50, welcher ein gut konserviertes lineares Epitop zwischen Aminosäureposition 21 und 40 des HCV-Core-Proteins erkennt (Moradpour et al., 1996), wurde in einer Konzentration von 1 µg / ml in Blockierungslösung verdünnt. Alternativ wurden die von der Firma Eurogentec hergestellten polyklonalen Antikörper (Antiserum SA12 und SA14) in einer 1 : 100 Verdünnung eingesetzt. Die Membran wurde mit dem 1. Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Der 2. Antikörper (Goat anti-mouse- bzw Goat anti-rabbit-Horseradish Peroxydase, Dianova) wurde 1 : 10000 in Blockierungslösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut - wie zuvor beschrieben - gewaschen. Anschließend wurden die Lösungen 1 und 2 des Detektionskits (Zusammensetzung von der Firma nicht genannt) in einem Verhältnis von 1 : 1 auf die Membran gegeben, die Membran faltenfrei in Frischhaltefolie verpackt und ein ECL-Film (Amersham) aufgelegt. Nach 5 bis 45 Minuten, je nach Signalstärke und Hintergrund, wurde der Film entwickelt.

### 3.3.7 Methoden der eukaryontischen Zellkultur

#### 3.3.7.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen für die HCV *in vitro* Replikation

Die verschiedenen Zelllinien (Molt 4, Raji, Hep3B, HepG2, Huh7) bzw. immortalisierten Zellen oder Primärzellen wurden bei 37°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium für die Zelllinien Molt 4 und Raji bzw. die PBMLs diente RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FCS, Glutamin und einer Antibiotik / Antimykotik-Lösung. Die restlichen oben genannten Zellen wurden in DMEM supplementiert mit 10 % FCS, Glutamin und einer Antibiotik / Antimykotik-Lösung kultiviert. Die Zellen wurden je nach Erfordernis in 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Das Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen sofort in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben (25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen). Nachdem die Zellen 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, inkubiert waren, wurde das Medium nochmals ausgetauscht, um Reste des zytotoxischen DMSO vom Gefrierschutzmedium zu entfernen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, in 10 ml DMEM-Medium bzw. RPMI-Medium aufgenommen und 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml kaltem Gefrierschutzmedium (siehe 2.11.2) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Styroporbox langsam bei -80°C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 3.3.7.2 Inkubieren der Zellen mit HCV-positivem Serum

Da nicht bekannt war, welcher HCV-Subtyp bzw. welches spezielle Patientenserum für die *in vitro* Replikation am besten geeignet war, diente als Inokulum ein Gemisch aus 23 verschiedenen HCV-positiven Patientenseren. Die Verteilung der verschiedenen HCV-Subtypen in diesem Serumgemisch entsprach in etwa der HCV-Subtypenverteilung innerhalb der Bevölkerung in Deutschland.

Für die *in vitro* Versuche wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Zu etwa 10<sup>5</sup> Zellen wurde 100 µl HCV-positives Serum gegeben und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes in ein Reaktionsgefäß überführt, um das Inokulum mittels PCR zu überprüfen. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS gewaschen waren, wurden erneut - zur Kontrolle des Waschschrtes - 100 µl des Überstandes abgenommen (sollte in der PCR kein Signal ergeben). Die gewaschenen Zellen wurden ausgezählt und 10<sup>4</sup> Zellen ebenfalls für die PCR-Analyse bei -80°C eingefroren. Bei Monolayer-Kulturen wurden die restlichen Zellen auf 3 ml Kulturgefäße aufgeteilt, um bei den darauffolgenden Probenentnahmen der nächsten 10 Tage nicht alle Zellen immer neu trypsinieren zu müssen. Die Zellen wurden in neue Kulturgefäße umgesetzt, wenn sie etwa 90 % konfluent gewachsen waren. Bei Suspensionskulturen wurde jeweils ein Aliquot aus den Zellkulturflaschen entnommen, zentrifugiert, 100 µl Überstand eingefroren, das Zellpellet wie zuvor beschrieben gewaschen und jeweils 10<sup>4</sup> Zellen eingefroren.

Um die Absorption des Virus an die Zellen bzw. die Aufnahme des Virus in die Zellen zu beeinflussen wurde das HCV-positive Serum alternativ mit Lipoproteinen vorinkubiert bzw. zu dem Inokulum PEG gegeben. Für die Inkubation des Serums mit Lipoproteinen wurde eine Mischung aus VLDL, HDL und LDL (jeweils 2 mg / ml) in 0,5 ml 0,15 M NaCl, 0,01 % EDTA hergestellt und 300 µl dieser Mischung zu 500 µl HCV-positivem Serum gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurden 200 µl dieses Ansatzes zu den oben beschriebenen Zellen gegeben. Bei dem Einsatz von PEG wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit HCV-positivem Serum inkubiert, jedoch wurde zusätzlich zu dem Medium 4 / PEG gegeben.

### **3.3.7.3 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Collagen I bzw. Gelatine**

Für das Beschichten von Zellkulturflaschen mit Collagen I (Rattenschwanz, Firma Sigma) wurden 5 mg Collagen I zu 50 ml 0,1 M Essigsäure gegeben und die Lösung sterilfiltriert. Diese 0,01 %ige Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt. 2,5 ml der Collagen I-Lösung wurden in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Restflüssigkeit abgezogen und die Flaschen für weitere 2 Stunden bei 37°C getrocknet. Die Zellkulturflaschen wurden nun dreimal mit PBS gespült und das Medium mit den Zellen hineingegeben.

Für die Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Gelatine wurde eine 2 %ige sterile Fertiglösung der Firma Sigma verwendet. 2,5 ml der Gelatine wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde direkt das Medium mit den Zellen zugegeben.

#### **3.3.7.4 Kultivierung von Zellen aus EDTA-Blut**

Eine Methode, um Zellen (PBML) aus EDTA-Blut zu isolieren, ist die Aufreinigung über einen Ficoll-Gradienten. Hierzu wurde Ficoll (Pharmacia) in ein Reaktionsgefäß gegeben und die gleiche Menge EDTA-Blut vorsichtig auf diese Lösung pipettiert. Es wurde darauf geachtet, daß es zu keinen Vermischungen von Ficoll und Blut kam. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge wurde ausgeschaltet, um ruckartige Erschütterungen beim Auslaufen des Rotors zu vermeiden. Die zu isolierenden PBMLs bildeten eine Schicht zwischen Blutplasma und Ficoll. Sie wurden vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medium gegeben.

Für den Aufbau einer HCV-replizierenden Zelllinie wurde versucht, Metastasen eines hepatozellulären Karzinoms aus Blut anzuzüchten. Das verwendete EDTA-Blut stammte von einem Patienten mit chronischer Hepatitis C, welcher 3 Jahre zuvor einer orthotrophen Lebertransplantation unterzogen wurde. Da die neu implantierte Leber nach 3 Jahren erneut multi-lokuläre Karzinome aufwies, wurde davon ausgegangen, daß im Blut des Patienten Metastasen vorhanden waren. Neben der oben beschriebenen Aufreinigung von Zellen über einen Ficoll-Gradienten wurde zusätzlich EDTA-Blut direkt in das Medium gegeben bzw. die Blutzellen abzentrifugiert, die sedimentierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in Medium gegeben. Für die Kultivierung der "Metastasen" wurden unbehandelte bzw. mit Collagen oder Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen eingesetzt.

#### **3.3.7.5 Kultivierung von NIH/3T3- und Fisher-rat1-Zellen**

NIH/3T3- und Fisher-rat1-Zellen wurden in Monolayerkulturen in einem Brutschrank bei 37°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente Dulbeccos MEM mit geringem Glucosegehalt. Supplementiert wurde das Medium mit 10 % FCS, Glutamin und

einer Antibiotik/Antimykotik-Lösung. Je nach Erfordernis wurden die Zellen in 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen oder in 35 bzw, 94 mm Zellkultur-Petrischalen kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

In ihrer logarithmischen Wachstumsphase verdoppeln sich die Zellen etwa alle 24 Stunden. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3 bis 4 Tage, wobei darauf zu achten war, daß die Kulturflaschen bzw. -schalen nicht dichter als 80 % wuchsen. Bei dichterem Wachstum und oftmaligem Passagieren (etwa 10x) steigt die Neigung der NIH/3T3- und Fisher-rat 1-Zellen spontan zu transformieren, was unter allen Umständen vermieden werden sollte. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA bedeckt und etwa 5 min bei 37°C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden anschließend in Medium verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen siehe Kapitel 3.3.7.1.

### **3.3.7.6 Transfektion von NIH/3T3- und Fisher-rat 1 -Zellen**

Die Zellen wurden in DMEM-Medium plus 10 % FCS angezogen. Es wurden Zellen von frühen Passagen (3. bzw. 4. Passage) eingesetzt, wobei streng darauf geachtet wurde, daß die Zellen nicht dicht wuchsen bzw. lokale Konglomerate bildeten. Für die Transfektion wurden jeweils 2 µg DNA in 100 µl serumfreies Medium ohne Antibiotikazusatz und 10 µl Lipofectamin in 90 µl serumfreies Medium ohne Antibiotikazusatz gegeben. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben und vorsichtig für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur gemischt, um DNA-Liposomen-Komplexe zu bilden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium ohne Antibiotikazusatz gewaschen. Zum DNA-Liposomen-Komplex wurden 0,8 ml des gleichen Mediums pipettiert und die so vorbehandelte DNA tropfenweise zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde nach dieser Inkubationszeit 1 ml DMEM-Medium mit 20 % FCS zugegeben und weitere 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die verschiedenen geplanten Versuchsansätze aufgeteilt und in Medium mit G418 selektiert (siehe auch Kapitel 2.1 1.4). Nach etwa 10tägiger Inkubation mit regelmäßigem Mediumwechsel wurden die Zellen für Transformationsversuche weiterverwendet.

### 3.3.7.7 Weichagar-Koloniebildungstest

Nach Selektion der transfizierten Zellen in G418-haltigem Medium wurden die Zellen trypsinisiert und darauf geachtet, daß sie vereinzelt im Medium vorlagen. Die Zellen wurden mittels einer Zählkammer ausgezählt und 12000 Zellen in 1 ml 1 x Medium gegeben. Anschließend wurden Kulturgefäße mit 2,5 cm Durchmesser (6-well-Platten) für den Weichagar-Kolonieformierungstest vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml 2 x Medium mit 1,5 ml 1 %igem Agar vermischt und in ein Kulturgefaß gegeben. Nachdem diese Grundschicht festgeworden war wurden zu den 12000 Zellen 1 ml 2 x Medium und 1 ml 1 %iger Weichagar gegeben und auf die Grundschicht pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und regelmäßig auf Koloniebildung überprüft.

### 3.3.7.8 Transformationstest in Medium mit 0,5 % FCS

Für die Selektion transformierter Zellen in 0,5 % Medium wurde dem Medium zusätzlich wie unter 2.11.4 beschrieben G418 zugesetzt. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt. Zellen, die in 0,5 % FCS wuchsen, wurden nicht gesplittet, sondern konfluent wachsen gelassen. So konnte zusätzlich die Fähigkeit zur Focus-Bildung überprüft werden.

### 3.3.7.9 Abimpfen von Weichagar-Kolonien und Foci

Das Abimpfen der Weichagar-Kolonien erfolgte unter mikroskopischer Sicht mittels Pasteurpipetten. Anschließend wurden die Zellen in Kultur-Platten mit Gefäßen von 1 cm Durchmesser (24-well-Platten) (DMEM-Medium mit 10 % FCS) gegeben und durch wiederholtes Aufziehen in die Pasteurpipette vom mitgenommenen Agar gelöst.

Um die Foci zu ernten, wurden kleine Metallringe (2,5 mm Ø) mit Hilfe von Silicon über den Kolonien fixiert. In den Innenraum eines Metallringes, der nun den einzelnen Focus umschloß, wurde anschließend PBS zum Waschen der Zellen gegeben. Mittels Trypsin wurden die Zellen eines Focus von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden wie die Weichagarklone in Kulturgefäßen mit 1 cm Durchmesser vermehrt.

### 3.3.7.10 Isolieren von DNA aus eukaryontischen Zellen

Um zu prüfen, ob in den stabil transfizierten Zellen die verschiedenen eingebrachten Sequenzen vorhanden sind, wurde die DNA isoliert und eine DNA-PCR durchgeführt.

Für die DNA-Isolierung wurden die Zellen auf 10 cm Petrischalen bis zu einer Zelldichte von etwa 80 % herangezogen (ca.  $10^7$  Zellen). Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2,5 ml Lysis-Puffer mit Proteinase K (Endkonzentration 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) wurde das Lysat in 15 ml Falcon-Röhrchen mit Hilfe eines Zellschabers überführt. Die Lysate wurden über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde zu dem Lysat das gleiche Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Falcon überführt und der Extraktionsschritt zweimal wiederholt. Nach dem letzten Extraktionsschritt wurde die wässrige Phase in ein 50 ml Falcon überführt und die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol (100 %) gefällt. Die DNA wurde auf einen Glasstab aufgewickelt und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 1 ml RNase-haltigem TE-Puffer (10  $\mu\text{g}$  RNase / ml) über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

Lysis-Puffer:	NaCl	100 mM
	Tris(pH 8)	10mM
	EDTA	1 mM
	SDS	0,5 %

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch:

Verhältnis: 25 : 24 : 1

### **3.3.7.11 Tumorbildung in der Nacktmaus**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) herangezogen. Bei genügend hoher Zelldichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf  $2 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. In jedes Versuchstier wurde auf beiden Seiten des Rückens jeweils 0,5 ml der gleichen Zellsuspension gespritzt. Die Mäuse wurden markiert und wöchentlich makroskopisch auf die Bildung von Tumoren untersucht. Die Nacktmäuse wurden nach 6 bis 10 Wochen Beobachtungszeit durch Genickbruch getötet. Die in einigen Fällen entstandenen Tumore wurden unter sterilen Bedingungen für weitere Untersuchungen entnommen. Die Versuche wurden in der Tierversuchsanlage der Universitätsklinik Frankfurt / Main unter Anleitung von Prof. Dr. Fortmeyer durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung Nr: II 17a-19c 20/15-F 34/03, Regierungspräsidium Darmstadt).



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung einer sensitiven RT-PCR zum Nachweis von HCV

HCV ist verantwortlich für die meisten Fälle einer posttransfusionsbedingten bzw. sporadisch erworbenen NonA-NonB-Hepatitis. Die HCV-Infektion weist eine hohe Chronifizierungsrate (50 - 70 %) auf und führt bei 20 bis 30 % der Patienten zu einer Entwicklung einer Leberzirrhose. Das Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln ist bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion mehr als 4fach erhöht (Tsukuma et al., 1993). Eine zunehmende Anzahl an Publikationen weist das Hepatitis C Virus als tumorinduzierendes Virus aus.

Zur Durchführung der geplanten Untersuchungen zur Pathogenese des Hepatitis C Virus ist die Etablierung einer PCR mit möglichst optimaler Sensitivität und Spezifität Voraussetzung. Aufgrund der hohen Konservierung der 5'-nichtkodierenden Region des HCV-Genoms eignen sich für eine solche optimierte PCR Primer, die zu diesem Genomabschnitt komplementär sind (Bukh et al., 1992 und Inchauspe et al., 1991).

#### 4.1.1 Austesten verschiedener RT-PCR-Verfahren

Um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität der Amplifikationsreaktion zu erzielen, wurden verschiedene RT-PCR Verfahren (nested-PCR, booster PCR, Single-Step-PCR und One-Tube-PCR; Durchführung siehe Kapitel 3.1.2.2) mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen getestet.

Zum Austesten der verschiedenen PCR-Varianten wurden Primer ausgewählt, welche komplementär zu Bereichen der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus sind ( $A1_{sense}$ ,  $A2_{antisense}$ ;  $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$ ; siehe Tabelle 1). Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde von 45°C sukzessive auf 72°C erhöht, womit eine Spezifitätserhöhung erreicht werden konnte. Zusätzlich wurde durch die Einführung dieser zwei-Stufen-PCR (Denaturierung bei 95° C, Anlagerung der Primer und Elongation der *Taq*-Polymerase bei 72°C) ein erheblicher

Zeitgewinn erzielt. Zum Austesten der verschiedenen PCR-Verfahren wurde eine Verdünnungsreihe eines Patientenserums hergestellt.

Bei der Booster-PCR wurde nach 35 Zyklen zu dem Reaktionsgemisch *Taq*-Polymerase und Primer zugegeben, und das Reaktionsgemisch erneut für 35 Zyklen amplifiziert. Für die Booster-PCR wurden drei verschiedene Varianten gewählt. Bei der ersten Variante wurde in der ersten Amplifikationsreaktion das Primerpaar A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> und in der zweiten Amplifikationsreaktion das Primerpaar B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> zugegeben. Bei der zweiten Variante wurde in beiden Amplifikationsrunden das Primerpaar B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> eingesetzt. Bei der dritten Variante der Booster-PCR wurden die reverse Transkriptase und die *Taq*-Polymerase zusammen in das Reaktionsgefäß gegeben (siehe Single-Step-PCR, Kapitel 3.1.2.2). Die zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationsreaktionen wurden mit dem Primerpaar B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> durchgeführt. Die Ergebnisse der verschiedenen Booster-PCRs sind in Abbildung 4 dargestellt.

Zur Durchführung einer nested PCR wurden die Primer A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> als äußeres Primerpaar, und die Primer B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> als inneres Primerpaar eingesetzt. Die Bedingungen für eine nested PCR sind in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben. Als Starter-oligonukleotid für die Umschreibung von RNA in cDNA wurde der Primer A2<sub>antisense</sub> eingesetzt. Das Ergebnis der nested PCR ist in Abbildung 5 dargestellt. Als weiteres alternatives PCR-Verfahren wurde eine Single-Step-PCR mit dem Primerpaar B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> bzw. dem Primerpaar A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> (Durchführung siehe Kapitel 3.1.2.2) durchgeführt. Das Ergebnis ist ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt. Zur Amplifikation wurden 50 Zyklen durchgeführt. Als letzte Variante wurde eine One-Tube-PCR mit dem Primerpaar B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub> durchgeführt (Durchführung siehe Kapitel 3.1.2.2). Bei diesem Verfahren wurde die HCV-RNA (bzw. cDNA) ebenfalls mit 50 Zyklen amplifiziert (Abb. 6).

Drei verschiedene PCR-Verfahren weisen die gleiche Sensitivität auf. Erstens die Booster-PCR bei Verwendung des Primerpaares B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub>, zweitens die nested PCR und drittens die One-Tube-PCR mit 50 Zyklen. Die Single Tube PCRs und die beiden anderen Varianten der Booster PCR besitzen eine schlechtere Sensitivität bzw. Spezifität (Booster-PCR: RT und PCR im gleichen Reaktionspuffer).

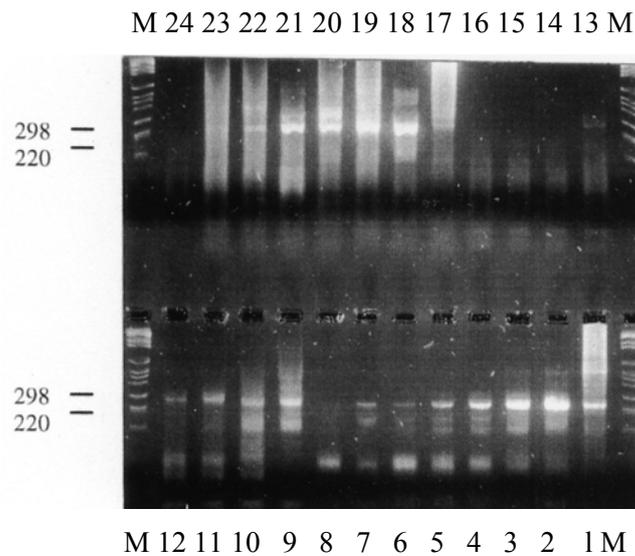


Abb.4: Austestung verschiedener Booster-PCR-Ansätze.

M = DNA-Längenstandard

Spur 1 – 8 Booster-PCR; 2 x 35 Zyklen mit den Primern  $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$

Spur 9-16 Booster-PCR, 1. PCR mit den Primern  $A1_{sense}$  und  $A2_{antisense}$   
2. PCR mit den Primern  $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$

Spur 17-24 Booster-PCR; 2 x 35 Zyklen mit den Primern  $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$

RT und PCR im gleichen Reaktionspuffer (Single-Step-PCR)

Jeweils Verdünnungen von  $10^0$  (Spur 1, 9, 17) –  $10^{-6}$  (Spur 7, 15, 23), in Spur 8, 16 und 24 sind die jeweiligen  $H_2O$ -Kontrollen aufgetragen.

Da die Booster-PCR ebenso wie die nested-PCR durch das Öffnen der Reaktionsgefäße nach der ersten Amplifikationsreaktion anfällig für Kontaminationen ist, wird für die Diagnostik die One-Tube-PCR eingesetzt werden. Zwar muß auch bei diesem PCR-Verfahren nach der reversen Transkription das Reaktionsgefäß geöffnet werden, doch sind zu diesem Zeitpunkt noch keine Amplifikate, welche ein großes Risiko für Kontaminationen darstellen, synthetisiert worden. Das am wenigsten durch Kontaminationen gefährdete PCR-Verfahren, die Single-Step-PCR, hat eine deutlich schlechtere Sensitivität (2 - 3 Zehnerpotenzen) als die One-Tube-PCR (Abb. 5 und 6).

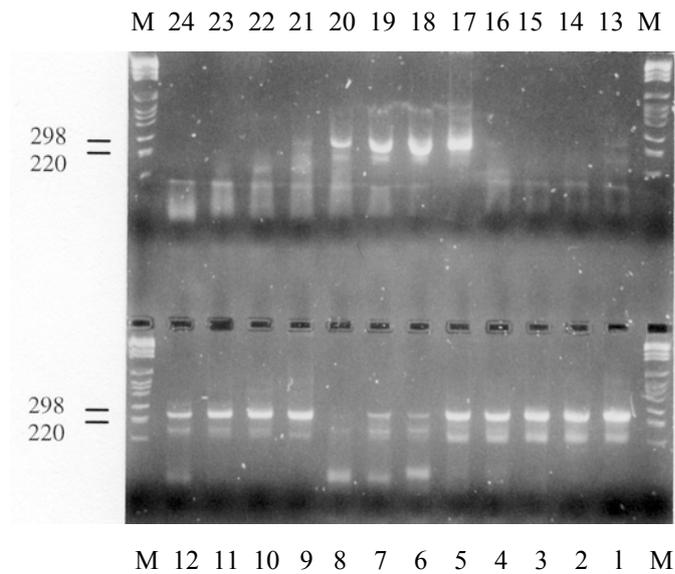


Abb. 5: Austestung verschiedener PCR-Verfahren.  
M = DNA-Längenstandard  
Spur 1 – 8 nested PCR; 2x 35 Zyklen mit den Primern A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> und B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub>  
Spur 9-16 Single-Step-PCR, 50 Zyklen mit den Primern B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub>  
Spur 17-24 Single-Step-PCR, 50 Zyklen mit den Primern A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub>  
Jeweils Verdünnungen von 10<sup>0</sup> (Spur 1, 9, 17) – 10<sup>-6</sup> (Spur 7, 15, 23), in Spur 8, 16 und 24 sind die jeweiligen H<sub>2</sub>O-Kontrollen aufgetragen.

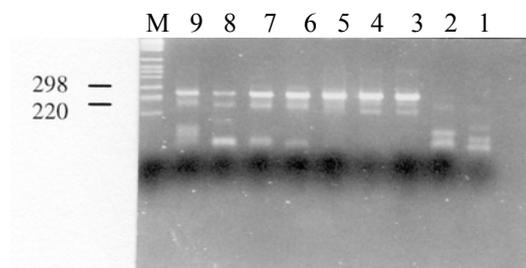


Abb. 6: One-Tube-PCR  
M = DNA-Längenstandard  
Spur 1 und 2 = H<sub>2</sub>O-Kontrollen  
Spur 3 - 9 Verdünnungsreihe 10<sup>0</sup> bis 10<sup>-6</sup>

#### 4.1.2 Selektion der Primer

Zur Erzielung einer höchstmöglichen Sensitivität und Spezifität der RT-PCR wurden drei unterschiedliche Sense-Primer und drei unterschiedliche Antisense-Primer getestet, welche innerhalb der hochkonservierten 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus binden. In Abbildung 7 sind die Positionen der verschiedenen Primer eingezeichnet. Bukh et al., 1992 und Hosoda et al., 1992 konnten zeigen, daß die Sensitivität der PCR bei Verwendung von Primern, welche komplementär zur 5'-NC-Region sind, am größten ist. Die 5'-NC-Region bildet eine starke Sekundärstruktur aus (Brown et al., 1992 und Tsukiyama-Kohara et al., 1992), welche auf die Bindungseigenschaften der Primer einen entscheidenden Einfluß nehmen kann.

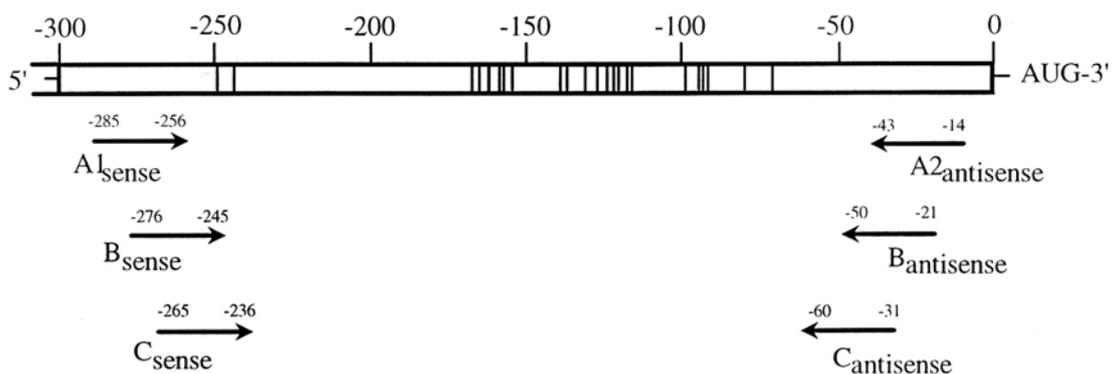
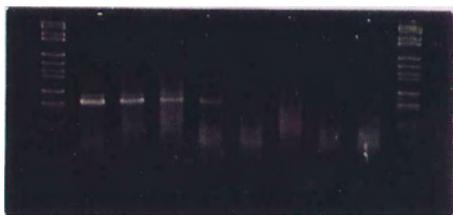


Abb. 7: 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus. Dargestellt sind die Positionen der Bindungsstellen der getesteten Primer für die Optimierung der RT-PCR (A<sub>1</sub>sense, A<sub>2</sub>antisense, B<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub>, C<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub>). Die Numerierung basiert auf dem von Choo et al. (1989) publizierten System. Die vertikalen Balken zeigen Nucleotidpositionen mit Heterogenität zwischen den verschiedenen HCV Genotypen an.

Nach reverser Transkription und anschließender Amplifikation der Serumverdünnungen ist bei den verschiedenen Primerkombinationen eine unterschiedliche Sensitivität festzustellen. Obwohl die Primer jeweils nur um einige Basen (etwa 10) versetzt an die 5'-NC-Region binden (siehe Abb. 7), umfaßt der Unterschied in der Detektion bis zu sechs Zehnerpotenzen.



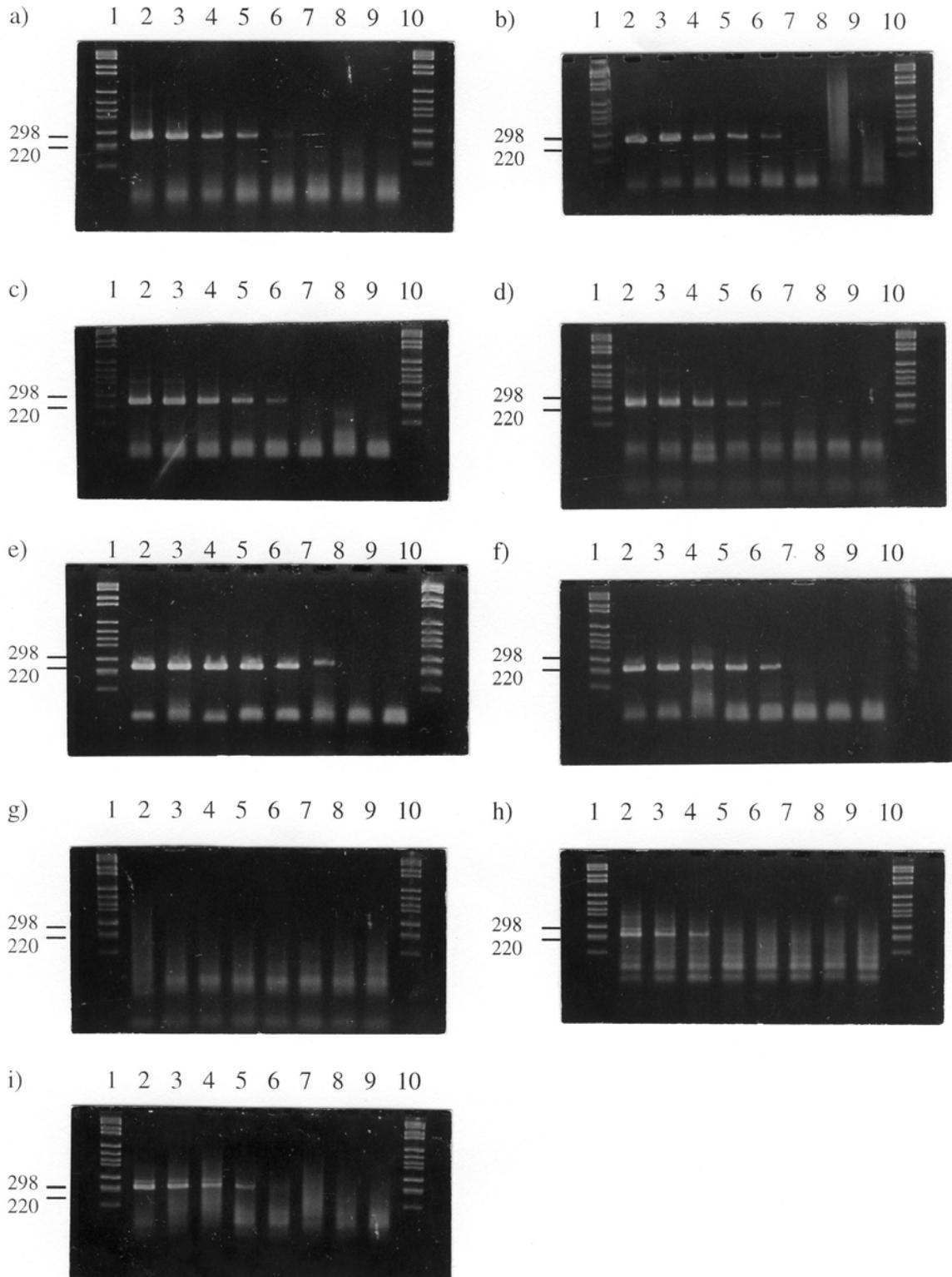


Abb. 8: Austesten verschiedener Primerkombinationen mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines HCV-positiven Patientenserums

a) = A1<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub>; b) = A1<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub>; c) = A1<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub>; d) = B<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub>; e) = B<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub>; f) = B<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub>; g) = C<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub>; h) = C<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub>; i) = C<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub>.  
 Spur 1: DNA-Längenstandard; Spur 2: original Serum ( $10^0$ ); Spur 3:  $10^{-1}$ -VD; Spur 4:  $10^{-2}$ -VD; Spur 5:  $10^{-3}$ -VD; Spur 6:  $10^{-4}$ -VD; Spur 7:  $10^{-5}$ -VD; Spur 8:  $10^{-6}$ -VD; Spur 9: Negativ-Kontrolle (H<sub>2</sub>O); Spur 10: DNA-Längenstandard.

Mit der Primerkombination C<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub> (Abb. 8g) wurde keine Amplifikation erreicht. Die höchste Sensitivität der RT-PCR wurde mit der Primerkombination B<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub> erzielt. Mit dieser Primerkombination konnte auch noch die Verdünnungsstufe 10<sup>-5</sup> amplifiziert werden (Abb. 8e). Bei Einsatz der Primerkombinationen A1<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub> (Abb. 8a), A1<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub> (Abb. 8b), A1<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub> (Abb. 8c), B<sub>sense</sub>, A2<sub>antisense</sub> (Abb. 8d) und B<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub> (Abb. 8f) konnte die Verdünnungsstufe 10<sup>-4</sup> amplifiziert werden. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-3</sup> konnte mit der Primerkombination C<sub>sense</sub>, C<sub>antisense</sub> (Abb. 8i) ein Signal erhalten werden. Mit der Primerkombination C<sub>sense</sub>, B<sub>antisense</sub> wurde ein Signal bis zu der Verdünnungsstufe 10<sup>-2</sup> erzielt (Abb. 8h).

## 4.2 Quantitative PCR

Eine hohe Hepatitis C Virämie vor Behandlung mit  $\alpha$ -Interferon stellt einen prognostisch ungünstigen Parameter der Therapie dar (Lau et al., 1993; Magrin et al., 1994 und Yoshioka et al., 1992). Eine niedrige Hepatitis C-Virämie hingegen ist ein günstiger Prädiktor, sowohl für das Ansprechen auf  $\alpha$ -Interferon, als auch für einen langfristigen Therapieerfolg nach Absetzen der Behandlung. Ebenso wird der Virustiter als prädiktiver Parameter für die Bildung einer Zirrhose diskutiert.

Um Zusammenhänge zwischen der Pathogenese des Hepatitis C Virus und dem Virustiter *in vivo* und *in vitro* untersuchen zu können, ist es notwendig, eine sensitive und reproduzierbare quantitative Nachweismethode zur Verfügung zu haben. Hierzu bietet sich der HCV-RNA-Nachweis mittels quantitativer kompetitiver RT-PCR an. Die etablierte quantitative RT-PCR kann zusätzlich in Studien zur Verlaufskontrolle einer antiviralen Therapie eingesetzt werden.

### 4.2.1 **Herstellung von HCV-Standard-RNA**

Erster Schritt bei dem Aufbau einer kompetitiven quantitativen PCR ist das Herstellen eines geeigneten HCV-RNA-Standards. Das Amplifikationsprodukt des HCV-RNA-Standards sollte die gleiche Länge wie das Amplifikat der HCV-Wildtyp-RNA besitzen. Zudem sollte



die Signalstärke der Amplifikate nicht durch die Bildung von Heteroduplexstrukturen zwischen Standard- und HCV-Wildtyp-Amplifikat beeinflusst werden. Um dies zu gewährleisten, sollte eine 25 Basen lange Sequenz innerhalb der hochkonservierten 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus mittels "site-directed-mutagenesis" (Ho et al., 1989) (siehe Abb. 9) ausgetauscht werden, wobei darauf zu achten war, daß der GC-Gehalt der ausgetauschten Sequenz sich nicht verändert.

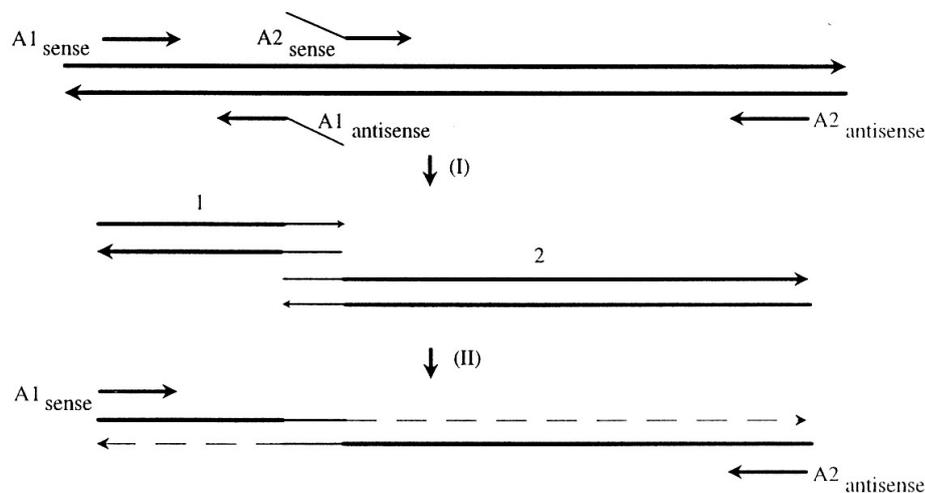


Abb. 9: Schematische Darstellung der "site directed mutagenesis". Doppelsträngige DNA und Primer sind durch Linien dargestellt. Die Pfeile geben die 5', 3'-Orientierung der Stränge an. Das ausgetauschte 25 Basenpaarfragment ist durch eine dünnere Linie gekennzeichnet. Erster Schritt (I) beim Austausch der Zielsequenz ist die Bildung von zwei PCR-Produkten (1 und 2), welche durch separate Primerpaare synthetisiert werden. Nach Hybridisierung der beiden PCR-Produkte mittels der überlappenden Sequenzen können die entstehenden freien 3'-Enden der *Taq*-Polymerase als Primer dienen (II).

Bei der Konstruktion eines Standards mittels "site-directed-mutagenesis" wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zwei Amplifikate (in Abb. 9 mit 1 und 2 bezeichnet) gebildet. Die hierfür eingesetzten Primer  $A2_{sense}$  und  $A1_{antisense}$  waren so konzipiert, daß ein Fragment der Originalsequenz von 25 Basenpaaren ausgespart wurde. Die Primer besitzen an ihren 5'-Enden Sequenzen, die einander komplementär sind und von der HCV-Wildtyp-Sequenz abweichen. Die zusätzlichen Sequenzen am 5'-Ende haben die gleiche Größe wie die ausgesparte, nicht amplifizierte Sequenz. Die nach dem ersten Schritt erhaltenen PCR-

Produkte (I) wurden mittels der komplementären Sequenz hybridisiert. Die dabei entstandenen freien 3'-Enden dienten als Primer für die *Taq*-Polymerase (Abb. 2 Schritt II). Nach Zugabe der äußeren Primer konnten die auf diese Weise veränderten "Standard-Moleküle" mittels PCR amplifiziert werden.

#### 4.2.1.1 Austausch von 25 Nukleotiden in der HCV-cDNA

Zur Synthese der Standard-RNA wurde ein HCV-1 b-Isolat (klassifiziert nach Simmonds et al., 1993) ausgewählt, da dieser HCV-Subtyp etwa 50 % der HCV-Isolate in der Bevölkerung der BRD ausmacht. Nach Extraktion mittels Trisolv wurde die RNA mit Hilfe der Primer A1<sub>antisense</sub> und A2<sub>antisense</sub> in cDNA umgeschrieben. Jeweils 10 µl RT-Produkt wurden in zwei getrennte Amplifikationsreaktionen mit den Primern A1<sub>sense</sub> bzw. A2<sub>sense</sub> gegeben und in 50 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 45°C vermehrt. In Abbildung 10 sind die sich ergebenden PCR-Produkte dargestellt. Die Länge der Amplifikate beträgt 203 (A2) bzw. 94bp(A1).

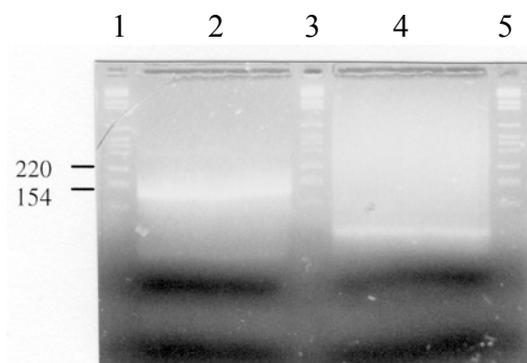


Abb. 10: Darstellung der PCR-Produkte A2 (203 bp, Spur 2) und A1 (94 bp, Spur 4) nach 50 PCR-Zyklen. In Spur 1, 3 und 5 ist der DNA-Längensstandard VI aufgetragen.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf ein 2 %iges "low-melting"-Gel aufgetragen, die entsprechenden DNA-Banden (94 bp und 203 bp) ausgeschnitten und mittels Elutip-d aufgereinigt. Jeweils 1 µl der aufgereinigten Fragmente A1 und A2 wurden zusammen mit den Primern A1<sub>sense</sub> und A2<sub>antisense</sub> in einen DNA-PCR-Ansatz gegeben und in 25 Zyklen bei

einer Anlagemngstemperatur von 45°C amplifiziert. Durch Erhitzen auf 95°C wurden die beiden PCR-Produkte denaturiert.

Da sich die PCR-Produkte A1 und A2 durch die Sequenz der Primer  $A1_{\text{antisense}}$  und  $A2_{\text{sense}}$  überlappten, konnten die beiden Produkte nach Erniedrigung der Temperatur auf 45°C miteinander hybridisieren (Abb. 9). Die entstehenden freien 3'-Enden wurden mittels der *Taq*-Polymerase bei 72°C verlängert. Durch die in die PCR-Reaktion zugegebenen Primer  $A1_{\text{sense}}$  und  $A2_{\text{antisense}}$  konnte das so erhaltene Hybridisierungsprodukt amplifiziert werden. Das resultierende PCR-Produkt (272 bp) ist in Abbildung 11 dargestellt.

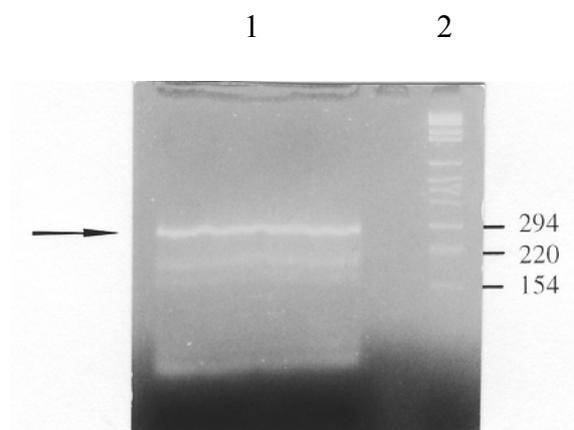


Abb. 11: PCR-Produkt (272 bp, mit einem Pfeil markiert) der kombinierten Reaktion von Hybridisierung und PCR der beiden Amplifikate A1 und A2. Neben dem gewünschten Hybridisierungsprodukt sind noch die ursprünglichen Amplifikate A1 (94 bp) und A2 (203 bp) zu erkennen. In Spur 1 ist das PCR-Produkt, in Spur 2 der DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

#### 4.2.1.2 Umschreiben des cDNA-Standards in RNA

Nach Aufreinigung des PCR-Produktes mittels Elutip-d wurde das Amplifikat (cDNA-Standard) mit Hilfe der an Magnetic-Beads gekoppelten komplementären Standard-Sequenz von möglicherweise noch vorhandenen HCV-Wildtyp-Sequenzen separiert. Die so gereinigte DNA wurde mit den Primern  $T7-A1_{\text{sense}}$  und  $A2_{\text{antisense}}$ -Oligo-dT in einer DNA-PCR amplifiziert. Auf diese Weise wurde an das 5'-Ende der Standard-DNA die Sequenz des T7-Promotors und an das 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz angehängt. Die Poly-A-Sequenz diente der späteren Aufreinigung mittels Oligo-dT-Zellulose. Das resultierende PCR-Produkt besitzt eine Größe von 313 bp.

Das Amplifikat wurde anschließend mit Hilfe der T7-Polymerase in poly A-plusstrang-RNA umgeschrieben (Kapitel 3.2.1.6), und die so erhaltene RNA mittels Oligo-dT-Zellulose-Säulen aufgereinigt. Nach der ersten Aufreinigung mit Oligo-dT-Zellulose erfolgte ein DNase-Verdau und ein zweiter Aufreinigungsschritt mit Oligo-dT-Zellulose. Die erhaltene RNA wurde parallel in eine RT-PCR und eine DNA-PCR eingesetzt, um den Anteil an nicht abgereinigter DNA zu bestimmen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt ( $10^0$  bis  $10^{-12}$ ) und in PCRs mit den Primern  $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$  eingesetzt. Die verwendeten Primer lagern sich nicht an das äußerste 5'- bzw. das 3'-Ende der Standard-RNA an sondern sind 10 bzw. 9 Basen nach innen versetzt (siehe Tabelle I). Das Ergebnis der Amplifikation ist in Abbildung 12 dargestellt.

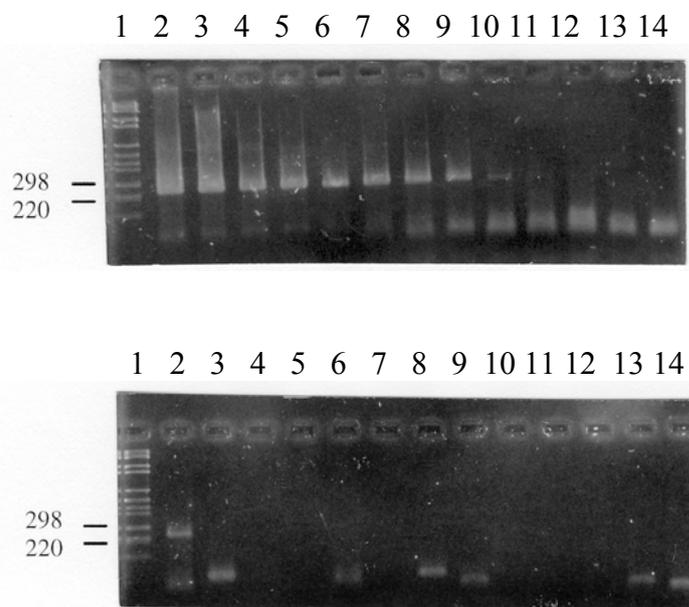


Abb. 12: Vergleich der RT- und DNA-PCR zur Überprüfung der Standard-RNA

Oben: RT-PCR: Spur 1: DNA-Längenstandard

Spur 2 - 14: Verdünnungsreihe des RNA-Standards:  $10^0$  bis  $10^{-12}$

Unten: DNA-PCR: Spur 1: DNA-Längenstandard

Spur 2 - 14: Verdünnungsreihe des RNA-Standards:  $10^0$  bis  $10^{-12}$

Mit der RT-PCR ist eine Amplifikation von RNA bis zu einer Verdünnungstute von  $10^{-9}$  möglich. Dagegen kann mit der DNA-PCR nur mit dem unverdünnten Standard ein

Amplifikat generiert werden. Der Unterschied zwischen RNA-Menge und DNA-Menge beträgt acht Zehnerpotenzen.

Anschließend wurde mit Hilfe des Spektrophotometers die Konzentration der Standard-RNA ermittelt. Die Konzentration betrug  $2,2 \times 10^{13}$  Moleküle / ml. Die Standard-RNA wurde in Aliquots von  $10^{10}$  bzw.  $10^7$  Molekülen pro Mikroliter bei  $-80^\circ \text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.2.1.3 Prüfen der Standard-Sequenz

Um auszuschließen, daß noch HCV-Wildtyp-Sequenzen (Verunreinigungen aus den ersten PCR-Schritten) in der Standard-RNA vorhanden sind, wurde eine RT-PCR mit Standard-spezifischen (C-Standard) bzw. HCV-spezifischen (C-HCV) Oligonukleotiden und dem gemeinsamen HCV-spezifischen Primer  $B_{\text{sense}}$  durchgeführt (Bindungsstellen der Primer siehe Tabelle I). Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

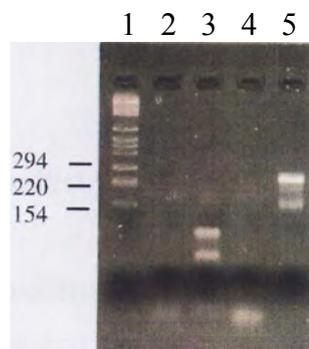


Abb. 13: Agarosegel mit Amplifikaten verschiedener RT-PCRs zum Testen der Standard-RNA mit Standard-spezifischen Primern auf Verunreinigung mit HCV-RNA:

Spur 1: DNA-Längenstandard

Spur 2: Amplifikationsprodukt der RT-PCR bei Einsatz des HCV-spezifischen Primers

Spur 3: Amplifikationsprodukt der RT-PCR bei Einsatz des Standard-spezifischen Primers

Spur 4: Negativkontrolle ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Spur 5: Positivkontrolle (HCV-RNA aus Patientenserum, amplifiziert mit den Primern  $B_{\text{sense}}$  und  $B_{\text{antisense}}$ )



(Wildtyp- bzw. Standard-spezifischen Sequenz) biotinylierten Oligonukleotiden (C-HCV und C-Standard) detektiert. In Abbildung 14 ist das Ergebnis der RT-PCR nach Chemilumineszenzdetektion dargestellt.

Zwischen der Detektion der Wildtyp-HCV-RNA und der Standard-RNA sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Jeweils zehn RNA-Moleküle können reproduzierbar mittels der beschriebenen RT-PCR und der nachfolgenden Detektionsmethode nachgewiesen werden. Die Verdünnungsschritte durch die RNA-Extraktion berücksichtigend - nur 1/5 der erhaltenen RNA der Extraktion wird in die RT-PCR eingesetzt - können theoretisch, falls die RT-Reaktion mit 100 %iger Effizienz abläuft, 50 HCV-RNA-Moleküle pro 100  $\mu$ l eingesetztes Patientenserum nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisgrenze von 500 HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum.

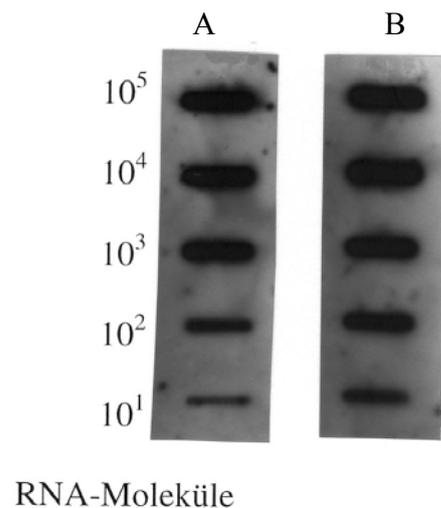


Abb. 14: Austesten der Empfindlichkeit der RT-PCR für die Detektion von Wildtyp-HCV-RNA (A) und Standard-RNA (B) nach Blotten der PCR-Produkte auf eine Nylonmembran. Links: Anzahl der pro RT-PCR eingesetzten RNA-Moleküle.

#### 4.2.3 Austesten der Linearität der PCR

Wichtig für die Ermittlung der HCV-RNA-Konzentration mittels der RT-PCR ist, daß sich die Amplifikationsreaktion in einer exponentiellen Phase befindet, da ansonsten Faktoren wie

Substratsättigung und aufgebrauchte Reagenzien die Quantifizierungsergebnisse beeinflussen. Um eine geeignete Zyklenzahl der RT-PCR zu ermitteln, wurden zehnfach Verdünnungen von Standard-RNA ( $10^1$  bis  $10^4$  Moleküle) in cDNA umgeschrieben und jeweils für 35, 40, 45 oder 50 Zyklen mit den Primern  $B_{\text{sense}}$  und  $B_{\text{antisense}}$  amplifiziert. Anschließend wurden  $10 \mu\text{l}$  des Amplifikationsprodukts wie beschrieben (3.2.2) auf eine Nylonmembran geblottet und mit einem Standard-spezifischen biotinylierten Oligonukleotid hybridisiert. Nach Chemilumineszenz-Detektion wurden die Signalstärken densitometrisch analysiert und gegen die Ausgangskonzentration der Standard-RNA aufgetragen.

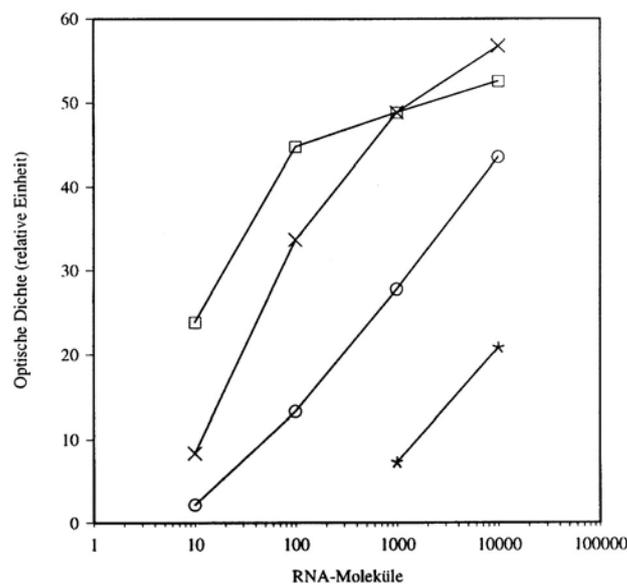


Abb. 15: Darstellung der Linearität der RT-PCR. Eine Verdünnungsreihe der Standard-RNA ( $10^1$  bis  $10^4$  Moleküle) wurde in cDNA umgeschrieben und mit 35 (\*), 40 (o), 45 (x) bzw. 50 Zyklen (□) mittels der PCR amplifiziert. Die Signalstärke der PCR-Produkte (nach beschriebener Detektion) wurde gegen die Ausgangs-RNA-Konzentration (logarithmische Einteilung) aufgetragen.

Wie Abbildung 15 zeigt, können bei 40, 45 und 50 Zyklen bis zu  $10$  Standard-RNA-Moleküle nachgewiesen werden. Bei der Durchführung von 35 Zyklen ist die Empfindlichkeit der PCR bedeutend geringer. Die Nachweisgrenze liegt bei hier  $1000$  Standard-Molekülen. Bei 40 Zyklen erfolgt, die Vermehrung von  $10$  bis  $10.000$  Standard-Molekülen exponentiell. Eine Erhöhung der Zyklenzahl (45 bzw. 50 Zyklen) hat zur Folge, daß die unterschiedlichen



Molekülmengen nicht mehr logarithmisch amplifiziert werden und in der logarithmischen Darstellung von der Geraden abweichen.

#### 4.2.4 Durchführung der kompetitiven quantitativen RT-PCR

Für die Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe (in HCV-negativem Serum; 1:10 bis 1: 10.000) des Patientenserums hergestellt. Anschließend wurde die RNA, wie unter 3.1.1 beschrieben, mittels Trisolv aus jeweils 100 µl Serum bzw. Serumverdünnung isoliert. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem Primer B<sub>antisense</sub>. In jedes Reaktionsgefäß wurden neben der extrahierten RNA aus der Verdünnungsreihe des Patientenserums noch 1000 Moleküle des RNA-Standards gegeben. 1000 Moleküle wurden eingesetzt, da sie, wie in Abb. 14 dargestellt, mittels RT-PCR reproduzierbar zu detektieren waren. Die anschließende Amplifikation der cDNA erfolgte für 40 Zyklen mit dem B<sub>sense</sub> und dem B<sub>antisense</sub> Primer. Nach Beendigung der 40 Zyklen wurden 20 µl des erwarteten 256 bp Produktes in 950 µl Denaturierungslösung gegeben und jeweils 450 µl der einzelsträngigen DNA separat auf je eine Hälfte einer Nylonmembran im Slotblot-Verfahren aufgetragen. Nach Fixieren der DNA mittels UV-Strahlung wurde die Membran in zwei Hälften geteilt, so daß sich auf jeder Hälfte ein gleich großes Aliquot des PCR-Produktes befand. Die nachfolgende Hybridisierung der Membranhälften wurde jeweils getrennt mit einem HCV- bzw. Standard-spezifischen biotinylierten Oligonukleotid durchgeführt. Die Detektion der Amplifikate erfolgte wie unter Kapitel 3.2.2.3 beschrieben. Nach Exposition eines ECL-Films wurde die Intensität der Signale mit einem Laserdensitometer ausgewertet. Die Menge an Wildtyp-HCV-RNA im Serum wurde durch direkten Vergleich der Signalstärke des internen Standards (1000 Moleküle) auf der einen Membranhälfte mit der Signalstärke des HCV-Wildtyp-Amplifikates auf der anderen Membranhälfte ermittelt. Für die Auswertung wurde dielenige Verdünnung des Patientenserums ausgewählt, die der Signalstärke des Standards am nächsten kam. Die Signale der Standard-Amplifikate wurden zur Bildung einer Eichgeraden eingesetzt, mit deren Hilfe dann die Konzentration der HCV-RNA-Moleküle im Serum ermittelt werden konnte.

Die Bestimmung der HCV-RNA-Konzentration wurde bei 32 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion durchgeführt (Abb. 16). Die erhaltenen Virustiter der verschiedenen Patienten wurden gegen die Werte der Transaminasen aufgetragen.

Die HCV-RNA-Konzentration der Patientenserum lag zwischen  $10^5$  und  $10^9$  Molekülen pro ml Serum (Abb. 16). Aufgrund der ermittelten Daten konnte keine Korrelation zwischen der ermittelten HCV-Konzentration und den Serumtransaminasen der Patienten oder dem klinischen Verlauf festgestellt werden.

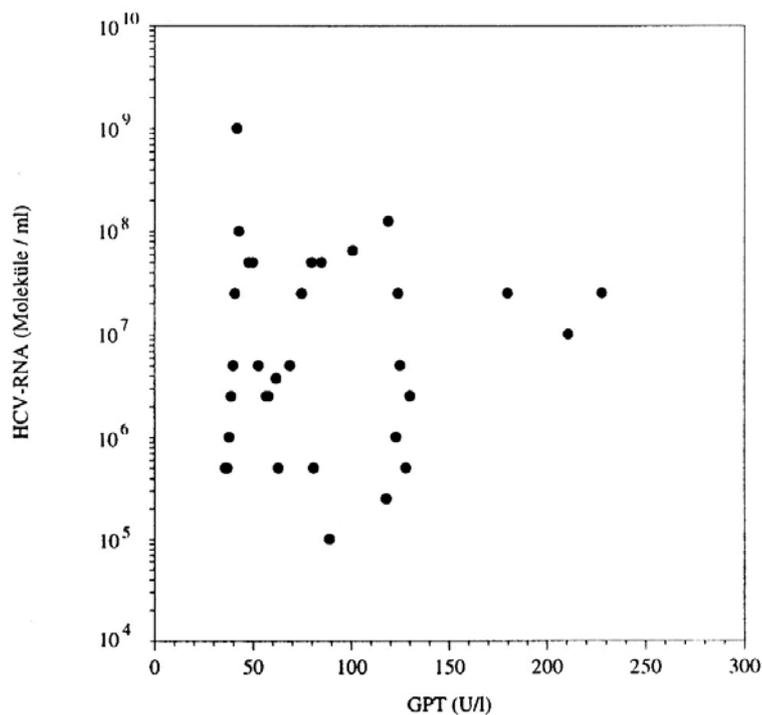


Abb. 16: HCV-RNA-Konzentration (Moleküle / ml) und GPT-Werte (U/l) bei Patienten mit chronischer Hepatitis C. Mit Hilfe einer kompetitiven RT-PCR wurde die Hepatitis C Virus-Konzentration im Serum von 32 Patienten mit chronischer Hepatitis C bestimmt und mit den entsprechenden GPT-Werten der Patienten verglichen.

Die quantitative RT-PCR wurde weiterhin zur Verlaufskontrolle einer  $\alpha$ -Interferontherapie bei Patienten mit chronischer Hepatitis C eingesetzt. In Abbildung 17 sind drei repräsentative Verläufe unter Therapie dargestellt.

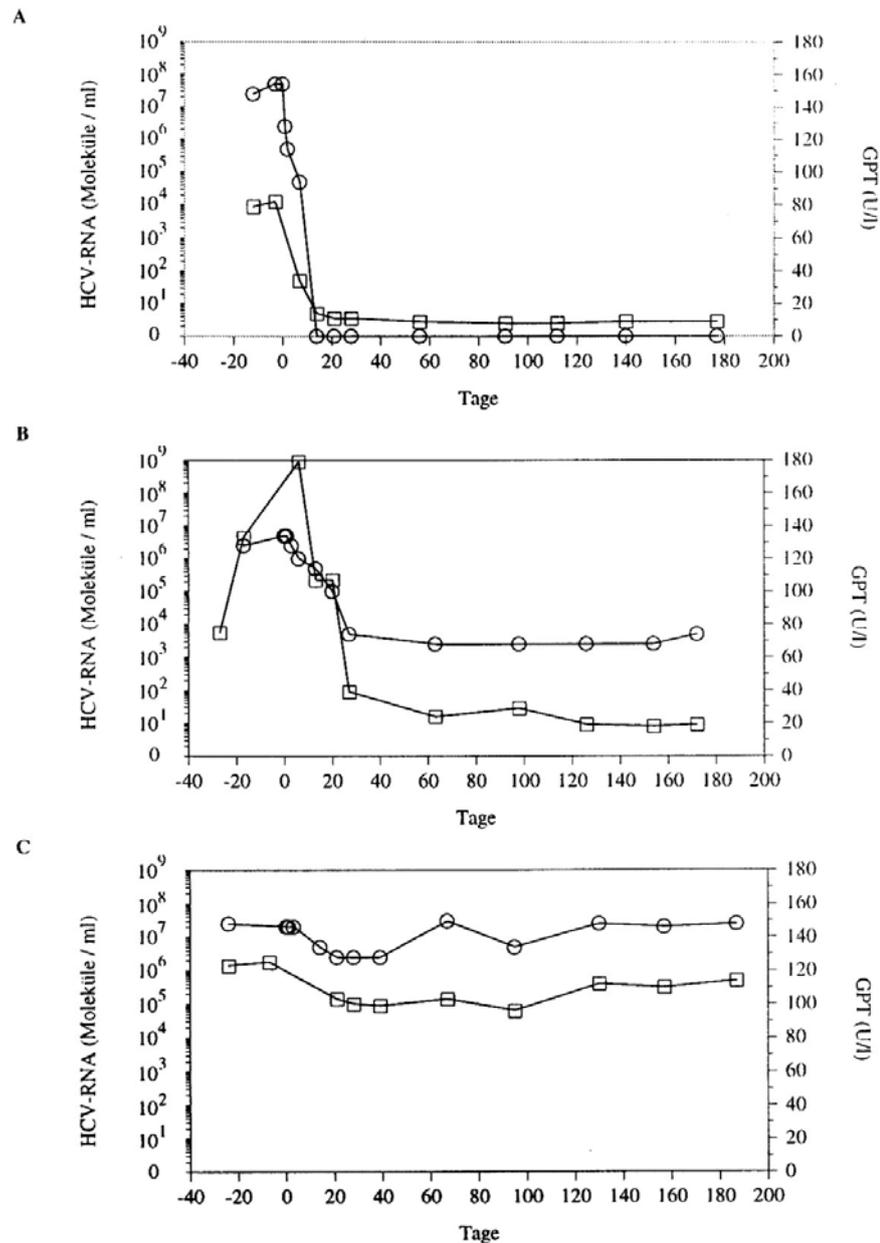


Abb. 17: HCV-RNA-Titer (Moleküle / ml) und GPT-Werte (U / l) im Serum von Patienten unter Therapie mit  $\alpha$ -Interferon. Die Beobachtungszeit betrug 6 Monate. Die Patienten wurden für 6 Monate mit 3 x 3 M / U  $\alpha$ -Interferon s. c. pro Woche behandelt. Die Diagramme zeigen den Verlauf der GPT ( $\square$ ) und des Virustiters (o) bei einem Patienten mit komplettem Ansprechen auf die Therapie (A), einem Patienten mit partiellem Ansprechen (B) und einem Patienten ohne Ansprechen auf die Behandlung (C).

Patient A zeigt ein komplettes Ansprechen auf die Therapie mit Erniedrigung der Transaminasen und nicht mehr nachweisbarer HCV-RNA nach 14 Tagen der Behandlungsdauer. Patient B zeigt ein partielles Ansprechen auf  $\alpha$ -Interferon. Die Transaminasen sinken auf Normalwerte. In bezug auf den Virustiter zeigte sich lediglich eine

Reduktion von  $10^{7,7}$  auf  $10^{3,2}$  HCV-RNA-Molekülen / ml Serum. Bei Patient C ist weder in bezug auf die Transaminasen noch in bezug auf den Virustiter ein Ansprechen auf die Therapie zu erkennen.

#### **4.2.5 Reproduzierbarkeit der quantitativen RT-PCR**

Um die Reproduzierbarkeit der kompetitiven quantitativen RT-PCR zu ermitteln, wurde ein Patientenserum fünf mal zu verschiedenen Zeitpunkten extrahiert und jeweils die Viruskonzentration (wie zuvor beschrieben) quantifiziert. Für die so erhaltenen Viruskonzentrationen wurde die Standardabweichung ermittelt. Die Standardabweichung des Mittelwertes betrug 0,43. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 6,23 %. Die im Verlauf dieser Arbeit entwickelte quantitative RT-PCR liefert somit reproduzierbare Ergebnisse.

#### **4.2.6 Anwendungen der quantitativen RT-PCR**

Die hier etablierte kompetitive quantitative RT-PCR zum HCV-Nachweis wurde nachfolgend für verschiedene Zwecke eingesetzt. Anwendungen waren Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Virustiter und Krankheitsverlauf, und die Verlaufskontrolle während einer  $\alpha$ -Interferontherapie (Rüster et al., *Analytical Biochemistry* 1995, 224: 597 - 600; Zeuzem et al., *Hepatology* 1996, 24: 1003 - 1009). Die Aufstellung einer Kinetik in bezug auf die Verringerung der Viruskonzentration unter der  $\alpha$ -Interferontherapie erlaubte Aussagen zur Wirkung von  $\alpha$ -Interferon. (Zeuzem et al., *Hepatology* 1996, 23: 366 - 371) Zusätzlich wurden mit dieser PCR andere, käuflich erwerbbar quantitative Testverfahren zur HCV-Detektion evaluiert (Roth et al., *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 261 - 264).

### **4.3 Untersuchungen zur in vitro Replikation von HCV**

Um Replikationseigenschaften des Hepatitis C Virus und mögliche pathogene (transformierende) Mechanismen zu untersuchen, wurde versucht, ein Zellkultursystem zur Replikation des Virus aufzubauen. Zur Überwachung der Replikation wurde nicht wie zuvor geplant, die quantitative RT-PCR eingesetzt, da für die Auswertung und Deutung der Replikationsergebnisse die Durchführung einer qualitativen RT-PCR ausreichte.

#### **4.3.1 Austesten verschiedener Zelllinien**

Für die *in vitro* Replikation wurden folgende Zellen ausgetestet: Molt 4, Raji, Hep3B, HepG2, Huh7, immortalisierte Hepatozyten, PBML, primäre humane Hepatozyten (Kulturbedingungen siehe 3.3.7). Nach Inkubation der Zellen mit HCV-positivem Serum (Kapitel 3.3.7.2) wurden die Zellen abzentrifugiert und 100 µl des Überstandes als Positivkontrolle bei -80°C eingefrohren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Für die spätere Überprüfung der Replikation von HCV mittels RT-PCR wurden 100 µl Überstand und jeweils 10<sup>4</sup> Zellen entnommen. Die Entnahme von Zellen und Überstand erfolgte an 10 aufeinanderfolgenden Tagen. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt. Um den Erfolg der Replikation in den verschiedenen Zellsystemen zu überprüfen, erfolgte zunächst der HCV-Nachweis mittels qualitativer RT-PCR unter Verwendung der Primer B<sub>sense</sub> und B<sub>antisense</sub>. Nach 50 Zyklen der Amplifikation wurden 10 µl des Amplifikationsproduktes durch Slot-Blot-Verfahren auf eine Nylonmembran aufgetragen (Kapitel 3.2.2.1), und die Amplifikate wie unter 3.2.2.2 und 3.2.2.3 beschrieben detektiert. Die Ergebnisse der *in vitro* Replikation von HCV zeigt Tabelle 11.

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR sollte die Fluktuation der Viruskonzentration überwacht werden, Da jedoch der Nachweis von HCV in Zellen bzw. Überstand nicht durchgehend an allen aufeinanderfolgenden Tagen mittels der qualitativen PCR möglich war (siehe Tabelle 11), wurde die quantitative RT-PCR in diesem Ansatz nicht zum Nachweis der Replikation eingesetzt.

In HepG2- bzw. Hep3B-Zellen war keine Replikation von HCV nachweisbar. In den übrigen getesteten Zellen konnte während der 10tägigen Beobachtungszeit sporadisch Virus in den Zellen bzw. dem Überstand nachgewiesen werden. Die diskontinuierliche Detektion von HCV in den verschiedenen Zellkultursystemen spricht für eine Replikation des Virus. An Tagen, an welchen in den Zellen bzw. dem Überstand kein Virus nachweisbar ist, befindet sich die Viruskonzentration wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze. Die auftretenden PCR-Signale an den nachfolgenden Tagen sprechen für eine Virusvermehrung über die Nachweisgrenze hinaus.

Tab. 11: qualitativer HCV-Nachweis

Zellen		Tage									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Molt4	Zellen	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	Überstand	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Raji	Zellen	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Überstand	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
HepG2	Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hep3B	Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Huh7	Zellen	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Überstand	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
PBML	Zellen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
immortalisierte Hepatozyten	Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
primäre Hepatozyten	Zellen	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Für die Detektion von HCV-PCR war die Durchführung einer "einfachen"-RT-PCR (One-Tube-PCR) nicht ausreichend. Erst nach Hybridisierung der PCR-Produkte mit biotinylierten Sonden und nachfolgender Enzym-vermittelter Amplifikation des Signals war die Detektion des Hepatitis C Virus in der Kultur möglich. Dies läßt darauf schließen, daß entweder die Replikation des Virus in den ausgetesteten Zellsystemen nur sehr ineffizient erfolgt, oder nur sehr wenige Zellen in der Kultur infiziert sind. Um Untersuchungen zur Pathogenese des Virus durchführen zu können, sind reproduzierbare Ergebnisse in der Zellkultur in bezug auf die *in vitro* Replikation des Virus notwendig. Zwischen der Nachweisbarkeit des Virus und dem Passagieren der Zellen konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

#### **4.3.2 Einfluß von PEG auf die *in vitro* Replikation von HCV**

Um eine Verbesserung der HCV-Infektion in der Zellkultur zu erzielen, wurde der Zusatz von PEG während der Inokulationsphase ausgetestet (Gripon et al., 1993; Durchführung siehe Kapitel 3.3.7.2). Durch PEG sollte die Adsorption des Virus an die Zelloberfläche verbessert werden, um das Eindringen des Virus in die Zelle zu erleichtern. Wie Tabelle 12 zeigt, hatte der Zusatz von PEG keinen entscheidenden Einfluß auf die *in vitro* Replikation von HCV in den getesteten Zellsystemen. Wie zuvor bei den durchgeführten Untersuchungen zur *in vitro* Replikation ohne PEG (4.3.1) war das Virus nur sporadisch innerhalb der 10 Tage Beobachtungszeit nachweisbar. In einigen Fällen konnte beobachtet werden (Molt 4, Raji, Hep3B), daß die Zellen bzw. der Überstand trotz gründlicher Waschschriffe am ersten Tag nach der Inokulation positive Signale zeigten. Durch PEG scheint die Adsorption des Hepatitis C Virus an die Zellen verstärkt zu sein. Dies hat jedoch, Tabelle 12 zeigt das, keinen Einfluß auf die eigentliche Replikation des Virus in den Zellen. In den beiden Hepatozyten- Zelllinien HepG2 und Hep3B ist wie zuvor auch mit Zusatz von PEG kein Virus innerhalb der 10tägigen Beobachtungszeit nachweisbar

Tab. 12: qualitativer HCV-Nachweis in verschiedenen Zellen. Einfluß von PEG auf die *in vitro* Replikation.

Zellen		Tage										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Molt4	Zellen	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	
	Überstand	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
Raji	Zellen	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Überstand	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
HepG2	Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hep3B	Zellen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
primäre Hepatozyten	Zellen	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	Überstand	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	

#### 4.3.3 Einfluß von Lipoproteinen auf die *in vitro* Replikation von HCV

Da in einigen Publikationen über die Beteiligung von Lipoproteinen bei der Aufnahme des Hepatitis C Virus in die Wirtszellen (Hepatozyten) berichtet wurde, wurde das für die *in vitro* Replikation eingesetzte HCV-positive Serum vor Inkubation mit verschiedenen Hepatozytenzelllinien bzw. primären Hepatozyten, mit einem Gemisch von Lipoproteinen inkubiert (Kapitel 3.3.7.2). In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der HCV-Replikation in den verschiedenen eingesetzten Zellsystemen dargestellt. Wie die Ergebnisse zeigen, hat die Vorinkubation des HCV-positiven Serums keinen entscheidenden Einfluß auf die Replikation des Virus im Zellkultursystem. In den Zelllinien HepG2 und Hep3B ist wie schon zuvor beschrieben kein HCV nachweisbar.



Tab. 13: qualitativer HCV-Nachweis in verschiedenen Zellen. Einfluß von Lipoproteinen auf die *in vitro* Replikation.

Zellen		Tage										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
HepG2	Zellen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hep3B	Zellen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
primäre Hepatozyten	Zellen	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Überstand	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4.3.4 Aufbau einer HCV-replizierenden Zelllinie aus metastasierenden HCV-positiven Zellen eines hepatozellulären Karzinoms

Als Alternative zu den oben beschriebenen Ansätzen zum Aufbau eines HCV-Replikationssystems zur Untersuchung der Tumorgenese diente die Kultivierung HCV-positiver Tumorzellen. Ein solches funktionierendes Kultursystem erlaubt zudem, unter bestimmten Voraussetzungen, Untersuchungen zur Pathogenität des Virus, indem Genomabschnitte des Virus aus dem Tumor mit Sequenzen des Virus aus Serum verglichen werden können (siehe auch Kapitel 4.4). In Kapitel 3.3.7.4 ist die Aufreinigung der aus dem Blut isolierten Zellen dargestellt. Für den Aufbau einer HCV-replizierenden Zelllinie wurde versucht, Metastasen eines hepatozellulären Karzinoms aus Blut anzuzüchten. Das verwendete EDTA-Blut stammte von einem Patienten mit chronischer Hepatitis C (Beschreibung des Patienten siehe 4.4.1), der sich drei Jahre zuvor einer orthotopen Lebertransplantation unterzogen hatte. Da die neu implantierte Leber nach drei Jahren erneut multilokuläre Karzinome aufwies, wurde davon ausgegangen, daß im Blut des Patienten Metastasen vorhanden sind. Das von diesem Patienten erhaltene EDTA-Blut wurde einerseits direkt in Kulturmedium gegeben, andererseits die Zellen durch Zentrifugieren bzw. Ficoll-Gradienten zuvor aufgereinigt.

Die Zellen in jenen Kulturflaschen, in welchen das EDTA-Blut direkt ins Medium gegeben wurde, hafteten nicht an den Böden der Flaschen. Nach drei Wochen wurde die Kultivierung dieser Zellen aufgegeben. Bei den Kulturflaschen mit den vorgereinigten Zellen (Kapitel

3.3.7.4) hafteten verschiedene Zellen bei den Gelatine- und Collagen I-beschichteten Kulturflaschen. Jedoch konnte keine genaue Aussage über die verschiedenen Zelltypen gemacht werden. Nach zwölf Wochen Kultivierung starben auch die letzten Zellen in diesen Kulturansätzen ab. Zwischenzeitlich durchgeführte PCR-Untersuchungen (nach 14 Tagen Kultivierung) zeigten, daß das Kulturmedium weiterhin schwach HCV-positiv war.

#### **4.4 Tumorigenität von HCV**

Für Untersuchungen zur Pathogenität des Hepatitis C Virus, insbesondere in bezug auf die Entstehung hepatozellulärer Karzinome, konnten die zuvor ausgetesteten *in vitro* Replikationssysteme nicht eingesetzt werden, da der Virustiter in der Kultur, und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht ausreichten. Daher wurde versucht, durch direkte Isolierung von HCV aus Tumorgewebe Aufschluß über mögliche tumorigene Mechanismen zu erhalten.

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit eines der häufigsten malignen Tumoren. Zahlreiche epidemiologische Studien weisen das Hepatitis C Virus mit großer Wahrscheinlichkeit als tumorinduzierendes Virus aus. Um einen möglichen direkten Einfluß von HCV auf die Tumorentstehung zu untersuchen, wurde Virus-RNA aus Tumor, Peritumor und Serum eines Patienten isoliert, und verschiedene Bereiche des HCV-Genoms nach Sequenzunterschieden untersucht.

##### **4.4.1 Beschreibung des Patienten**

Das für die Sequenzuntersuchungen eingesetzte Lebergewebe stammte von einem Patienten, welcher erstmals 1982 erhöhte Leberwerte aufwies. 1986 wurde nach histologischen Untersuchungen eine progrediente kleinknotige Leberzirrhose diagnostiziert. Die Serologie war Anti-HBs-Ag negativ. 1990 wurde ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) im rechten Leberlappen des Patienten gefunden. Der Hepatitis C-Antikörpernachweis war positiv. Im Mai 1992 wurde eine orthotope Lebertransplantation durchgeführt. Die hier verwendeten Gewebeproben (T = Tumor und P = Peritumor) entstammen dem explantierten Organ.

Die HCV-Serologie war im Juli 1992 erneut HCV-positiv (Serum 0060); die Transaminasen waren erhöht. Im Oktober 1992 (Serum 0362) zeigte die histologische Untersuchung entzündliche Anzeichen einer HCV-Reinfektion. Im Juli 1994 wurden mittels Sonografie multilokuläre HCC-Rezidive im rechten und linken Leberlappen festgestellt. Histologisch zeigte sich ein mäßig differenziertes trabekuläres HCC. Im Frühjahr 1995 verstarb der Patient. Zum Zeitpunkt der Transplantation war der Patient HGV-RNA negativ. Die HGV-PCR wurde am Georg-Speyer-Haus von Frau Dr. Waschk durchgeführt. 1995 war der Patient HGV-PCR-positiv.

Das 1992 durch die Transplantation erhaltene Lebergewebe wurde für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. In Abbildung 18 ist der histologische Schnitt des Tumor- bzw. Peritumorgewebes dargestellt. Unter mikroskopischer Sicht konnten Tumorzellen und nicht transformierte Zellen deutlich unterschieden werden. Die Isolierung der Virus-RNA aus Tumor- und Peritumorgewebe erfolgte wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben.

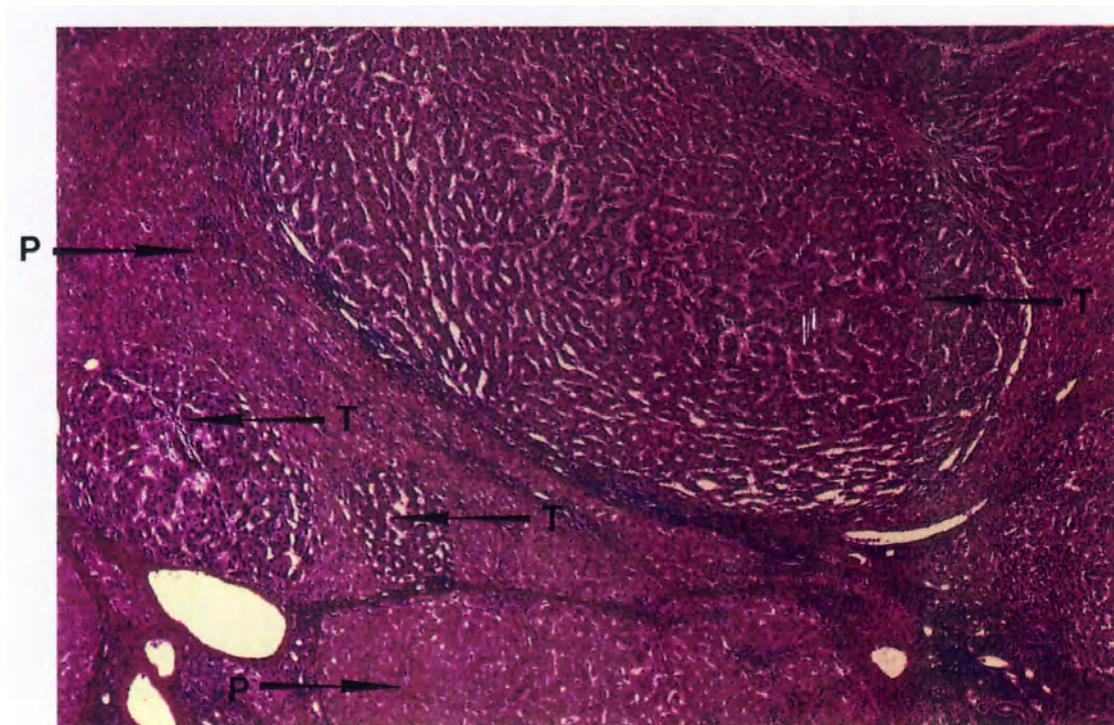


Abb. 18: Histologischer Schnitt durch das Lebergewebe nach Hematoxylin / Eosin-Färbung.  
T = Tumorgewebe, P = Peritumorgewebe (Vergrößerung: 1: 20)

#### 4.4.2 Sequenzierung der 5'-NC-Region

Die 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus ist hoch konserviert. Sie spielt bei der Regulierung von Replikation und Translation eine wichtige Rolle. Veränderungen in dieser Region können einen Einfluß auf die Pathogenität des Virus haben. Aus diesem Grund wurden erste Untersuchungen von HCV-Isolaten aus Tumor- und Peritumorgewebe sowie Serum dieses Patienten innerhalb der 5'-NC-Region vorgenommen. Hierzu wurde eine RT-PCR mit den Primern B<sub>sense</sub> und B/C<sub>antisense</sub> durchgeführt. Eine Amplifikation von größeren RNA-Fragmenten (> 400 bp) war durch die Fixierung des Gewebes mit Formalin in vielen Fällen nicht möglich. In Abbildung 19 sind die Sequenzen (213 Basen) von 3 verschiedenen Extrakten nach RT-PCR dargestellt.

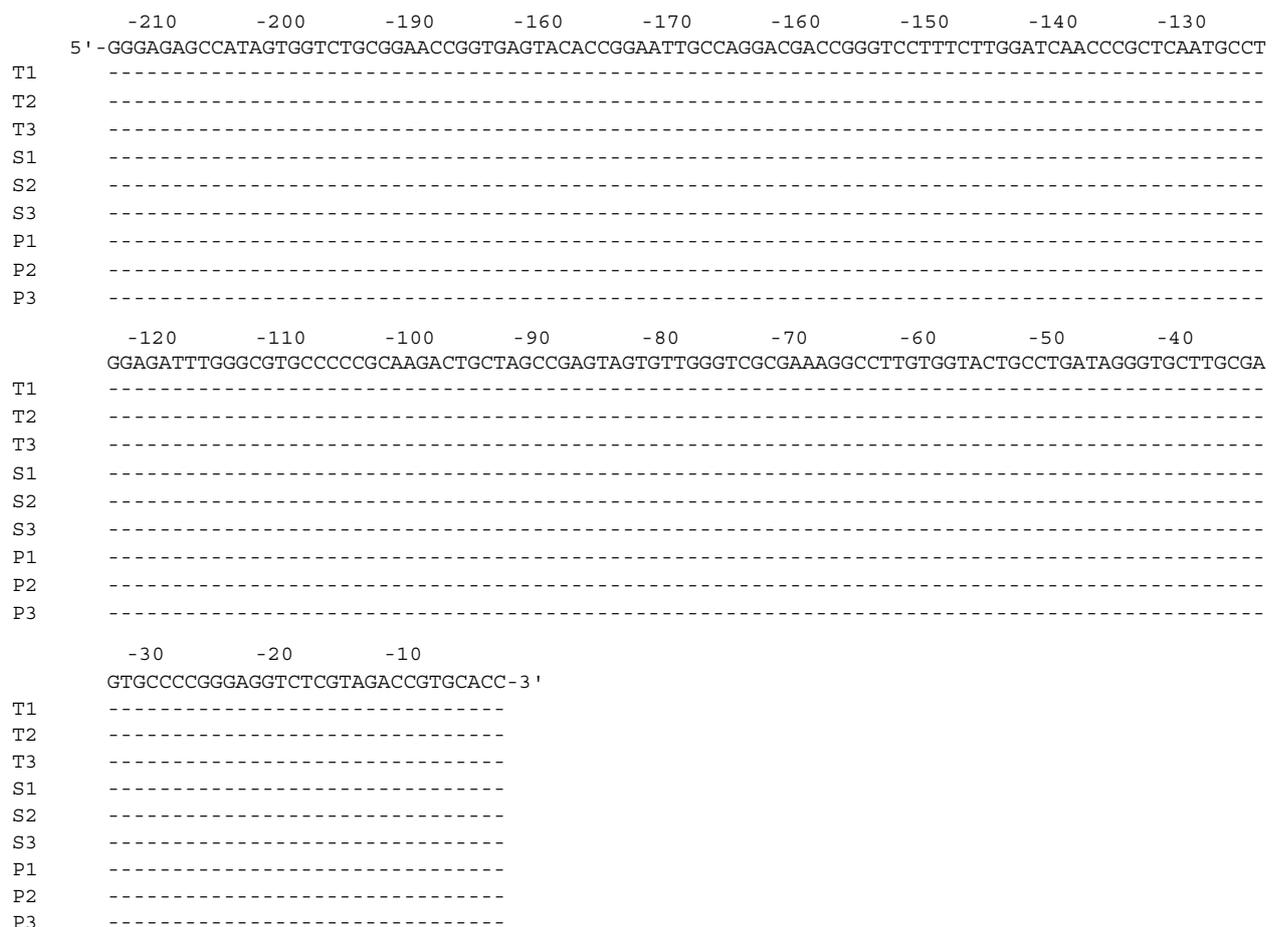


Abb. 19: Sequenzen von Position -210 bis -1 der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus. Die Sequenzen sind im Vergleich zur HCV-1-Sequenz von Choo et al. (1989) dargestellt (oberste ausgeschriebene Zeile). T = Tumorgewebe, S = Serum und P = Peritumorgewebe. Die Zahlen hinter den Buchstaben (S1, S2 usw.) bezeichnen die verschiedenen separaten Extraktionen mit nachfolgender PCR und Sequenzierung. Mit der von Choo et al. (1989) veröffentlichten Sequenz identische Nukleotide sind als Striche dargestellt.

Innerhalb des sequenzierten Bereichs der 5'-NC-Region treten zwischen den Isolaten aus Tumorgewebe, Serum bzw. Peritumor keine Nukleotidunterschiede auf. Die erhaltenen Sequenzen weisen eine 100 %ige Homologie mit dem von Choo et al. beschriebenen HCV-1-Isolat auf. Anhand der erhaltenen Sequenz kann das isolierte Virus als Genotyp 1 klassifiziert werden. Da jedoch die Einteilung in Subtypen anhand der 5'-NC-Region nicht eindeutig ist, mußte für eine endgültige Bestimmung des HCV-Subtypen eine weitere Region des Virus sequenziert werden (siehe 4.4.3).

#### **4.4.3 Sequenzierung der NS5-Region**

Die NS5-Region des Hepatitis C Virus kodiert für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Replikase). Diese spielt eine entscheidende Rolle bei der Replikation des Virus. Mutationen innerhalb dieses Genomabschnittes können wesentliche Veränderungen der Replikationseigenschaften des Virus und somit der Pathogenität zur Folge haben.

##### **4.4.3.1 Direkte Sequenzierung der NS5-Region**

Mittels der nested Primerpaare N5/1<sub>external sense</sub>, N5/1<sub>external antisense</sub> und N5/1<sub>internal sense</sub>, N5/1<sub>internal antisense</sub> bzw. der nested Primerpaare N5/2<sub>external sense</sub>, N5/2<sub>external antisense</sub> und N5/2<sub>internal sense</sub>, N5/2<sub>internal antisense</sub> (siehe Tabelle 1) wurden in getrennten PCRs überlappende Bereiche der NS5-Region von HCV-Isolaten aus Tumorgewebe, Serum und Peritumorgewebe amplifiziert, und anschließend die PCR-Produkte direkt sequenziert. In Abbildung 20 ist die sich ergebende Sequenz der beiden PCR-Produkte von Position 7970 bis 8529 dargestellt. Die Nukleotidsequenz zeigt eine 97 %ige Homologie zur HCV-1-Sequenz von Choo et al. (1989). Bei den HCV-Isolaten aus dem Tumor- und Peritumorgewebe sowie dem Serum des Patienten handelt es sich um den HCV-Subtyp 1 a. Die Nukleotidsequenzen der HCV-Isolate aus Peritumor und Serum sind identisch. Die Sequenzen aus Serum bzw. Peritumor unterscheiden sich in 14 Positionen von der HCV-1-Sequenz. Dreizehn dieser Mutationen führen jedoch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. An Nukleotidposition 8159 führt die Substitution von G → A zu dem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Glutamin. Dieser

Sequenzunterschied tritt in der Serum-, Peritumor- und in der Tumor-Sequenz auf. Die Tumorsequenz unterscheidet sich ebenfalls an 14 Positionen von der HC V-1-Sequenz, wobei die Mutationen nicht in allen Fällen mit denen aus dem Serum bzw. Peritumor übereinstimmen.

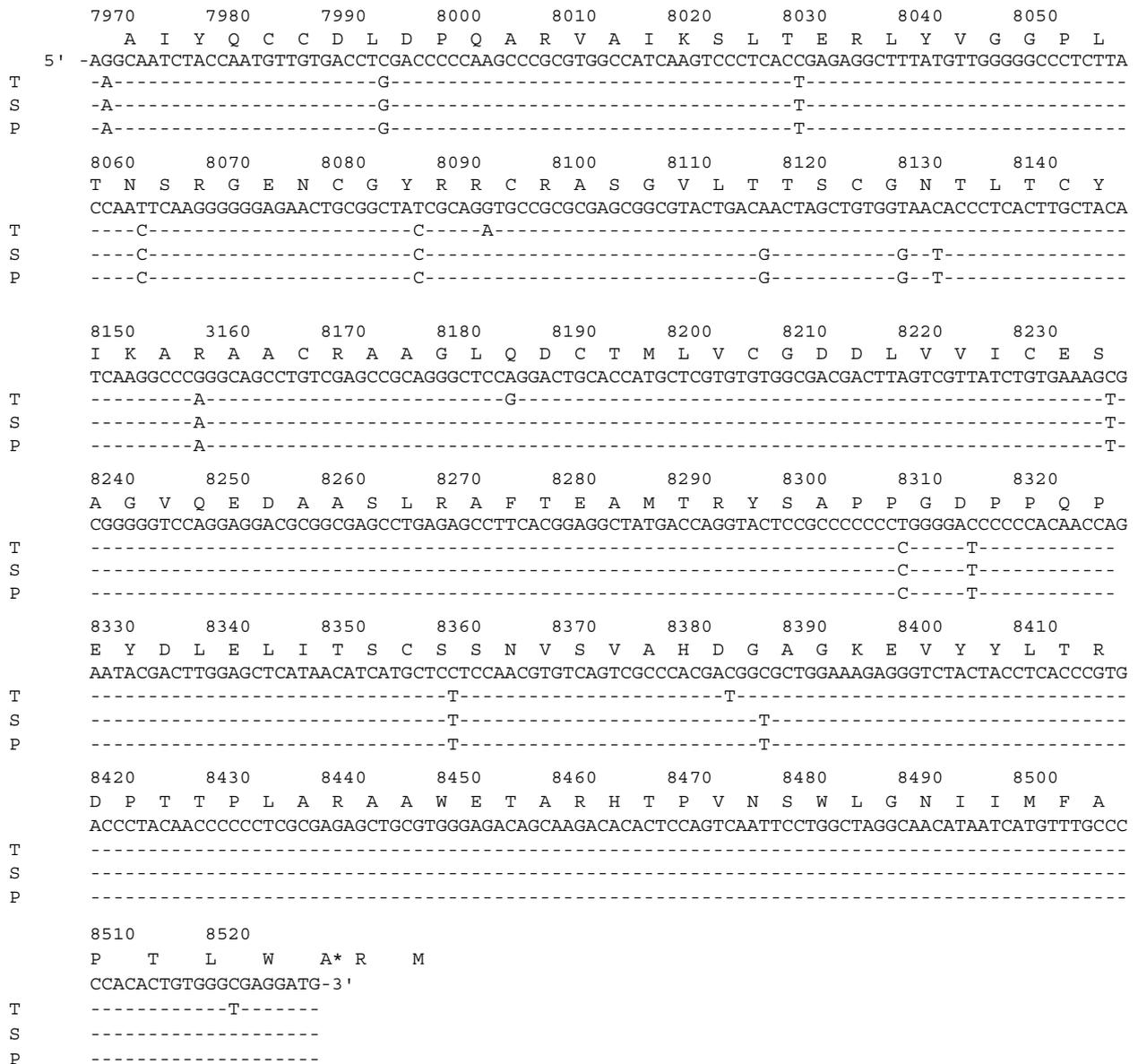


Abb. 20: Nukleotidsequenz von Position 7970 bis 8529 von HCV-Isolaten aus Tumorgewebe, Serum und Peritumorgewebe. In der jeweils obersten Zeile der dargestellten Sequenzen ist die Nukleotidposition nach Choo et al. (1989) aufgeführt. Darunter ist die sich aus der Nukleotidsequenz des HCV-1-Isolates von Choo et al. (1989) ergebende Aminosäuresequenz dargestellt. Nukleotid-austausche im Vergleich zur HCV-1-Sequenz sind mit Buchstaben markiert, identische Nukleotide sind als Striche dargestellt. An Position 8522 (mit einem Stern markiert) kommt es aufgrund einer Punktmutation (C → T) zu einem Aminosäureaustausch (Alanin → Valin).

Die Nukleotidsequenz von HCV-Isolaten aus Tumor und Peritumor bzw. Serum unterscheidet sich an 8 Positionen (Abb. 20). Sieben der Mutationen betreffen die dritte Position eines Kodons und haben keinen Aminosäureaustausch zur Folge (Wobble-Effekt). An Nukleotidposition 8522 weist das Tumorisolat im Vergleich zur Peritumor- bzw. Serumsequenz aufgrund einer Punktmutation (C → T) einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Valin auf. Dies ist ein Austausch einer neutralen Aminosäure gegen eine andere neutrale Aminosäure im Protein. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß im Serum bzw. Peritumor des Patienten eine andere HCV-Variante vorhanden ist als im Tumorgewebe.

#### **4.4.3.2 Sequenzierung der NS5-Region von HCV-Isolaten aus verschiedenen Bereichen des Tumor- bzw. Peritumorgewebes**

Um auszuschließen, daß es sich bei den verschiedenen Sequenzen aus Peritumor- und Tumorgewebe um eine zufällige Verteilung von HCV-Varianten im Lebergewebe handelt, wurde HCV-RNA aus jeweils drei verschiedenen Bereichen des Tumor- bzw. Peritumorgewebes isoliert und mit dem Primerset N5/1 (Tabelle 1) eine nested RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der direkten Sequenzierung sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die HCV-Sequenzen aus drei verschiedenen Bereichen des Tumorgewebes (T 1 - 3) sind identisch, ebenso die Sequenzen aus den drei Peritumbereichen (P 1 - 3). Die Nukleotidunterschiede zwischen HCV-Sequenzen aus Tumor- bzw. Peritumorgewebe sind die gleichen wie zuvor in Abbildung 20 beschrieben. Die dargestellten Sequenzen zeigen, daß die zuvor beschriebenen HCV-Varianten nicht zufällig über das Lebergewebe verteilt, sondern für Tumor- bzw. Peritumorgewebe spezifisch sind.

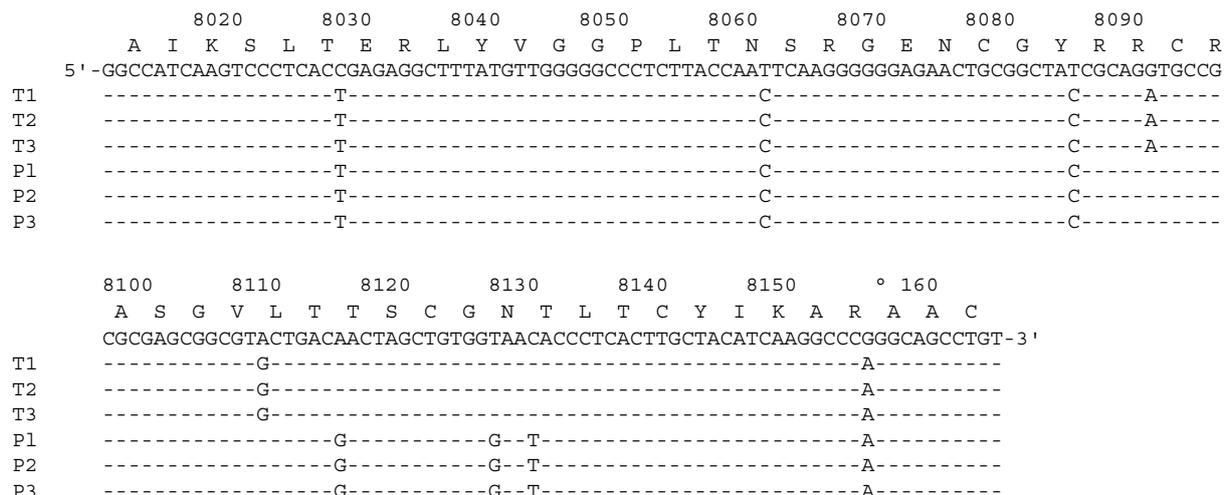


Abb.21: Nukleotidsequenzen von Position 8013 bis 8169 der NS5-Region von HCV-Isolaten aus drei verschiedenen Bereichen des Tumors (T 1 - 3) bzw. Peritumors (P 1 - 3). In der obersten Zeile ist, wie in Abbildung 20, die Nukleotidposition nach Choo et al. (1989) und darunter die Aminosäuresequenz dargestellt. Als Reverenz-Sequenz dient die von Choo et al. (1989) veröffentlichte Sequenz des HCV-1-Isolates. Nukleotidaustausche im Vergleich zur HCV-1-Sequenz sind mit Buchstaben markiert, identische Nukleotide sind als Striche dargestellt.

#### 4.4.3.3 Verteilung von HCV-Varianten im Serum, Tumor- und Peritumorgewebe anhand der NS5-Region

Die bisher durchgeführte direkte Sequenzierung der PCR-Produkte aus Tumor- bzw. Peritumorgewebe zeigt nur die am häufigsten vorhandene HCV-Variante. Durch die direkte Sequenzierung ist es jedoch nicht ohne weiteres möglich, weitere - weniger häufig vorkommende - HCV-Varianten im Gewebe zu detektieren. Um das Vorhandensein weiterer HCV-Varianten zu untersuchen, wurde mittels des Primersets N5/1 (Tabelle 1) eine nested RT-PCR von HCV-Isolaten aus Tumor, Peritumor und Serum durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt in den pGEM-T-Vektor kloniert. Klone mit dem NS5-Fragment wurden auf X-Gal-Platten selektiert und abgeimpft. Nach Lyse der Zellen (Kapitel 3.3.3.1) wurde eine DNA-PCR mit dem Primerpaar N5/1<sub>internal</sub> (Tabelle 1) durchgeführt und die resultierenden Amplifikate von jeweils zehn verschiedenen Klonen sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 22 dargestellt.



	8020	8030	8040	8050	8060	8070	8080	8090
	A I K S L T E R L Y V G G P L T N S R G E M C G Y R R C R							
5'	-GGCCATCAAGTCCCTCACCGAGAGGCTTTATGTTGGGGGCCCTCTTACCAATTCAAGGGGGGAGAACTGCGGCTATCGCAGGTGCCG							
T1	-----T-----C-----C-----A-----							
T2	-----T-----C-----C-----A-----							
T3	-----T-----C-----C-----A-----							
T4	-----T-----C-----C-----A-----							
T5	-----T-----C-----C-----A-----							
T6	-----T-----C-----C-----A-----							
T7	-----T-----C-----C-----A-----							
T8	-----T-----C-----C-----A-----							
T9	-----T-----C-----C-----A-----							
T10	-----T-----C-----C-----A-----							
P1	-----T-----C-----C-----C-----							
P2	-----T-----C-----C-----C-----							
P3	-----T-----C-----C-----C-----							
P4	-----T-----C-----C-----C-----							
P5	-----T-----C-----C-----C-----							
P6	-----T-----C-----C-----C-----							
P7	-----T-----C-----C-----C-----							
P8	-----T-----C-----C-----C-----							
P9	-----T-----C-----C-----C-----							
P10	-----T-----C-----C-----C-----							
S1	-----T-----C-----C-----C-----							
S2	-----T-----C-----C-----C-----							
S3	-----T-----C-----C-----C-----							
S4	-----T-----C-----C-----C-----							
S5	-----T-----C-----C-----C-----							
S6	-----T-----C-----C-----C-----							
S7	-----T-----C-----C-----C-----							
S8	-----T-----C-----C-----C-----							
S9	-----T-----C-----C-----C-----							
S10	-----T-----C-----C-----C-----							
	8100	8110	8120	8130	8140	8150	8160	
	A S G V L T T S C G N T L T C Y I K A R A A C							
	CGCGAGCGGCGTACTGACAACCTAGCTGTGGTAACACCCTCACTTGCTACATCAAGGCCCGGGCAGCCTGT-3'							
T1	-----G-----A-----							
T2	-----G-----A-----							
T3	-----G-----A-----							
T4	-----G-----A-----							
T5	-----G-----A-----							
T6	-----G-----A-----							
T7	-----G-----A-----							
T8	-----G-----A-----							
T9	-----G-----A-----							
T10	-----G-----A-----							
P1	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P2	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P3	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P4	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P5	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P6	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P7	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P8	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P9	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
P10	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S1	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S2	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S3	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S4	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S5	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S6	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S7	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S8	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S9	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----			
S10	-----T-----	-----G-----		-----G-T-----		-----A-----		

Abb. 22: Sequenzen von jeweils zehn Klonen aus HCV-Isolaten aus Tumor (T 1 - 10), Peritumor (P 1 - 10) und Serum (S 1 - 10) von Position 8013 bis 8169 der NS5-Region von HCV. In der obersten Zeile ist, wie in Abbildung 20, die Nukleotidposition nach Choo et al. (1989) und darunter die Aminosäuresequenz dargestellt. Als Reverenz-Sequenz dient die von Choo et al. (1989) veröffentlichte Sequenz des HCV-1-Isolates. Nukleotidaustausche im Vergleich zur HCV-1-Sequenz sind mit Buchstaben markiert, identische Nukleotide sind als Striche dargestellt.

Die erhaltenen Sequenzen der zehn Klone des Tumorisolates sind untereinander identisch und unterscheiden sich in den unter 4.4.3. 1 beschriebenen Nukleotidpositionen von den Sequenzen der HCV-Isolate aus Peritumor und Serum. Die Sequenzen der zehn verschiedenen Klone aus dem Peritumor sind ebenfalls identisch. Sieben Klone von HCV-Isolaten aus dem Serum des Patienten stimmen mit den Sequenzen aus dem Peritumor überein. Drei der Sequenzen weisen jedoch Punktmutationen auf, wobei zwei der Sequenzen identisch sind (jeweils Mutationen an Nukleotidposition 8131; G → T Mutation im Vergleich zu den anderen Sequenzen aus dem Serum). Die dritte abweichende Sequenz zeigt an Position 8103 eine C → T Mutation. Die Mutationen der drei abweichenden Sequenzen aus dem Serum führen nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Durch die Klonierung konnten im Serum drei verschiedene HCV-Varianten nachgewiesen werden. Dagegen kann anhand der Sequenzierung von zehn Klonen aus Tumor- bzw. Peritumorgewebe nur das Vorhandensein jeweils einer Variante im Tumor- bzw. Peritumorgewebe aufgezeigt werden. Falls noch weitere HCV-Varianten im Gewebe vorhanden sind, die sich in diesem Genombereich unterscheiden, so liegt deren Anteil unter 10 % bzw. befinden sich in anderen Gewebearealen der Leber, die nicht in diesem histologischen Schnitt erfaßt wurden.

#### **4.4.4 Sequenzierung der Core-Region**

Die Core-Region des Hepatitis C Virus kodiert für das Kernprotein des Virus. Das Protein besitzt verschiedene Eigenschaften, die für einen möglichen tumorigenen Einfluß verantwortlich sein können, wie die Fähigkeit, Nukleinsäuren zu binden.

Mittels der Primerpaare C1<sub>external</sub> und C1<sub>internal</sub> (Tabelle 1) wurde eine nested RT-PCR von HCV-Isolaten aus Serum, Peritumor und Tumor durchgeführt. Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ergab keine Sequenzunterschiede zwischen HCV-Isolaten aus Serum und Peritumor (Abb. 23). Die mehrfache direkte Sequenzierung zweier PCR-Produkte (zwei getrennte Extraktionen) von Tumorisolaten (mit T1/D1-2 und T2/D1-3 beschriftet, Abb. 23) zeigte Sequenzunterschiede im Vergleich zur Peritumor- bzw. Serumsequenz. Ebenfalls wiesen die unterschiedlichen direkten Sequenzierungen unterschiedliche Nukleotidsequenzen mit zum Teil starkem Hintergrund auf, was für eine Überlagerung mehrerer Sequenzen spricht.

Da sich die Sequenzen der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten aus Tumorisolaten unterschieden, wurde mittels Klonierung versucht, die unterschiedlichen HCV-Varianten im Tumorgewebe nachzuweisen. Dazu wurden die PCR-Produkte in den pCRII-Vektor kloniert und anschließend jeweils zehn Klone von Serum- und von Peritumorisolaten sowie zwanzig Klone von Tumorisolaten sequenziert. Alle Serumklone waren bis auf einen identisch. In Abbildung 23 ist in der obersten Reihe stellvertretend für acht weitere Sequenzen der Serumisolate die Sequenz S/9 dargestellt. Klon S/10 besitzt an der Nukleotidposition 204 eine A → G Mutation, welche jedoch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt. Die sequenzierten Klone des PCR-Produktes von Peritumorisolaten sind identisch mit den im Serum des Patienten vorherrschenden HCV-Sequenzen. Stellvertretend für die klonierten Peritumorsequenzen ist P/1 aufgeführt; sie ist mit der Sequenz aus der direkten Sequenzierung des Peritumorisolates (P1/D1) identisch.

Die Sequenzen der klonierten PCR-Produkte T1 und T2 sind ebenfalls in Abbildung 23 dargestellt (T1 und T2 jeweils 10 Klone). Die Mutationen, die die direkte Sequenzierung aufzeigt (T1/D 1-2 und T2/D1-3), sind in den verschiedenen klonierten Sequenzen wiederzufinden.

Die Klone T1/1, T1/2, T1/6, T1/8 und T1/9 sind identisch. Sie weisen an den Nukleotidpositionen 51 und 53 jeweils eine Deletion einer Base auf. Durch den Verlust der beiden Nukleotide kommt es zu einem Verschieben des Leserasters und zum Auftreten eines Stopkodons (TAG) an der Nukleotidposition 126 bis 128 (Aminosäureposition 42). Eine weitere Deletion an Nukleotidposition 152 hat aufgrund des zuvor auftretenden Stopkodons keinen Einfluß auf die Aminosäurezusammensetzung der Virusproteine. Die Klone T 1/4, T1/5, T1/7 besitzen ebenfalls die zuvor beschriebenen Deletionen. Zusätzlich treten in 3'-Richtung von der Nukleotidposition 128 noch weitere Punktmutationen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Sequenzen auf, die jedoch aufgrund des Stopkodons an Aminosäureposition 42 keinen Einfluß auf die Proteinsequenz haben. Die Klone T1/10, T2/1 und T2/4 weisen ebenfalls an Nukleotidposition 51 und 53 eine Deletion einer Base auf, unterscheiden sich jedoch von den zuvor beschriebenen Klonen durch eine Aminosäuresubstitution an Position 16 (Alanin → Serin). Die weiter 3'-auftretenden Sequenzunterschiede zwischen den drei Klonen haben auf die sich ergebende Aminosäureabfolge des Core-Proteins

aufgrund des an Aminosäureposition 42 auftretenden Stopkodons keinen Einfluß. Die bei den Klonen T 1/10 und T2/4 an Nukleotidposition 15 auftretende Basensubstitution (T → C) betrifft die dritte Position des Kodons und hat keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge (Wobble-Effekt). Die sich ergebenden Proteinsequenzen sind in Abbildung 24 dargestellt (CV = Core-Varianten). Die Aminosäuresequenz CV1/1 ergibt sich aus den Nukleotidsequenzen T1/1, T1/2, T1/4, T1/5, T1/6, T1/7, T1/8 und T1/9 und die Aminosäuresequenz CV2/1 aus den Nukleotidsequenzen T1/10, T2/1 und T2/4.

	1	11	21	31	41	51	61	71	81
5'	-ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAAAAAAAACAAACGTAACACCAACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCTCCGGGTGGCGGTCAGATC								
S/9	-----G-----C-----C-----T-----								
3/10	-----G-----C-----C-----T-----								
P1/D1	-----G-----C-----C-----T-----								
p /1	-----G-----C-----C-----T-----								
T1/D1	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/D2	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T2/D1	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T2/D2	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----T-----								
T2/D3	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/1	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/2	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/6	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/8	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/9	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/4	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/5	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/7	-----G-----C-----Δ-Δ-----T-----								
T1/10	-----C-----G-----C-----G-----Δ-Δ-----T-----								
T2/1	-----G-----C-----G-----Δ-Δ-----T-----								
T2/4	-----C-----G-----C-----G-----Δ-Δ-----T-----								
T2/2	-----G-----C-----T-----T-----								
T2/3	-----G-----C-----T-----T-----								
T2/5	-----G-----C-----T-----T-----								
T2/7	-----G-----C-----T-----T-----								
T2/8	-----G-----C-----T-----T-----								
T2/10	-----G-----C-----T-----T-----								
T1/3	-----G-----C-----ΔΔΔ-----T-----								
T2/6	-----G-----C-----Δ-----T-----T-----								
T2/9	-----G-----C-----Δ-----T-----T-----								

	91	101	111	121	131	141	151	161	171	
	GTTGGTGGAGTTTACTTGTTCGCCGCGCAGGGGCCCTAGATTGGGTGTGCGCGCGACGAGAAAAGACTTCCGAGCGGTTCGCAACCTCGAGGT									
S/9	-----								G	-----
S/10	-----								G	-----
P1/D1	-----								G	-----
P /1	-----								G	-----
T1/D1	-----								Δ	-----
T1/D2	-----								Δ	-----
T2/D1	-----								Δ	-----
T2/D2	-----								G	-----
T2/D3	-----								Δ	-----
T1/1	-----								Δ	-----
T1/2	-----								Δ	-----
T1/6	-----								Δ	-----
T1/8	-----								Δ	-----
T1/9	-----								Δ	-----
T1/4	-----								Δ	-----
T1/5	-----								Δ	-----T
T1/7	-----								Δ	-----A
T1/10	-----								G	-----
T2/1	-----								G	-----
T2/4	-----								G	-----
T2/2	-----								G	-----
T2/3	-----								G	-----
T2/5	-----								G	-----
T2/7	-----								G	-----
T2/8	-----								G	-----
T2/10	-----								G	-----
T1/3	-----								Δ	-----
T2/6	-----								G	-----
T2/9	-----								G	-----

	181	191	201	211	221	231	241	251	261
	AGACGTCAGCCTATCCCCAAGGCTCGTCGGCCCCGAGGGCAGGACCTGGGCTCAGCCCCGGTACCCTTGGCCCCCTCTATGGCAATGAGGGC								
S/9	-----		A	-----		G	-----		
S/10	-----		G	-----		G	-----		
P1/D1	-----		A	-----		G	-----		A
P /1	-----		A	-----		G	-----		
T1/D1	-----		A	-----		G	-----		
T1/D2	-----		A	-----		G	-----		
T2/D1	-----		A	-----		G	-----		
T2/D2	---AC---	-----		G	-----		-----		A
T2/D3	-----		A	-----		G	-----		
T1/1	-----		A	-----		G	-----		
T1/2	-----		A	-----		G	-----		
T1/6	-----		A	-----		G	-----		
T1/8	-----		A	-----		G	-----		
T1/9	-----		A	-----		G	-----		
T1/4	---AC---	-----		A	-----		G	-----	
T1/5	-----		A	-----		G	-----		
T1/7	-----		A	-----		G	-----		A
T1/10	-----		A	-----T	-----	G	-----G	-----	
T2/1	-----		A	-----T	-----	G	-----		
T2/4	-----		A	-----T	-----	G	-----		
T2/2	---C---	-----		G	-----				
T2/3	---C---	-----		G	-----				
T2/5	---C---	-----		G	-----		-----		C
T2/7	---C---	-----		G	-----G	-----A	-----		
T2/8	---C---	-----		G	-----G	-----A	-----		
T2/10	---C---	-----		G	-----		-----		
T1/3	-----		A	-----		G	-----		
T2/6	---C---	-----		G	-----				
T2/9	---C---	-----		G	-----				

Abb. 23 Nukleotidsequenz von Position 1 bis 270 (nach Choo et al., 1989) der Core-Region von HCV-Isolaten aus Serum (S), Peritumor- (P) bzw. Tumorgewebe (T). Die direkt sequenzierten PCR-Produkte sind mit P/D bzw. T/D beschriftet, die klonierten PCR-Produkte mit T1/.. bzw. T2/.. (zwei verschiedene PCR-Produkte aus der gleichen Region des Tumors).

Die Klone T2/2, T2/3, T2/5, T2/7, T2/8, T2/10 besitzen an Nukleotidposition 85 eine C → T Substitution. Hierdurch kommt es zur Generierung eines Stopkodons an der Nukleotidposition 85 bis 87 und somit nach 28 Aminosäuren zum Abbruch der Proteinsynthese. Die resultierende Aminosäuresequenz CV2/2 ist in Abbildung 24 dargestellt. Die nach Nukleotidposition 85 auftretenden Punktmutationen in den verschiedenen Klonen haben aufgrund des zuvor auftretenden Stopkodons keinen Einfluß auf die Proteinsynthese. Klon T1/3 besitzt eine Deletion von drei Basen an Nukleotidposition 51 bis 53, was den Verlust der Aminosäure Arginin (Aminosäureposition 18) zur Folge hat. Diese Deletion hat auf die nachfolgende Aminosäuresequenz keinen Einfluß. Dieser Klon besitzt zusätzlich noch an Position 152 die Deletion einer Base, so daß ab dieser Base ein verändertes Leseraster auftritt. Innerhalb des sequenzierten Bereichs tritt kein Stopkodon auf, welches zum Abbruch der Proteinsynthese führt, wie es bei den zuvor beschriebenen Klonen der Fall ist. Die Aminosäuresequenz des Klons T1/3 ist in Abbildung 24 (CV1/3) dargestellt.

Die Klone T2/6 und T2/9 besitzen an Nukleotidposition 54 eine Deletion einer Base, wodurch es zu einem Verschieben des Leserasters kommt. Wie bei dem zuvor beschriebenen Klon T1/3 treten auch hier innerhalb des sequenzierten Bereichs keine Stopkodons auf, welche zu einem Abbruch der Polyproteinsynthese führen würden. Die Proteinsequenz (CV2/6) ist in Abbildung 24 aufgeführt.

Die Häufigkeit der im Tumor gefundenen Sequenzen beträgt: CV1/1 = 40 % (8/20), CV2/1 = 15 % (3/20), CV2/2 = 30 % (6/20), CV1/3 = 5 % (1/20) und CV2/6 = 10 % (2/20).

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
P	MSTNPKPQRK	TKRMTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRP	GPRLGVRATR	KTSESRQPFQ	RRQP1PKARR	PEGRAWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWA
CV1/1	MSTNPKPQRK	TKRMTN <u>RP</u> TG	<u>CQVPGWRS</u> DR	<u>WWSLLVAA</u> Q	<u>P</u>					
CV2/1	MSTNPKPQRK	TKRNTSRPTG	<u>CQVPGWRS</u> DR	<u>WWSLLVAA</u> Q	<u>P</u>					
CV2/2	MSTNPKPQRK	TKRMTNRRPQ	DVKF <u>SGGG</u>							
CV1/3	MSTNPKPQRK	TKRNTNR-PQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR	<u>RLP</u> SGRNLEV	<u>DVSLSPRH</u> VG	<u>PRAGPGLSPG</u>	<u>TLGP</u> SMAMRA	<u>AGG</u>
CV2/6	MSTNPKPQRK	TKRMTNRRHR	<u>TSSSRVAVRS</u>	<u>LVEFTCCRAG</u>	<u>ALDWVCARRG</u>	<u>RLP</u> SGRNLEV	<u>DASLSPRH</u> VG	<u>PRAGPGLSPG</u>	<u>TLGP</u> SHAMRA	<u>AGG</u>

Abb. 24: Von den in Abbildung 23 dargestellten Nukleotidsequenzen abgeleitete Protein-Sequenzen des HCV-Core-Gens. P = Peritumorsequenz, CV = Core-Varianten aus dem Tumorgewebe. Aminosäureänderungen aufgrund von Punktmutationen und Deletionen sind unterstrichen. Der Bindestrich (-) steht für eine Aminosäuredeletion.

#### 4.4.5 Computeranalysen der resultierenden Core-Sequenzen

Die aus den isolierten HCV-Core-Sequenzen resultierenden Aminosäuresequenzen wurden in die EMBL-Datenbank eingegeben. Es wurde nach Sequenzhomologien mit anderen Proteinen gesucht. Interessant in diesem Zusammenhang waren vor allem die "Frameshift"-Mutanten CV1/3 und CV2/6. Zu den eingegebenen Core-Protein-Sequenzen konnten mittels der Computeranalyse keine homologen Sequenzen (ausgenommen weitere HCV-Sequenzen) gefunden werden.

Die Hydrophobizitätsanalyse der Core-Gesamtsequenz bzw. der Core-Isolate aus dem Tumorgewebe ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Gesamt-Core-Sequenz (AS 1 bis 192) zeigt eine hydrophile Region am 5'-Ende, gefolgt von einer hydrophoben Sequenz am 3'-Ende der Core-Region (AS 169 bis 187). Die hydrophile Region am 5'-Ende enthält über 20 % basische Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin), die mit Nukleinsäuren (z. B. Virus-Genom) interagieren können. Die Nukleotiddeletionen in den Isolaten T1/3 bzw. T2/6 führen zu einer Verschiebung des Leserasters in dem sequenzierten Core-Bereich (von Base 1 bis 94). Die daraus resultierenden veränderten Aminosäuresequenzen sind im Vergleich zum entsprechenden "Original" Core-Protein am 3'-Ende weniger hydrophob (Abb. 25 E und F). Die stark hydrophobe Region am Carboxy-Ende des Proteins, welche dem Membrantransport dient, entfällt bei allen Core-Proteinen aus dem Tumorgewebe. Der Isoelektrische Punkt des gesamten Core-Proteins beträgt 11,95; die trunkierten Core-Proteine bzw. die Frameshift-Mutanten sind schwach basischer ( $pI = 12,08$  bis  $12,69$ ) als die Original HCV-Core-Sequenz. Die Bestimmung der dargestellten Hydrophobizitätsprofile erfolgte mit dem Proteinanalyseprogramm SOAP des Software-Programms PC/Gene. Das Hydrophobizitätsprofil wurde nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) erstellt.

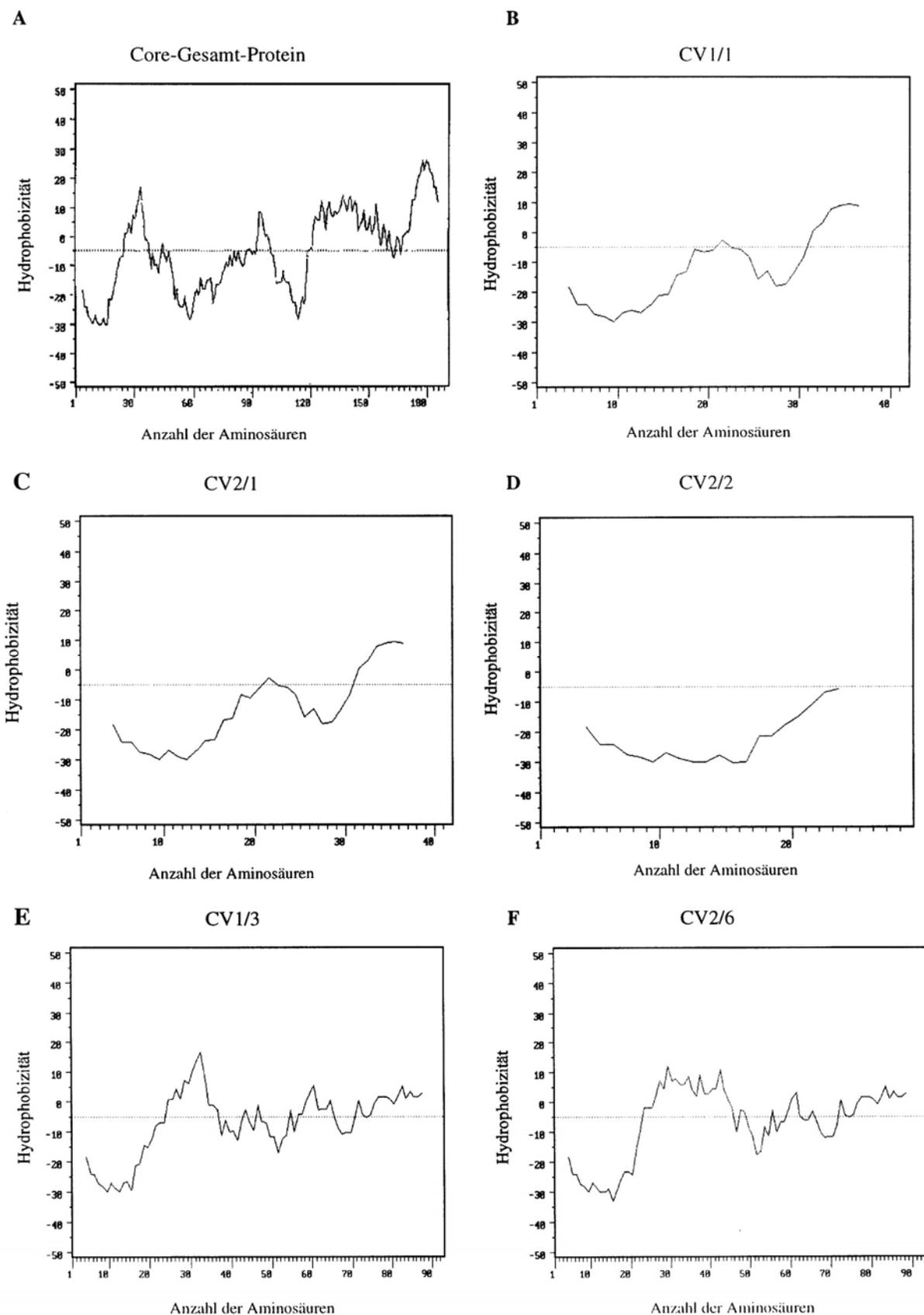


Abb. 25: Hydrophobizitätsprofil der abgeleiteten HCV-Core-Proteinsequenzen aus dem Tumorgewebe.



#### 4.4.6 Malignitätstests

Um das möglicherweise vorhandene transformierende Potential der gefundenen HCV-Core-Sequenzen aus Tumorgewebe zu untersuchen, wurden die erhaltenen Sequenzen in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und deren Einfluß in verschiedenen Malignitätstests untersucht.

##### 4.4.6.1 Generierung einer Gesamt-Core-Sequenz als Kontrolle für die Transformationsversuche

Für die Expression der verschiedenen in Abbildung 24 dargestellten Core-Sequenzen wurden die entsprechenden Amplifikate mittels EcoRI aus dem pCRII-Vektor ausgeschnitten, nach Auftrennung im Agarosegel aufgereinigt und in die EcoRI-Schnittstelle des pcDNA3-Vektors hinter den CMV-Promotor inkloniert. Die richtige Orientierung der Core-Sequenzen wurde durch Restriktionsverdau mit XhoI und ApaI überprüft. Die Sequenz der inklonierten Fragmente wurde durch Verwendung von T7- und Sp6-Primer (komplementäre Sequenzen auf dem Plasmid) ermittelt.

Die durch die PCR mit dem nested Primer-Set C1 ( $C1_{\text{external sense}}$ ,  $C1_{\text{external antisense}}$ ,  $C1_{\text{internal sense}}$  und  $C1_{\text{internal antisense}}$ ; PCR-Produkt von Position -66 bis 309 nach dem Nummerierungssystem von Choo et al. (1989)) generierte Peritumorsequenz umfaßt nur 309 der insgesamt etwa 520 Basen des *in vivo* vorliegenden prozessierten HCV-Core-Gens. Um die Sequenz des gesamten HCV-Core-Proteins als Kontrolle für die geplanten Expressionsversuche zu erhalten, wurde eine RT-PCR mit den Primern  $C1_{\text{external sense}}$  und  $C_{\text{ges. antisense}}$  (Tabelle, 1) durchgeführt. Das erwartete PCR-Produkt sollte die Nukleotidsequenz von Position -74 bis 520 umfassen. Da keine Amplifikation mit diesen Primern erreicht wurde, wurde anstelle des Primers  $C_{\text{ges. antisense}}$  ein schon früher in anderen Untersuchungen bewährter Primer ( $C2_{\text{antisense}}$ , Nukleotidposition 469 - 498) eingesetzt. Die mit diesem Primer amplifizierte cDNA umfaßte jedoch nicht das gesamte Core-Protein. Um das so erhaltene Amplifikat zu verlängern, wurden noch zwei weitere aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt. Die erste PCR wurde, mit den Primern  $C1_{\text{internal sense}}$  (Nukleotidposition -37 - -66) und  $C_{\text{überlap}}$  (Nukleotidposition 483 bis

512) durchgeführt. In einem zweiten Amplifikationsschritt mit den Primern C1<sub>internal sense</sub> und

C<sub>ges. antisense</sub> (Nukleotidposition 498 - 520) wurde die gesamte Core-Sequenz mit 173 Aminosäuren generiert (21 kDa). Zusätzlich wurden mit Hilfe der zweiten PCR zwei aufeinanderfolgende Stopkodons an die Core-Sequenz angehängt, um die Proteinsynthese im Expressionsvektor nach 173 Aminosäuren zu beenden. Das HCV-Core-Protein liegt in dieser Größe *in vivo* nach Prozessierung des HCV-Polyproteins in der Zelle vor. Das auf diese Weise erhaltene PCR-Produkt wurde direkt in den pCRII-Vektor kloniert und mittels der EcoRI-Schnittstellen in den pcDNA3-Vektor umklontiert. Die Sequenz des Core-Gens wurde mittels der T7- und Sp6-Primer in einer Sequenzreaktion überprüft.

Für die folgenden Transformationsversuche wurde als Kontrolle, neben der gesamten Core-Sequenz (173 AS) auch die durch die PCR künstlich verkürzte Peritumorsequenz (94 AS) eingesetzt.

Um das auf diese Weise generierte Gesamt-Core-Protein und das künstlich verkürzte Peritumor-Protein zu überprüfen, wurden beide Sequenzen *in vitro* transkribiert und translatiert. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Hilfe von Core-spezifischen Antikörpern (C7-50 (Moradpour et al., 1996) und SA12-Antiserum (Eurogentec)) detektiert. In Abbildung 26A und B ist das Ergebnis des Western-Blots dargestellt.

Bei Verwendung des C7-50-Antikörpers (Moradpour et al., 1996) ist jeweils nur die Bande des Gesamt-Core-Proteins bzw. der künstlich verkürzten Peritumorsequenz zu erkennen. Der monoklonale Antikörper C7-50 erkennt ein gut konserviertes lineares Epitop zwischen Aminosäureposition 21 und 40 des HCV-Core-Proteins (Moradpour et al., 1996). Bei Verwendung des SA 12 Antikörpers sind neben der Core-Sequenz bzw. der verkürzten Core Sequenz aus dem Peritumor noch viele unspezifische Nebenbanden zu erkennen. Der eingesetzte Antikörper erkennt ein lineares Epitop zwischen Aminosäureposition 3 und 18 des HCV-Core-Proteins. Das für die *in vitro* Translation eingesetzte Retikulozyten-Lysat entstammte ebenso wie der Antikörper SA12 einem Kaninchen. Damit lassen sich wahrscheinlich die vielen unspezifischen Nebenbanden erklären.

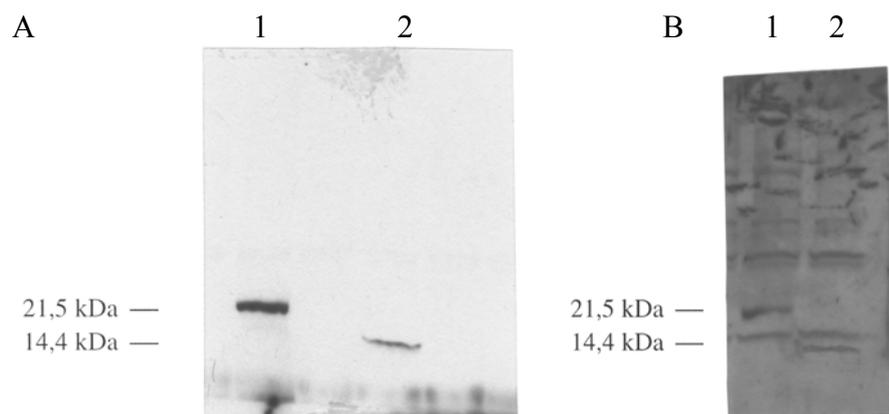


Abb. 26: Western-Blot der *in vitro* translatierten Gesamt-Core-Sequenz and der durch die PCR künstlich verkürzten Peritumorsequenz mittels eines Core-spezifischen Antikörpers nach Auftrennung der Proteine in einem 10 %igen Acrylamidgel. In Spur 1 ist das Gesamt-Core-Protein aufgetragen, in Spur 2 die verkürzte Peritumorsequenz. Die Größe der Proteine wurde mit Hilfe des Molekulargewichtsmarker bestimmt, welcher nach Ponceau S-Färbung zu erkennen war. A: Verwendung des Antikörpers C7-50 (Moradpour et al., 1996); B = Verwendung des Antikörpers SA12 (Eurogentec).

#### 4.4.6.2 Expression der veränderten Core-Sequenzen in eukaryontischen Zellsystemen

Die unter 4.4.6 hergestellten Plasmide wurden mit Lipofectin in NIH/3T3- und Fisher-rat1-Zellen eingebracht, und die transfizierten Zellen mit G418 (wie in Kapitel 3.3.7.6 beschrieben) selektiert. Nach zehn Tagen waren genügend selektierte Zellen vorhanden, um sie in weiterführenden Versuchen einsetzen zu können. Als Negativ-Kontrolle für die Transformationsversuche diente der pcDNA-Vektor alleine beziehungsweise der pcDNA-Vektor mit mutierter *Ha-ras*-Sequenz als Positiv-Kontrolle. Die mutierte *Ha-ras*-Sequenz stellte Prof. Dr. M. Wigler (Cold-Spring-Harbour-Laboratories, USA) im pAT153-Vektor zur Verfügung. Sie war ursprünglich aus einem Blasen-Karzinom (T24) isoliert worden (Taparowsky et al., 1982). Vorversuche in unserem Labor mit NIH/3T3- und Fisher-rat1-Zellen hatten gezeigt, daß die erhaltene *Ha-ras*-Sequenz transformierendes Potential besitzt. Mittels der im Vektor pAT153 vorhandenen BamHI-Schnittstellen wurde das Gen herausgeschnitten und in den pcDNA3-Vektor kloniert.

#### 4.4.6.3 Wachstum der transfizierten Zellen in 0,5 % FCS und Austesten der Fähigkeit zur Focus-Bildung

Wie unter 1.2.1 beschrieben verhalten sich transformierte Zellen in vieler Hinsicht anders als primäre bzw. immortalisierte Zellen. So ist das Wachstum von Zellen in Medium mit einer Serumkonzentration von 0,5 % FCS ebenso Hinweis auf einen transformierten Zustand der Zellen wie die Focus-Bildung (Wachstum der Zellen in mehreren Schichten übereinander).

Für die Untersuchung des Wachstums der transfizierten NIH/3T3- bzw. Fisher-rat1-Zellen in Medium mit 0,5 % FCS wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.3.7.8 beschrieben, für 10 Tage in G418-haltigem Medium (mit 10 % FCS) selektiert und anschließend in 6 cm-Petrischalen ausgesät. Nach weiteren 10 Tagen Kultivierung in 0,5 % FCS und permanenter G418-Selektion starben die mit Negativ-Kontrolle, Gesamt-Core, P2/2, und Pl/3 transfizierten Zellen ab. Bei der Positiv-Kontrolle und den Klonen mit den Fragmenten CV1/1, CV2/1 und CV2/6 entstanden Kolonien sich teilender Zellen. Kolonien wurden auch bei den Zellen mit künstlich verkürzter Peritumor- Sequenz (Abb. 24: oberste Sequenz) gebildet. Nach weiteren fünf Tagen bildeten die *Ha-ras*-transfizierten Zellen Foci aus. Die ersten Foci wurden in den mit CV1/1, CV2/1, CV2/6 und Peritumorsequenz transfizierten Zellen etwa 10 bis 15 Tage später gebildet. In Abbildung 27 ist das charakteristische Wachstum *Ha-ras*-transformierter NIH/3T3-Zellen in 0,5 % FCS fotografisch festgehalten. Die Zellen zeigen keine Kontaktinhibition, sondern wachsen in Lagen übereinander (Focus-Bildung). Das gleiche Erscheinungsbild zeigen auch die mit CV1/1 (Abb. 28), CV2/1 (Abb. 29), CV2/6 (Abb. 30) transfizierten NIH/3T3-Zellen, sowie jene mit der verkürzten Peritumorsequenz (Abb. 31). Ein sehr ähnliches Erscheinungsbild tritt auch bei den mit den gleichen Plasmiden transfizierten Fisher-rat1-Zellen auf. Jedoch zeigt hier die mit *Ha-ras* transfizierte Kontrolle eine noch viel stärkere, typischerweise sternförmige, aus spindelförmigen Zellen bestehende Focus-Bildung (Abb. 32). Das Erscheinungsbild der anderen - in 0,5 % FCS überlebensfähigen Fisher-rat1-Zellen - ähnelt dem der transformierten NIH/3T3-Zellen. Bei den Klonen CV1/1 (Abb. 33), CV2/1 (Abb. 34), CV2/6 (Abb. 35) lassen sich zum Teil abgerundete Zellen entdecken, ebenfalls typisch für das Wachstum transformierter Zellen. In Abbildung 36 ist zum Vergleich das Wachstum nicht-transformierter Fisher-rat1-Zellen dargestellt. Es ist eine deutliche Kontaktinhibition der Zellen zu erkennen. Die in 0,5 % FCS

gebildeten Foci wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert (Kapitel 3.3.7.9), und die einzelnen Foci für weitere Versuche herangezogen.

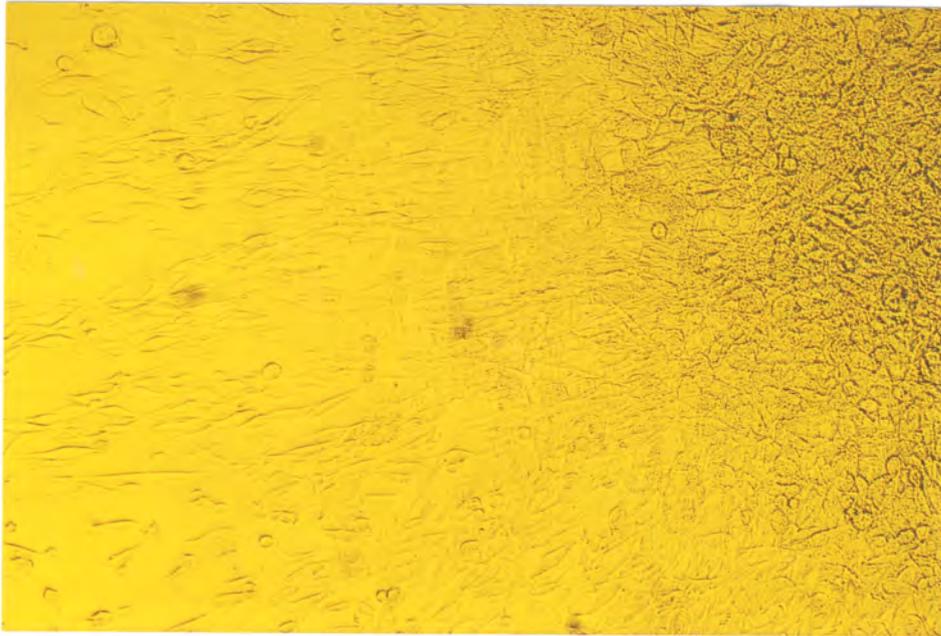


Abb. 27: Wachstum von *Ha-ras*-transformierten NIH/3T3-Zellen in 0,5 % FCS



Abb. 28: Wachstum von CV1/1-transfizierten NIH3T3-Zellen in 0,5 % FCS



Abb. 29: Wachstum von CV2/1-transformierten NIH/3T3-Zellen in 0,5 % FCS

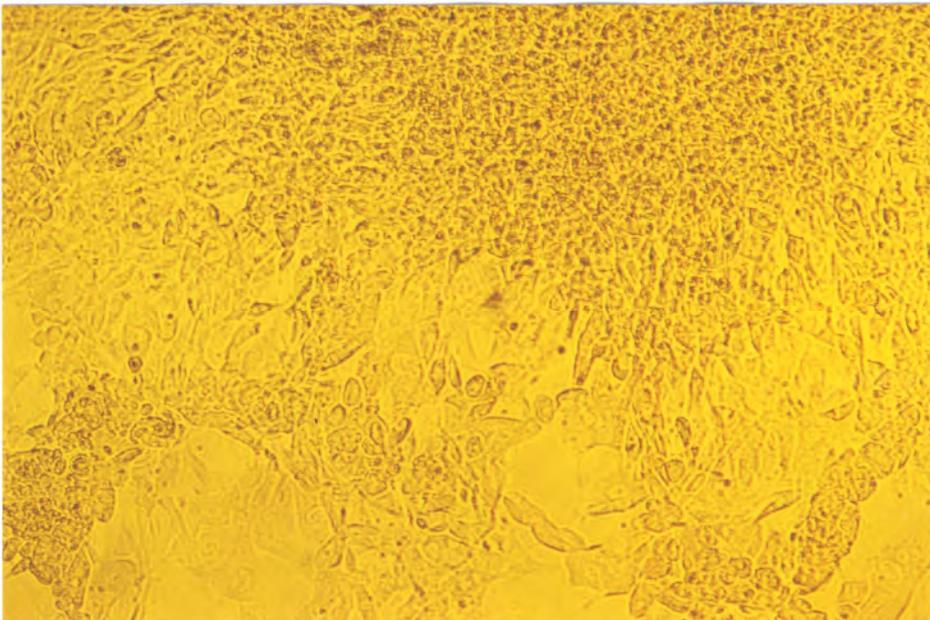


Abb. 30: Wachstum von CV2/6-transfzierten NIH3T3-Zellen in 0,5 % FCS

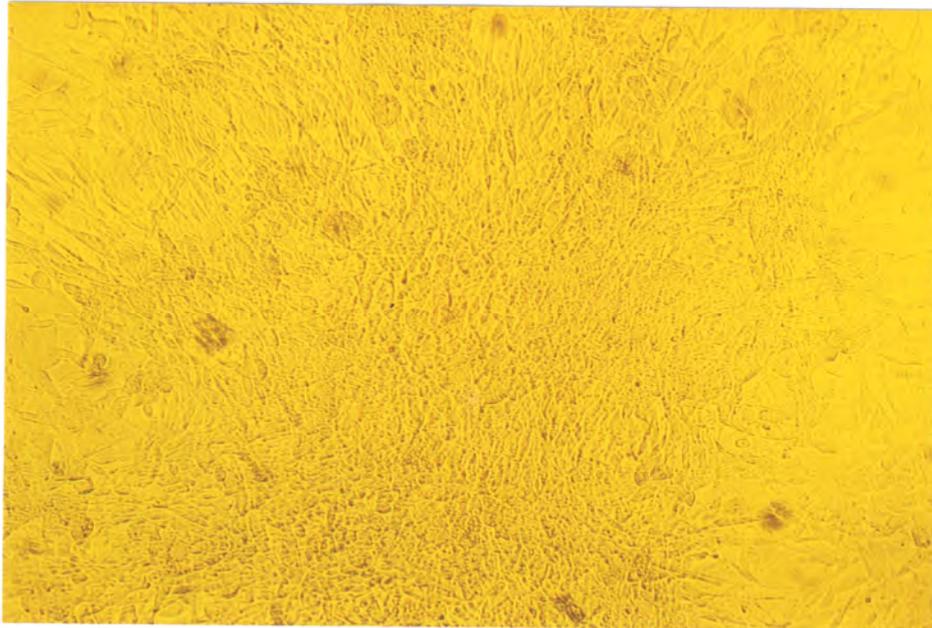


Abb. 31: Wachstum von NIH/3T3-Zellen in 0,5 % FCS, welche mit der verkürzten Peritumorsequenz (94 bp) transfiziert wurden

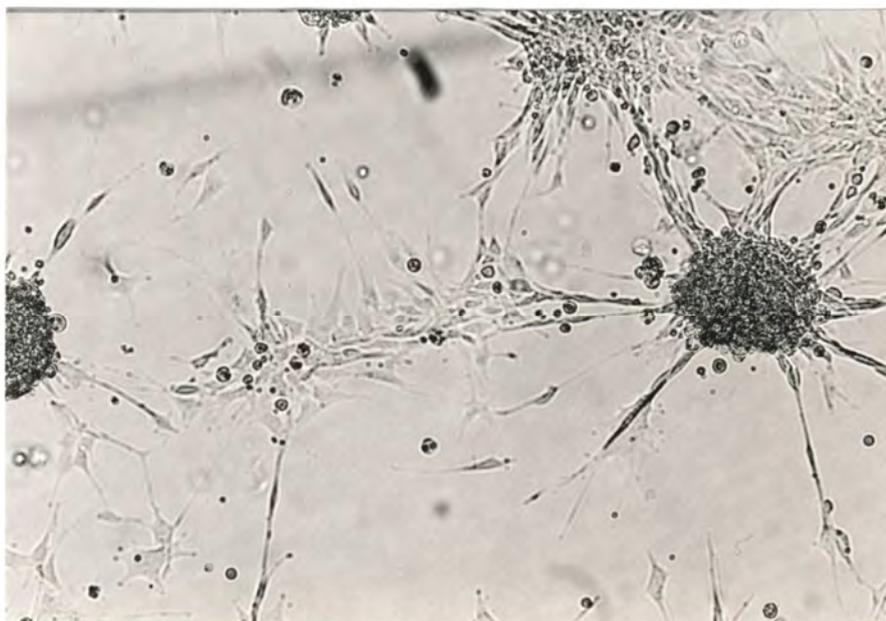


Abb. 32: Wachstum von *Ha-ras*-transfizierten Fisher-rat1-Zellen in 0,5 % FCS

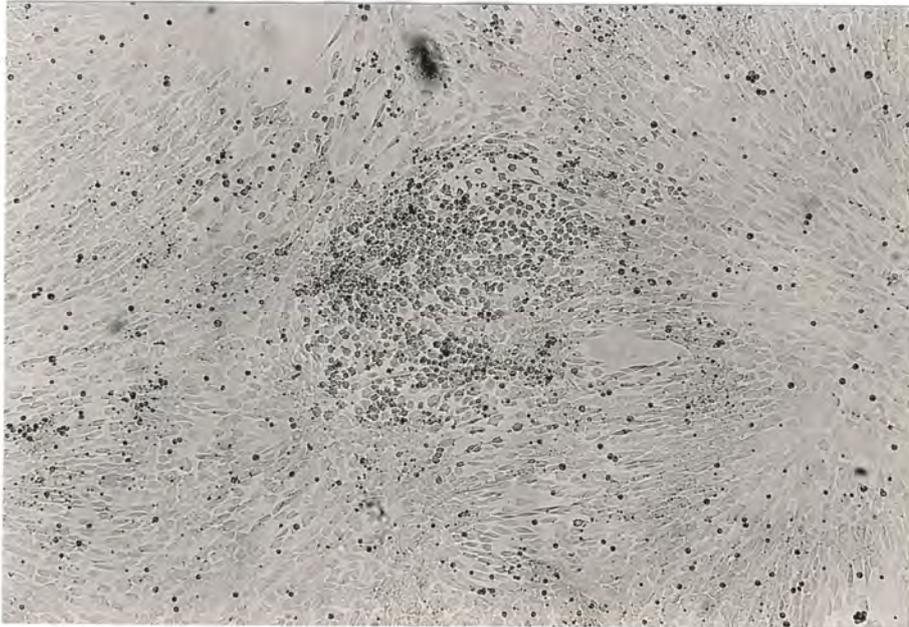


Abb. 33: Wachstum von CV1/1-transformierten Fisher-rat1-Zellen in 0,5 % FCS



Abb. 34: Wachstum von CV2/1-transfizierten Fisher-rat1-Zellen in 0,5 % FCS





Abb. 35: Wachstum von CV2/6-transformierten Fisher-rat1-Zellen in 0,5 % FCS

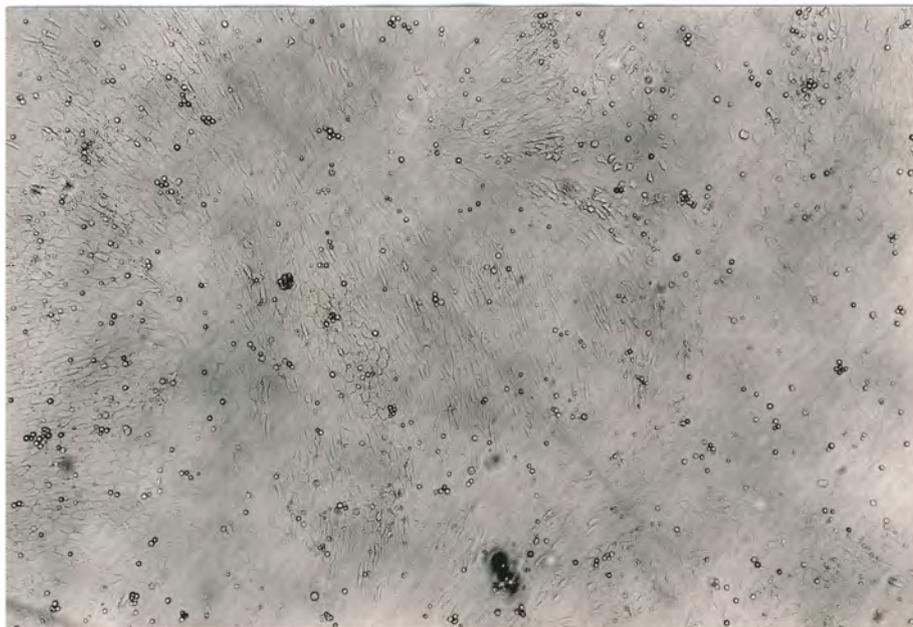


Abb. 36: Wachstum von nicht-transformierten Fisher-rat1-Zellen in Medium mit 10% FCS

#### 4.4.6.4 Weichagar-Koloniebildungstest

Für den Weichagar-Koloniebildungstest wurden die transformierten Zellen ebenfalls 10 Tage in G418-haltigem Medium (mit 10 % FCS) selektiert. Nach Trypsinieren der Zellen wurden diese ausgezählt, und etwa  $10^4$  Zellen in 3 ml 0,33 %igem Weichagar ausgesät. Nach drei Wochen bildeten sich bei den *Ha-ras*-transfizierten NIH/3T3 und Fisher-rat1-Zellen die ersten Kolonien. Etwa jede zweite Zelle war transformiert (Abb. 37 und 41). Nach etwa vier Wochen bildeten sich einige wenige Klone ( $< 10$ , von insgesamt  $3 \times 10^4$  ausgesäten Zellen) in den CV2/1 transfizierten NIH/3T3-Zellen (Abb. 38). Eine weitere Woche später bildeten sich auch einige Klone ( $< 10$ , von insgesamt  $3 \times 10^4$  ausgesäten Zellen) in den CV1/1 (Abb. 39) und CV2/6 (Abb. 40) transfizierten Zellen. Keine der Zellen mit den übrigen veränderten Core-Sequenzen bzw. die Negativ-Kontrolle bildeten Klone im Weichagar. Außer die mit der Positiv-Kontrolle transfizierten Fisher-rat1-Zellen bildeten alle weiteren transfizierten Fisher-rat1-Zellen keine Kolonien im Weichagar.

Ein Teil der in 0,5 % FCS isolierten Foci wurde ebenfalls auf die gleiche Weise in Weichagar ausgesät. Die in 0,5 % FCS vorselektierten NIH/3T3-Zellen bildeten schon nach 10 Tagen im Weichagar Kolonien. Etwa jede dritte Zelle war transformiert (Abb. 42 und 43). Die in 0,5 % FCS vorselektierten - zur Focus-Bildung befähigten - Fisher-rat1-Zellen bildeten mit Ausnahme der Positiv-Kontrolle keine Kolonien in Weichagar.

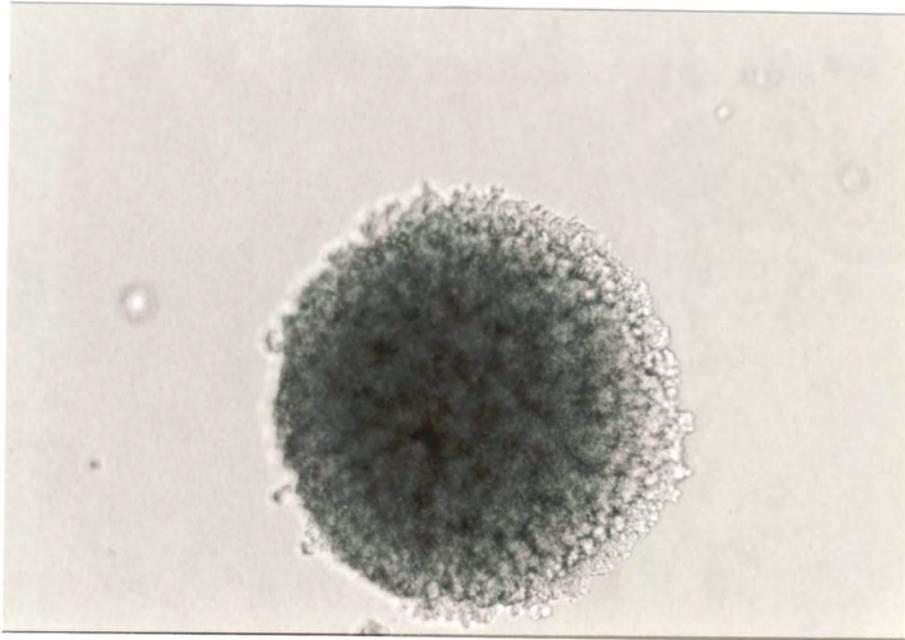


Abb. 37: Koloniebildung von *Ha-ras*-transformierten NIH3T3-Zellen

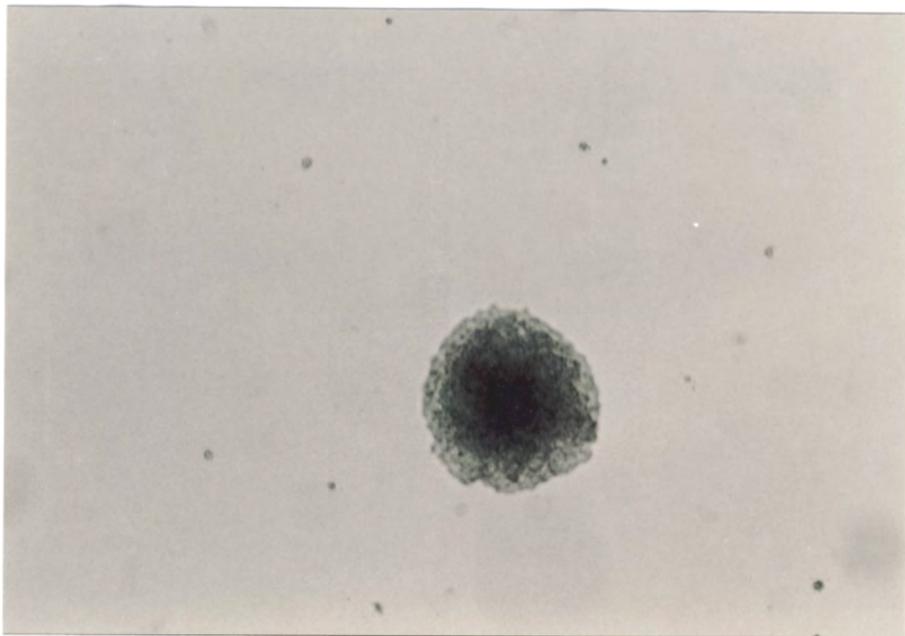


Abb. 38: Koloniebildung von CV1/1 transfizierten NIH3T3-Zellen

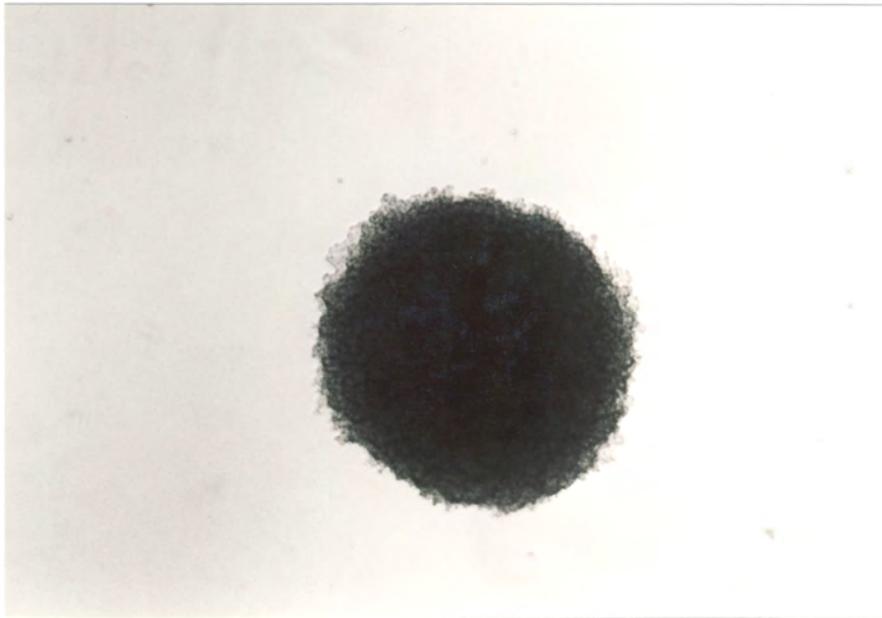


Abb. 39: Koloniebildung von CV2/1-transfizierten NIH3T3-Zellen

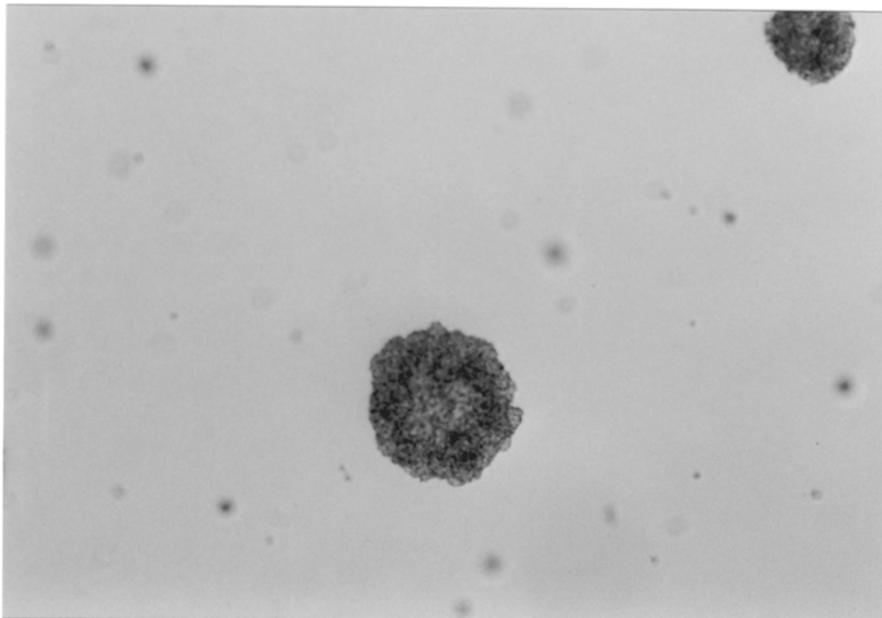


Abb. 40: Koloniebildung von CV2/6-transfizierten NIH3T3-Zellen

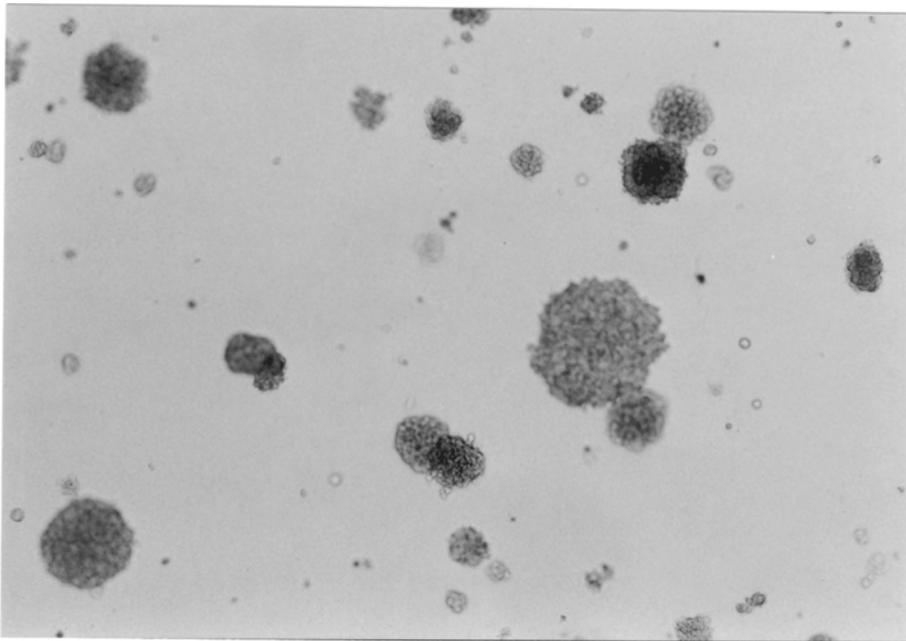


Abb. 41: Koloniebildung von *Ha-ras*-transformierten Fisher-rat1-Zellen

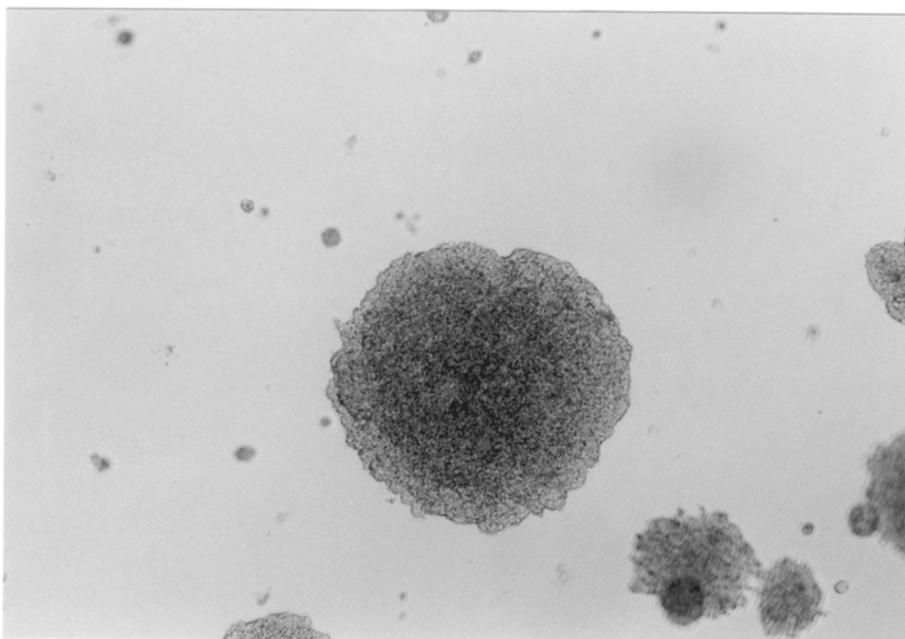


Abb. 42: Koloniebildung von CV2/1-transformierten in 0,5 % FCS vorselektierten NIH3T3-Zellen

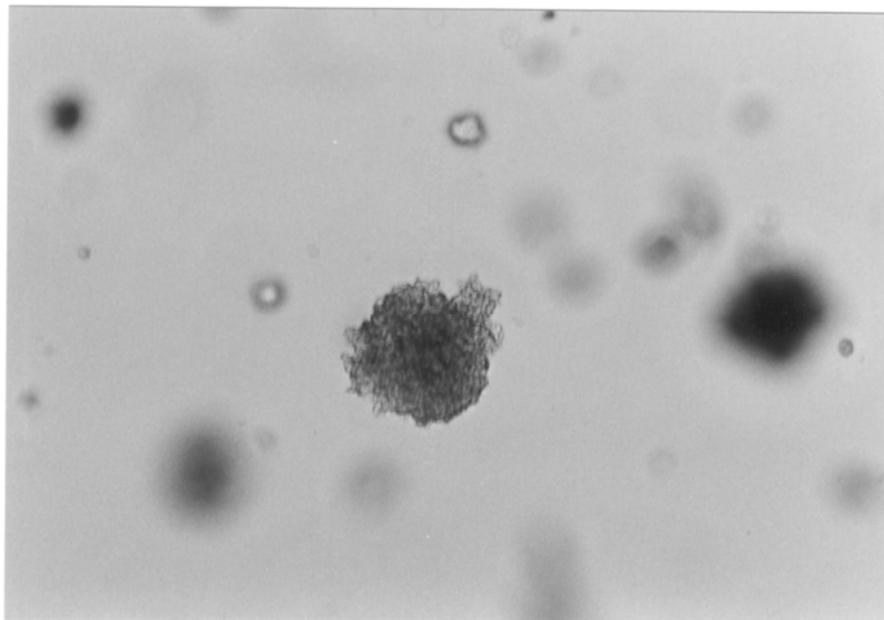


Abb. 43: Koloniebildung von CV2/6-transformierten in 0,5 % FCS vorselektierten NIH3T3-Zellen

#### **4.4.6.5 Nachweis der transfizierten HCV-Core-Sequenzen in den transformierten Zellen**

Um zu zeigen, daß in den transformierten Zellen die erwarteten Core-Sequenzen vorhanden sind, wurde mit dem Primerpaar  $C1_{\text{internal}}$  (siehe Tabelle 1) eine DNA-PCR durchgeführt. Hierzu wurde die zelluläre DNA, wie unter 3.3.7.10 beschrieben, isoliert, die Konzentration bestimmt und 1 µg DNA in die PCR eingesetzt. Mittels der auf diese Weise durchgeführten PCR konnten in den untersuchten Zellen die HCV-Core-Sequenzen nachgewiesen werden.

#### **4.4.6.6 Nachweis eines 10 kDa Proteins in transformierten Zellen**

In Kooperation mit Dr. Borowski (Arbeitsgruppe Laufs, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg) wurden die

mit CV1/1 und CV2/6 transformierten NIH/3T3-Zellen nach exprimierten veränderten Core-Proteinen untersucht. Hierzu wurden die Weichagarklone in DMEM-Medium mit G418 überführt, und die Zellen herangezogen. Anschließend wurden die Zellen lysiert, und die Proteine mit TCA gefällt. Als Negativ-Kontrolle dienten die mit dem pcDNA3 transfizierten, nicht transformierten NIH/3T3-Zellen. Nach Aufnahme der Proteine in SDS-haltigen Probenpuffer wurden diese auf ein 10 %iges Acrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Als Erst-Antikörper diente der von der Firma Eurogentec hergestellte polyklonale Antikörper SA12. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

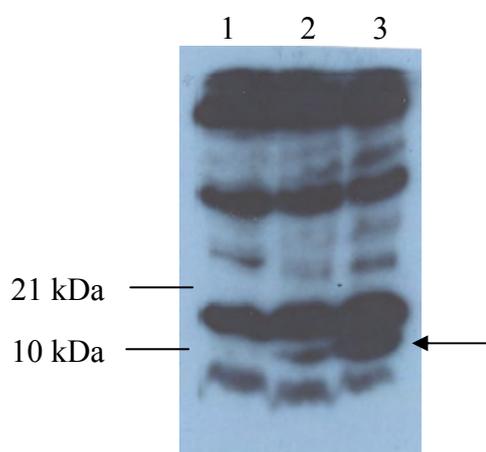


Abb. 44: Elektrophoretische Auftrennung der Zellproteine in einem 10 %igen Acrylamidgel und anschließendem Western-Blot. Als Antikörper wurde der polyklonale Antikörper SA12 eingesetzt.  
Spur 1: Zelllysate der Negativ-Kontrolle (nicht-transformierte NIH/3T3-Zellen)  
Spur 2: Zelllysate der mit CV2/6 transformierten Zellen  
Spur 3: Zelllysate der mit CV1/1 transformierten Zellen

Wie zuvor in Abbildung 21B erscheint nicht nur eine einzelne Bande, sondern viele weitere unspezifische Nebenbanden, In den Zelllysaten der CV2/6 transformierten Zellen wurde ein Protein mit etwa 10 kDa erwartet, da die durch die PCR amplifizierte, veränderte HCV-Core-Sequenz etwa 94 Aminosäuren umfaßte. In Spur 2 ist das erwartete Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 10 kDa zu erkennen. Dieses Protein ist nicht im Zelllysate der Negativ-Kontrolle vorhanden. Auch bei den mit CV1/1 transformierten Zellen ist ein Protein

mit etwa 10 kDa zu erkennen. Eigentlich wurde hier ein Protein von etwa 4,5 kDa erwartet, da nach 41 Aminosäuren ein Stopkodon in der kodierenden Sequenz auftritt. Die 10 kDa-Bande könnte durch das Überlesen des Stopkodon zustande kommen.

#### 4.4.6.7 Nacktmausversuche

Die transfizierten Zellen wurden für die Nacktmausversuche ebenfalls 10 Tage in G418-haltigem Medium selektiert. Zwei Passagen vor dem Einspritzen der Zellen in die Versuchstiere, wurde G418 aus dem Medium entfernt, da es möglicherweise einen toxischen Effekt auf die Nacktmäuse hätte haben können. Pro Injektionsstelle (meist beidseitig) wurden  $10^6$  Zellen (in 0,5 ml PBS) injiziert. Die Tiere wurden im Ohr markiert und für die folgenden 6 bis 10 Wochen beobachtet. Die Positiv-Kontrollen (mit *Ha-ras* transfizierte NIH/3T3- bzw. Fisher-rat1-Zellen) bildeten innerhalb von 2 bis 4 Wochen Tumoren (Abb. 45). Die übrigen transfizierten Zellen wiesen keine Tumorbildung auf. Zwei Versuchstiere, mit CV2/1 und CV2/6 transfizierten Fisher-rat1-Zellen behandelt, bildeten nach 6 Wochen etwa 2 mm bis 3 mm große "Knoten" aus, die jedoch histologisch nicht als Tumoren identifiziert werden konnten. Die Histologie wurde von Dr. Herrmann, Senckenbergisches Zentrum der Pathologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt / Main, durchgeführt.

Neben diesem Versuchsansatz wurden auch die in Weichagar vorselektierten Klone in die Mäuse injiziert. Nach 8 Tagen bildeten sich an beiden Seiten der Tiere bis zu 0,5 cm Durchmesser große Gewebsvergrößerungen aus. Nach 14 Tagen waren diese Vergrößerungen jedoch zurückgebildet. Nur bei den *Ha-ras*-transformierten Kontrollen bildeten sich deutliche Tumoren.





Abb. 45: Nacktmaus mit Tumorbildung (*Ha-ras*-transformierte NIH/3T3-Zellen)

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Aufbau einer HCV-RT-PCR

#### 5.1.1 Qualitative RT-PCR

Für die Diagnostik der Hepatitis C-Infektion wird in der Routine der indirekte Virusnachweis mittels ELISA durchgeführt. Bei vielen Infizierten wird dieser Test erst acht bis sechzehn Wochen nach Infektion positiv, so daß ein diagnostisches Fenster von mehreren Wochen bis Monaten vorhanden ist. Dagegen läßt sich mit der Polymerase-Kettenreaktion schon eine Woche nach Infektion HCV im Serum von Infizierten nachweisen. Die PCR zeichnet sich zudem gegenüber den Immunoassays durch eine höhere Spezifität und Sensitivität aus. Zudem stellt die PCR eine geeignete Methode dar, um die Replikation von HCV *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. In der Literatur sind verschiedene PCR-Verfahren und der Einsatz verschiedener Primer, welche an unterschiedliche Regionen des HCV-Genoms binden, für die Detektion des Hepatitis C Virus beschrieben (Bukh et al., 1992, Garson et al., 1992 und Honda et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene PCR-Verfahren und Primer (welche innerhalb der 5'-NC-Region binden) für die Detektion von HCV ausgetestet, um eine möglichst sensitive und spezifische Nachweismethode zu etablieren und gleichzeitig das Risiko für falsch positive Ergebnisse (Kontaminationen) zu minimieren. Die Austestung verschiedener PCR-Verfahren zeigte große Unterschiede (2 - 3 Zehnerpotenzen) in der Sensitivität. Diese Sensitivitätsunterschiede können verschiedene Ursachen haben. Zum einen besitzt die nested-PCR den Vorteil, daß schon in einer ersten Reaktion voramplifizierte cDNA-Fragmente in neuen Reaktionspuffer mit frischem Enzym überführt werden. Dadurch werden möglicherweise vorhandene Inhibitoren herausverdünnt, und die Amplifikation kann effizienter ablaufen. Zudem wird bei Anwendung der nested-PCR bzw. der Booster-PCR die *Taq*-Polymerase in der zweiten Reaktionsrunde neu in den Reaktionsansatz zugegeben, so daß die Amplifikation wieder effizienter ablaufen kann. Der Nachteil dieser beiden PCR-Verfahren ist die erhöhte Gefahr von Produktkontaminationen (Kwok et al., 1993). Daher ist in der Diagnostik die Durchführung eines One-Tube- oder Single-Step-Verfahrens angestrebt

(Beschreibung der verschiedenen PCR-Verfahren siehe 3.1.2.2). Die Single-Step-PCR hat gegenüber der One-Tube-PCR den Nachteil der geringeren Sensitivität, Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Verwendung des gleichen Reaktionspuffers für die reverse Transkription und die Amplifikation. Die Zusammensetzung des Puffers stellt einen Kompromiß dar, so daß beide benötigte Enzyme (reverse Transkriptase und *Taq*-Polymerase) arbeiten können. Die für diese Enzyme optimalen Reaktionsbedingungen können jedoch nicht gewährleistet werden. Der Vorteil dieser Methode ist die Verringerung des Kontaminationsrisikos, da ein Öffnen des Reaktionsgefäßes nicht mehr notwendig ist. Aufgrund der verschiedenen Vor- und Nachteile der ausgetesteten PCR-Verfahren wurde für die Detektion von HCV nach Möglichkeit auf die One-Tube-PCR zurückgegriffen.

Die Austestung verschiedener Primer, welche komplementär zu Sequenzen der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus sind, zeigte große Sensitivitätsunterschiede (Abb. 8 a - i). Die unterschiedliche Sensitivität der PCR bei Einsatz der ausgetesteten Primerkombinationen ist sehr wahrscheinlich auf die vorhandene, starke Sekundärstruktur der 5'-NC-Region zurückzuführen (Brown et al., 1992 und Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Primer, die in Bereichen ohne intramolekulare Zusammenlagerungen binden, können voraussichtlich besser an die komplementären Sequenzen anlagern, als Primer, die mit komplementären Sequenzen innerhalb der 5'-NC-Region konkurrieren und daher eine geringere Bindungseffizienz besitzen.

### 5.1.2 Quantitative RT-PCR

Für die Diagnostik und die Verlaufsbeobachtung einer antiviralen Therapie ist die Detektion des Hepatitis C Virus mit Hilfe der RT-PCR von großer Bedeutung. Der Einsatz der RT-PCR bei Untersuchungen zur Pathogenese des Hepatitis C Virus ist weit verbreitet. Verschiedene Studien sprechen für einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und dem klinischen Verlauf der Erkrankung (Kato et al., 1993 und Lau et al., 1993). Auch soll eine hohe HCV-RNA-Konzentration (über  $10^7$  HCV-RNA-Moleküle / ml Serum) ein negativer Prädiktor für das Ansprechen auf eine  $\alpha$ -Interferon-Therapie darstellen (Lau et al., 1993). Der Aufbau einer quantitativen kompetitiven RT-PCR ermöglicht Untersuchungen zur Viruspathogenese *in vitro* und *in vivo*. So kann die Feststellung und Beobachtung der

Viruskonzentration im Blut von Patienten möglicherweise Aussagen über die Prognose des Krankheitsverlaufs oder ein frühzeitiges Erkennen des Ansprechens auf eine  $\alpha$ -Interferon-Therapie erlauben und somit die Effizienz einer Medikation erhöhen. Ebenso kann die Beobachtung der Replikation des Virus in verschiedenen Zellkultursystemen Aufschluß über pathogene Mechanismen liefern.

Mehrere Strategien sind für den Aufbau eines internen Standards zur Durchführung einer quantitativen kompetitiven RT-PCR möglich. Im Allgemeinen werden zur Unterscheidung von HCV-RNA und Standard-RNA Restriktionsschnittstellen in den Standard eingebaut. Nach der PCR wird ein Restriktionsverdau durchgeführt, so daß die Amplifikate der HCV-RNA und die des Standards aufgrund ihrer resultierenden unterschiedlichen Längen im Agarosegel unterschieden werden können (Hagiwara et al., 1993 und Kato et al., 1993). Bei dieser Methode der Quantifizierung kann es zwischen den HCV- und den Standard-Amplifikaten während der Amplifikation zur Bildung von Heteroduplexmolekülen kommen. Diese Moleküle führen zu einer Überschätzung der eigentlich vorhandenen HCV-RNA-Moleküle, da sie, ebenso wie HCV-Amplifikate, nicht mit Hilfe der Restriktionsenzyme geschnitten werden können. Eine weitere Möglichkeit die Amplifikate des internen Standards von den HCV-Amplifikaten zu unterscheiden, ist die Verwendung von Standards, die eine andere Länge als die resultierenden HCV-Amplifikate besitzen. Nach Auftrennen der PCR-Produkte im Agarosegel kann man so aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens die beiden Produkte voneinander unterscheiden (Wang et al., 1989). Jedoch wird in der PCR die Amplifikation von kürzeren Fragmenten bevorzugt, so daß es auch hier zu einer Fehleinschätzung der Viruskonzentration kommen kann. Sowohl bei Verwendung von Restriktionsschnittstellen als auch bei unterschiedlich großen Amplifikaten zur Unterscheidung von Standard- und HCV-Amplifikat muß zusätzlich noch berücksichtigt werden, daß kurze DNA-Fragmente weniger Ethidiumbromid interkalieren. und so gleiche Mengen an DNA-Molekülen mit unterschiedlichen Größen verschiedene Bandenstärken ergeben.

Das Amplifikationsprodukt des internen RNA-Standards der in dieser Arbeit dargestellten Quantifizierungsmethode besitzt die gleiche Länge und den gleichen GC-Gehalt wie das Amplifikationsprodukt der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus. Die Unterscheidung zwischen HCV-Wildtyp- und Standard-Amplifikaten erfolgt über eine 25 Basen umfassende

Region innerhalb des Amplifikates, welche durch "site-directed mutagenesis" in der Standard-Sequenz verändert wurde. Von diesen 25 Basen abgesehen, ist die Sequenz zwischen HCV-Wildtyp-RNA und Standard-Amplifikat (abgesehen von Subtypen-bedingten Punktmutationen) identisch. Für die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der HCV-Wildtyp- und der Standard-RNA können daher die gleichen Primer eingesetzt werden, ohne daß es zu einer selektiven Bevorzugung in der Amplifikation einer Zielsequenz kommt.

Mit Hilfe der "site-directed mutagenesis" konnte ein 25 Basen umfassender Bereich der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus ausgetauscht werden. Diese Sequenz diente der Unterscheidung zwischen HCV-Wildtyp-RNA und der Standard-RNA. Die Methode der "site-directed mutagenesis" wurde bisher nur zum Einbau gezielter Punktmutationen in DNA eingesetzt (Higuchi et al., 1989; Ho et al. 1989 und Vallette et al., 1989). Wie in Kapitel 4.2 dargestellt, ist jedoch auch der Austausch größerer Sequenzbereiche (hier 25 Basen) möglich. Die Umschreibung des cDNA-Standards in RNA erfolgte mit Hilfe eines an einen PCR-Primer angehängten TV-Promotors, so daß eine Klonierung des cDNA-Standards nicht notwendig war.

Das Hepatitis C Virus wird in verschiedene Genotypen und Subtypen eingeteilt (Bukh et al., 1994 und Simmonds et al., 1993). In Deutschland ist der HCV-Subtyp 1b am häufigsten vertreten. Etwa 50 % der HCV-positiven Patienten sind mit diesem Subtyp infiziert. Der interne Standard der hier etablierten quantitativen RT-PCR wurde, wie beschrieben, aus einem HCV-1b-Isolat hergestellt. Bei 50 % der infizierten Patienten erfolgt somit die Quantifizierung der HCV-RNA im Serum mit Hilfe eines internen Standards, welcher in den meisten Fällen fast 100 %ige Übereinstimmung im GC-Gehalt bzw. der Nukleotidsequenz besitzt (abgesehen von dem 25 Basen umfassenden Austausch). Primer und biotinylierte Oligonukleotide für die Hybridisierung wurden aus Bereichen der 5'-NC-Region mit vollständiger Homologie zwischen den verschiedenen Genotypen konstruiert. Somit ist gewährleistet, daß mit Hilfe der eingesetzten Primer die in Deutschland bisher beschriebenen Subtypen delektiert werden können. Da die Unterscheidung nach Slot-Blot und Hybridisierung erfolgt, kommt es nicht zu einer Unter- bzw. Überschätzung der Amplifikatmengen durch unterschiedliche Ethidiumbromidinterkalierung, wie es bei den

zuvor beschriebenen Methoden (Hagiwara et al., 1993; Kato et al., 1993 und Wang et al., 1989) möglich sein kann.

Die Ausgangsmenge an RNA bzw. DNA hat entscheidenden Einfluß auf die Amplifikationseffizienz (Wang et al., 1989). Hohe DNA-Ausgangskonzentrationen in der PCR haben Phänomene wie Substratsättigung der Polymerase, inkomplette Trennung der DNA-Stränge oder eine Reassoziaton der komplementären Stränge ohne Primeranlagerung zur Folge. Es ist daher erforderlich, die geeignete Menge Standard- bzw. Wildtyp-HCV-RNA für eine exponentiell verlaufende Amplifikation zu ermitteln. Bei den hier vorliegenden PCR-Bedingungen verläuft die Amplifikation bei RNA-Konzentrationen von 10 bis 10000 Molekülen pro PCR-Ansatz bei der Durchführung von 40 Zyklen exponentiell. Die Reduktion der Zyklenzahl auf 35 Zyklen hat einen Verlust der Sensitivität der RT-PCR zur Folge. Die Detektionsgrenze liegt hier bei etwa 1000 RNA-Molekülen pro Reaktionsansatz. Die Durchführung von mehr als 40 Zyklen (45 bzw. 50 Zyklen) hat zur Folge, daß sich die Amplifikationsreaktion bei einer Ausgangsmenge von mehr als 100 Molekülen nicht mehr in der exponentiellen Phase befindet. Dies kann zur Folge haben, daß Sättigungsfaktoren die Quantifizierung der HCV-RNA beeinflussen können. Bei der Durchführung der quantitativen RT-PCR werden 1000 Moleküle der Standard-RNA eingesetzt, um die Amplifikationseffizienz zu optimieren. Durch die Verdünnung des Patientenserums vor der Extraktion der HCV-RNA wird gewährleistet, daß die Ausgangskonzentration der HCV-RNA in der PCR-Reaktion nicht zu hoch ist und dadurch einen negativen Einfluß auf die gesamte Quantifizierungsreaktion hat. So konnte gezeigt werden, daß bei einem käuflich erhältlichen Quantifizierungs-Kit (Amplicor HCV Monitor Test-Kit, Hoffmann La Roche) bei Einsatz von mehr als  $10^6$  HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum die quantitative RT-PCR in eine Sättigungsphase eintritt. Seren, die eine höhere Viruskonzentration besitzen werden nicht mehr korrekt quantifiziert. Dies kann bei diesem Kit durch Vorverdünnungen des Patientenserums teilweise umgangen werden (Roth et al., 1996).

Mehrere Variablen können die Effizienz einer PCR beeinflussen. So sind neben der Zusammensetzung des PCR-Puffers ( $MgCl_2$ -, Nukleotid- und *Taq*-Konzentration) auch die eingesetzten Primer für die Effizienz einer Amplifikationsreaktion von großer Bedeutung. Das hier für die Quantifizierung eingesetzte Primerpaar ( $B_{sense}$  und  $B_{antisense}$ ) kann unter den in Kapitel 3.1.2 angegebenen Bedingungen 10 RNA Moleküle detektieren (Abb. 14). Um diese

Sensitivität zu erzielen, muß keine "nested"-PCR durchgeführt werden, die ein erhöhtes Risiko für Kontaminationen beinhaltet. Da für die Amplifikation von HCV- bzw. Standardsequenzen die gleichen Primer eingesetzt werden, ist die Sensitivität der Amplifikation von HCV- bzw. Standard-RNA identisch. Auch die zur Detektion von HCV-Wildtyp- und Standard-Amplifikaten eingesetzten biotinylierten Sonden zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Sensitivität (Abb. 14). Da die Effizienz der RT-Reaktion nicht 100 % sondern nur etwa 10 % beträgt ergibt sich für die quantitative RT-PCR eine Sensitivität von etwa 500 bis 1000 Molekülen pro ml Serum. Im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze der bDNA (branched DNA)-Quantifizierung (Chiron) mit  $10^{5,5}$  HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum bedeutend niedriger (Davis et al., 1994 und Lau et al., 1993). Die Sensitivität des Quantifizierungs-Kits "Amplicor HCV Monitor" der Firma La Roche liegt bei etwa 500 bis 1000 Molekülen pro ml Serum. Die Anwendung der in dieser Arbeit etablierten quantitativen RT-PCR bei 32 Patienten mit chronischer Hepatitis C-Infektion zeigt (Abbildung 16), daß mindestens 2 dieser Patienten eine HCV-RNA-Konzentration besitzen, die nicht mehr mit dem bDNA-System detektiert werden kann.

Gerade im Verlauf einer Interferon-Therapie ist die Sensitivität der PCR entscheidend, da bei Ansprechen auf die Behandlung die Viruskonzentration unter die Nachweisgrenze der PCR abfallen kann. Je sensitiver eine PCR ist, desto genauere Aussagen können über einen langanhaltenden Therapieerfolg gemacht werden. Unter  $\alpha$ -Interferon-Therapie verlaufen die Virustiter und die Transaminasen nicht in allen Fällen parallel. Trotz Normalisierung der Transaminasen kann in vielen Patienten noch HCV nachgewiesen werden. Bei diesen Patienten ist nach Therapieende mit einem Wiederanstieg der Transaminasen zu rechnen. Auch bei Patienten, bei denen keine Virus-RNA mit Hilfe der RT-PCR unter Therapie detektiert werden kann, muß mit einem Wiederanstieg der Transaminasen gerechnet werden, da die Viruskonzentration im Verlauf der  $\alpha$ -Interferon-Behandlung nur unter die Nachweisgrenze der PCR gesunken sein kann. In Abbildung 17 ist der Verlauf der Transaminasen und die Konzentration der Virus-RNA unter  $\alpha$ -Interferon-Therapie dargestellt. Bei Patient A kommt es nach 20 Tagen der Behandlung zu einer Normalisierung der Transaminasen. Auch die HCV-RNA ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Patient B zeigt ein partielles Ansprechen auf die Interferon-Therapie. Nach ebenfalls 20 Tagen haben sich die Werte für die Transaminasen normalisiert; jedoch kann während der gesamten Beobachtungszeit (180 Tage) Virus-RNA im Serum des Patienten nachgewiesen werden. Bei

diesem Patienten ist nach Absetzen der Therapie mit einem Wiederanstieg der Transaminasen zu rechnen. Die Viruskonzentration beträgt bei diesem Patienten im Verlauf der Therapie etwa 1000 Moleküle pro ml. Mit dem bDNA-Quantifizierungssystem wäre es nicht möglich, die noch vorhandene Virus-RNA nachzuweisen.

Wie Abbildung 16 zeigt, lag die HCV-Serumkonzentration bei den 32 untersuchten Patienten zwischen  $10^{5,0}$  und  $10^{9,0}$  HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum. In diesem Bereich lagen auch die von Hagiwara et al. (1993) untersuchten Viruskonzentrationen. Die Menge an HCV-RNA-Molekülen variierte hier von  $10^{5,0}$  bis  $10^{9,5}$  Kopien pro ml Serum. In den von Gretch et al. (1994) untersuchten Patienten mit HCV-Infektion variierte die Viruskonzentration von  $10^{3,0}$  bis  $10^{10}$  Molekülen pro ml Serum. In anderen Publikationen lagen die Viruskonzentrationen im Durchschnitt niedriger. Kato et al. (1993) wies mit seiner kompetitiven quantitativen RT-PCR Viruskonzentrationen von  $10^{2,3}$  bis  $10^{8,3}$  HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum nach.

Die Untersuchung der Viruskonzentration in Verbindung mit dem Schweregrad der Erkrankung in der hier vorliegenden Arbeit zeigte keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Die durchschnittliche HCV-RNA-Konzentration bei 14 Patienten mit histologisch gesicherter chronisch persistierender Hepatitis C betrug  $10^{8,8}$  Kopien / ml ( $10^{5,7}$  bis  $10^{9,0}$  Kopien / ml), bei 15 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis  $10^{7,2}$  Kopien / ml ( $10^{5,0}$  bis  $10^{7,4}$  Kopien / ml) und bei 3 Patienten mit einer Leberzirrhose  $10^{6,5}$  Kopien / ml ( $10^{5,7}$  bis  $10^{6,7}$  Kopien / ml). Diese Daten zeigen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der HCV-RNA-Konzentration und dem Stadium der Lebererkrankung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Magrin et al. (1992) gezeigt. Andere Studien von Hagiwara et al. (1993), Lau et al. (1993) und Gretch et al. (1994) weisen jedoch auf einen Zusammenhang zwischen Virustiter und dem Schweregrad der Erkrankung hin.

Es konnte gezeigt werden, daß eine gute Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit etablierten kompetitiven quantitativen RT-PCR vorliegt. Die Standardabweichung des Mittelwertes beträgt 0,43. Dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 6,23 %. Mit dem zwischenzeitlich erhältlichen quantitativen HCV-PCR-Kit (Amplicor HCV Monitor Test-Kit Hoffmann La Roche) wurden vergleichbare Werte erzielt. Die Standardabweichung des



Mittelwertes beträgt bei diesem Kit 0,44, dies entspricht einem Variationskoeffizienten von 7,46 % (Roth et al., 1996).

## **5.2 Untersuchungen zur *in vitro* Replikation und zur Tumorigenität des Hepatitis C Virus**

### **5.2.1 *In vitro* Replikation von HCV**

Die Voraussetzung für viele Untersuchungen zur Pathogenität des Hepatitis C Virus ist das Vorhandensein eines *in vitro* Replikationssystems. Die in Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse der HCV-Replikation in verschiedenen Zellsystemen zeigen, daß das Virus nur in sehr geringen Konzentrationen in Kultur zu detektieren ist. Für den Virusnachweis war die Durchführung einer RT-PCR mit nachfolgender Hybridisierung und somit enzymatischer Verstärkung des PCR-Signals notwendig. Auch konnte HCV nicht kontinuierlich in den verschiedenen ausgetesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Die in den Tabellen 11, 12 und 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Viruskonzentration in einigen Zellsystemen (Molt4, Raji, Huh7, PBMLs, immortalisierten Hepatozyten und primären Hepatozyten) für mehrere aufeinanderfolgende Tage unter der Nachweisgrenze der RT-PCR (10 RNA-Moleküle) und nur sporadisch an vereinzelten Tagen über der Nachweisgrenze lag. Die in der *in vitro* Kultur erhaltenen Ergebnisse stimmen zum Teil mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen der Kultivierung des Hepatitis C Virus in Zellsystemen überein (Shimizu et al., 1992 und Yoo et al., 1995). Andere Autoren (Lanford et al., 1994; Mizutami et al., 1996 und Nakajima et al., 1996) berichten über eine kontinuierlich nachweisbare Replikation von HCV in ihren Zellkultursystemen. Die Zugabe von PEG bei der Inkubation der Zellen mit HCV-positivem Serum zeigte bei den hier durchgeführten Arbeiten keinen Einfluß auf die Replikation des Hepatitis C Virus in den Zellen. Der einzige zu beobachtende Effekt von PEG war die verstärkte Adsorption des Virus an die Zellen, da durch die routinemäßig durchgeführten Waschschrte das Virus nicht von den Zellen abgewaschen werden konnte. Auch die Überlegung, daß das Virus möglicherweise über Lipoprotein-Rezeptoren aufgenommen wird und so eine Bindung von Lipoproteinen an das Virus das Eindringen in die Zelle verbessert werden könnte, wurde durch die in Kapitel 4.3.3 dargestellten Ergebnisse nicht bestätigt.

Für Untersuchungen zur Pathogenität des Hepatitis C Virus reichen die in dieser Arbeit ausgetesteten *in vitro* Replikationssysteme nicht aus, da die Viruskonzentration in den Zellkultursystemen nur sehr gering ist. Der Versuch, HCV-positive Tumorzellen anzuzüchten um Untersuchungen zur Pathogenese des Hepatitis C Virus durchführen zu könne, scheiterte ebenfalls. Zwar hafteten einige Zellen an den Kulturflaschen, jedoch besaß keine dieser Zellen die Fähigkeit sich unter diesen Bedingungen zu teilen.

Da die Replikation des Hepatitis C Virus in den verschiedenen Zellkultursystemen keine befriedigenden Ergebnisse lieferte, wurde für Untersuchungen zur Pathogenität des Hepatitis C Virus auf Sequenzvergleiche von HCV-Isolaten aus Tumorgewebe und gesundem Lebergewebe zurückgegriffen.

### **5.2.2 Tumorigenität von HCV**

Zahlreiche epidemiologische Untersuchungen weisen das Hepatitis C Virus mit großer Wahrscheinlichkeit als tumorinduzierendes Virus aus. Bisher existiert jedoch keine Vorstellung darüber, wie HCV Tumoren induziert. Mögliche Mechanismen der Hepatokarzinogenese können sowohl direkte Effekte des Hepatitis C Virus wie z. B. Induktion von Wachstumsfaktoren oder der Verlust bzw. das Auftreten von Mutationen in Tumorsuppressorgenen (durch Interaktionen von Virus-Proteinen mit Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen) als auch indirekte Effekte aufgrund des hohen Grades der Leberzell-Regeneration, welche durch die Persistenz des Virus induziert ist, sein.

Erstmals wurden krebsauslösende oder onkogene Viren vor über 80 Jahren nicht beim Menschen, sondern bei Hühnern als Ursache einer Art Leukämie entdeckt (Eilermann et al., 1908). Seitdem hat man über 100 verschiedene onkogene Viren isoliert, darunter DNA-Viren wie z. B. Papovaviren (u. a. Polyoma, SV-40, Papillomaviren), Adenoviren, Herpesviren oder Hepadnaviren (u. a. HBV), die beim Menschen oder im Tier Tumoren induzieren können. Auch verschiedene onkogene RNA-Viren (Retroviren) sind bekannt. Die Retroviren besitzen ein charakteristisches Enzym, die reverse Transkriptase, mit deren Hilfe sich die Viren über eine DNA-Zwischenstufe replizieren. Zur Zeit ist jedoch noch kein "reines" RNA-Tumor-

---

Virus, welches sich nicht über eine DNA-Zwischenstufe repliziert, bekannt. Möglicherweise bildet HCV als reines RNA Virus eine Ausnahme.

Voraussetzung für die onkogene Wirkung der meisten Viren (z. B. auch bei HBV) ist die Integration einer oder mehrerer Kopien der Virus-DNA in ein Chromosom der Zelle. Durch den Einbau viraler Sequenzen in das zelluläre Genom kann es zum Einschalten sogenannter zellulärer Onkogene, bzw. zu einer Zerstörung von Tumor-Suppressor-Genen kommen. Andere Viren besitzen auf ihrem Genom Nukleinsäuresequenzen, die für ein direkt transformierendes Protein kodieren (RSV, SSV, SV-40, Polyoma-, Adeno-, Papillomaviren etc.),

Das Hepatitis C Virus ist ein Plus-Strang RNA-Virus. Es repliziert im Zytoplasma der Wirtszelle über ein Minus-Strang-RNA Intermediat mit Hilfe einer viruseigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Choo et al., 1991; Okamoto et al., 1991 und Takamizawa et al., 1991). In Zellen von hepatozellulären Karzinomen wurden zwar replizierende HCV-Sequenzen (Minus-Strang-Nachweis) gefunden, Integrale in das Wirtszellgenom aber nicht entdeckt (Gerber et al., 1992 und Paterlini et al., 1991). Dies entspricht der Tatsache, daß sich HCV im Gegensatz zu den Retroviren nicht revers transkribiert, und deshalb die Integration in das Wirtszellgenom keine notwendige Voraussetzung für die virale Replikation darstellt. Ein Integrationsmechanismus wie bei den zuvor beschriebenen Tumorigenen oder bei HBV ist daher nicht als Ursache einer Transformation der Wirtszelle denkbar. Für das transformierende Potential des Hepatitis C Virus könnte demgegenüber das Vorhandensein sogenannter "trans-Effekte" durch Interaktionen von Virusprotein mit zellulären Nukleinsäuresequenzen bzw. zellulären Proteinen verantwortlich sein. Diese Effekte könnten sowohl durch native als auch veränderte virale Proteine verursacht werden. Mutationen in der für die Replikation und Translation wichtigen 5'-NC-Region ebenso wie Mutationen in der NS5-Region (Replikase) können grundsätzlich einen entscheidenden Einfluß auf die Pathogenität des Virus besitzen, da solche Mutationen möglicherweise Einfluß auf die Viruskonzentration bzw. die Mutationsrate des Virus besitzen. Um mögliche virale Faktoren für die Entstehung hepatozellulärer Karzinome zu entdecken, wurde HCV-RNA aus Tumor- und Peritumorgewebe bzw. Serum des gleichen Patienten isoliert und definierte Bereiche des HCV-Genoms sequenziert.

Die Extraktion von HCV-RNA aus Tumor- bzw. Peritumorgewebe erfolgte mit Hilfe der Mikrodissektion. Diese Methode macht es möglich, gezielt Zellen unter mikroskopischer Sicht zu selektieren. Die in bisherigen Veröffentlichungen dargestellten Sequenzvergleiche zwischen Tumor- und Peritumorgewebe erfolgten dagegen aus Zellen, die nur makroskopisch voneinander getrennt worden waren (Horie et al., 1996; Kurosaki et al., 1995 und Sullivan et al., 1994). Daher kann man davon ausgehen, daß in dem sogenannten Tumorgewebe noch zahlreiche nicht-transformierte Zellen vorhanden waren und umgekehrt. Die auf diese Weise erhaltenen Daten sind daher nicht direkt mit den Sequenzergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Abbildung 18 zeigt, daß innerhalb eines Gewebestückes die Tumor- bzw. Peritumorzellen ohne mikroskopische Kontrolle nicht gezielt zu trennen sind.

#### **5.2.2.1 Sequenzierung der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus**

Die Sequenzierung der 5'-NC-Region von Nukleotidposition -212 bis -1 (nach Choo et al., 1989) zeigte keine Unterschiede zwischen den HCV-Isolaten aus dem Serum, dem Tumor- bzw. dem Peritumorgewebe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Niu et al. (1995) und Sullivan et al. (1994) veröffentlichten Daten. Da die in Kapitel 4.4.2 beschriebene Sequenzierung nicht die vollständige 5'-NC-Region des Virus umfaßt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß am äußersten 5'-Ende nicht noch Mutationen vorliegen, welche die Pathogenität des Virus beeinflussen können.

#### **5.2.2.2 Isolierung verschiedener HCV-Varianten aus Tumor- und Peritumorgewebe**

Die direkte Sequenzierung der NS5-Region von Tumor-, Peritumor- und Serumisolaten zeigte das Vorhandensein verschiedener HCV-Varianten im Tumor- und Peritumorgewebe bzw. im Serum des Patienten. Durch die Isolierung und Sequenzierung von Isolaten aus jeweils drei verschiedenen Bereichen des Tumors bzw. des Peritumors konnte gezeigt werden, daß es sich nicht um eine zufällige Verteilung von Virusvarianten über das Lebergewebe handelt, sondern um Tumor- bzw. Peritumor-spezifische Isolate.

Das Auftreten von verschiedenen HCV-Varianten im Serum mit meist einer vorherrschenden Sequenz und mehreren Varianten dieser Sequenz wurde von Martell et al. (1992) und Weiner et al. (1991) beschrieben. Einige biologische Eigenschaften werden dieser Quasispeziesnatur des Hepatitis C Virus zugeschrieben, darunter die Persistenz der Infektion (Honda et al., 1994 und Shimizu et al., 1994) und die Resistenzentwicklung bei Behandlung mit antiviralen Substanzen (Enomoto et al., 1994; Enomoto et al., 1995; Koizumi et al., 1995 und Okada et al., 1992). Ebenso wird das Vorhandensein verschiedener Varianten in einem Patienten durch das Auftreten sogenannter "Escape-Mutanten" für die Fehlschläge bei der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes verantwortlich gemacht. Auch wird dem Vorhandensein verschiedener Varianten in einem Patienten ein unterschiedlicher zytopathischer Effekt zugesprochen. Aus diesem Grund ist es nicht unwahrscheinlich, daß das Vorhandensein verschiedener Varianten auch einen Einfluß auf die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen besitzt.

Die Klonierung und die anschließende Sequenzierung von jeweils 10 Klonen aus Bereichen der NS5-Region des Hepatitis C Virus zeigte, daß im Tumor bzw. im Peritumor jeweils nur eine HCV-Variante vorkommt. Zwar kann das Vorhandensein weiterer Varianten nicht ausgeschlossen werden, da nur jeweils 10 Klone sequenziert wurden, jedoch liegt deren Anteil unter 10 %.

Durch die Klonierung der HCV-Amplifikate der NS5-Region aus dem Serum konnte gezeigt werden, daß prinzipiell mit dieser Methode das Vorhandensein verschiedener Varianten erfaßt werden kann. Die im Peritumor gefundene HCV-Variante ist zu etwa 70 % auch im Serum des Patienten vorhanden. Die restlichen 30 % setzen sich aus mindestens drei weiteren Varianten zusammen. Da die NS5-Region im Vergleich zur Envelope-Region des Virus relativ konserviert ist, könnten wahrscheinlich anhand der E1- oder E2-Region noch weitere Varianten unterschieden werden. Das Auffinden von Varianten im Serum, die nicht im untersuchten Peritumorgewebe vorhanden sind, deutet darauf hin, daß möglicherweise in anderen Bereichen der Leber andere Varianten replizieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß es neben den Leberzellen noch andere Zellen z. B. Lymphozyten gibt, in welchen sich das Virus repliziert (Müller et al., 1993 und Qian et al., 1992). Die Beobachtung von Kurosaki et al. (1995), daß im Serum die gleiche Quasispeziespopulation zu finden ist wie in Leberbiopsien aus zufällig gewählten Bereichen der Leber bestätigt die hier dargestellten Ergebnisse die zeigen, daß im Serum die gleiche Variante wie im Peritumorgewebe

vorhanden ist. Jedoch konnte Kurosaki et al. (1995) mehrere HCV-Varianten im Serum wie auch im Lebergewebe nachweisen.

Die Unterschiede in der Nukleotidsequenz der NS5-Region zwischen Tumor- und Peritumorisolaten des Hepatitis C Virus haben bis auf eine Mutation keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge (Abb. 20). Die Mutation an Position 8522 (nach Choo et al., 1989) von C nach T im Tumorisolat führt zum Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin. In diesem Fall wird eine neutrale Aminosäure gegen eine andere neutrale Aminosäure ausgetauscht. Diese Punktmutation hat daher sehr wahrscheinlich keinen großen Einfluß auf die Faltung bzw. die Funktion des Proteins.

### **5.2.2.3 Veränderte Core-Sequenzen von HCV-Isolaten aus dem Tumorgewebe**

Das HCV-Core-Protein besitzt einige Eigenschaften, die es im Zusammenhang mit der Entstehung hepatozellulärer Karzinome interessant macht. So existieren Interaktionen zwischen dem Core-Protein und verschiedenen zellulären Proteinen bzw. Promotorbereichen, welche die Proliferation von Zellen beeinflussen können. Zhu et al. (1995) berichtete von Interaktionen des HCV-Core-Proteins mit den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren 1 und 2 und dem Fas-Protein. Ray et al. (1997) konnte eine Repression des p53-Promotors durch das HCV-Core-Protein aufzeigen.

Die Sequenzierung eines 270 Basen umfassenden Bereiches der HCV-Core-Region zeigte das Vorhandensein von veränderten HCV-Core-Sequenzen im Tumorgewebe. Die durch Klonierung erhaltenen HCV-Sequenzen aus dem Peritumor waren alle identisch und stimmten (wie zuvor bei der NS5-Region) mit der im Serum vorherrschenden HCV-Variante überein. Von 10 durch Klonierung erhaltenen HCV-Core-Sequenzen aus dem Serum des Patienten zeigte nur eine Sequenz eine Punktmutation im Vergleich zu den anderen im Serum gefundenen Sequenzen. Die bei dieser Sequenz auftretende Mutation führte nicht zu einem Aminosäureaustausch. Alle aus dem Tumorgewebe isolierten HCV-Core-Sequenzen wiesen Veränderungen im Vergleich zur Peritumor- bzw. Serumsequenz auf. Die HCV-Tumor-Sequenzen besitzen ausnahmslos Mutationen, die entweder zu einem Abbruch der Proteinsynthese nach 28 bzw. 41 Aminosäuren führen oder zu einem Verschieben des

Leserasters und dadurch bedingt zu einer veränderten Aminosäuresequenz nach 19 bzw. 51 Aminosäuren. Ravaggi et al. (1994) und Suzuki et al. (1995) konnten zeigen, daß das *in vivo* vorhandene, prozessierte Core-Protein (21 kDa) im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. Core-Proteine, welchen die am 3'-Ende befindliche hydrophobe Sequenz fehlt, können nach *in vitro* Expression in eukaryontischen Zelllinien in den Zellkernen detektiert werden. Auch Core-Proteine, die nur noch aus den ersten 40 N-terminalen Aminosäuren bestehen sind im Zellkern lokalisiert. Die am Transport in den Zellkern beteiligten Aminosäuren des Core-Proteins sind in den Aminosäurepositionen 5 - 13, 38 - 43 und 58-71 lokalisiert (Ravaggi et al., 1994). Bei den in dieser Arbeit gefundenen verkürzten Core-Proteinen aus dem Tumorgewebe sind die Aminosäuren 5 bis 13 unverändert vorhanden. Die beiden anderen am Transport beteiligten Aminosäurebereiche sind entweder deletiert oder durch Frame-shift-Mutationen in ihrer Aminosäuresequenz vollständig verändert. Da von Ravaggi et al. (1994) gezeigt werden konnte, daß das Vorhandensein der Aminosäuren 5-13 für den Transport in den Zellkern ausreicht, ist zu vermuten, daß die im Tumor gefundenen Core-Proteine ebenfalls im Zellkern lokalisiert sind. Dort könnten die gefundenen trunkierten Core-Proteine einen direkten Einfluß auf die Regulation der Proteinsynthese ausüben.

Alle aus den veränderten HCV-Core-Sequenzen resultierenden Proteine sind basischer (Isoelektrischer Punkt: 12,08 bis 12,69) als das native HCV-Core-Protein (Isoelektrischer Punkt = 11,95). Die im nativen Protein vorhandene Bindungsstelle für Nukleinsäuren (Aminosäureposition 1 bis 75, (Santolini et al., 1994)) ist in den veränderten HCV-Core-Proteinen nur noch zum Teil vorhanden. Da die resultierenden veränderten Core-Proteine aus den Tumorzellen jedoch noch basischer sind als das native HCV-Core-Protein, müßte, die Bindungsfähigkeit von negativ geladenen Nukleinsäuren erhalten sein.

Durch die Fähigkeit des Core-Proteins Nukleinsäuren zu binden, könnte das Protein direkt mit zellulärer DNA interagieren und somit die Transkription der DNA oder die Regulation der Expression zellulärer Proteine, welche an der Zellproliferation beteiligt sind, beeinflussen. Ray et al., (1995 und 1997) konnte die Regulation von verschiedenen zellulären Promotoren u.a. p53 durch das Core-Protein auf Transkriptionsebene in transient transfizierten Zelllinien beobachten. In einem anderen Zusammenhang konnte von Shih et al. (1993) gezeigt werden, daß das HCV-Core-Protein die Replikation des Hepatitis B Virus in Zellkultur inhibiert.

Alle, 20 sequenzierten HCV-Core-Klone aus Tumorgewebe besaßen im Vergleich zu den isolierten Peritumorsequenzen veränderte Core-Proteine. Da HCV als Polyprotein translatiert und erst nachfolgend durch zelluläre und viruseigene Proteasen prozessiert wird, stellt sich die Frage, wie das Virus mit den gefundenen Mutationen im Core-Gen in der Zelle persistieren kann. Das Core-Protein befindet sich am 5'-Ende des HCV-Genoms. Der Abbruch der Proteinsynthese nach 28 bzw. 41 Aminosäuren hat zur Folge, daß auch alle auf dem Virusgenom vorhandenen nachfolgenden Proteine nicht synthetisiert werden können. Eine Möglichkeit, die Virusproteine, zu synthetisieren, ist das Vorhandensein weiterer Mutationen (Deletionen oder Insertionen) in den gefundenen Frameshift-Mutanten (CV1/3 und CV2/6), die das ursprüngliche Leseraster wieder herstellen. Bei dieser Lösung des Problems stellt sich jedoch die Frage, wie ein solches Virus ohne Core-Protein seine RNA verpacken und so vor zellulären Proteasen schützen könnte. Bei einem anderen Virus der Familie der Flaviviridae, dem Hepatitis G Virus, konnte bisher keine für ein Core-Protein kodierende Region gefunden werden (Muerhoff et al., 1995). Möglicherweise könnten bei den veränderten HCV-Sequenzen aus dem Tumorgewebe ähnliche, bislang unbekannte Mechanismen wie bei HGTV eine Rolle spielen. Da nur 20 Klone von HCV-Isolaten aus dem Tumor sequenziert wurden, besteht auch die Möglichkeit, daß neben den gefundenen veränderten HCV-Core-Sequenzen auch noch unveränderte Core-Sequenzen vorhanden sind, welche eine Helferfunktion ausüben können.

Die strenge Restriktion bestimmter Varianten auf Tumor- bzw. Peritumorgewebe konnte in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden. Chou et al. (1991), Kurosaki et al. (1995) und Paterlini et al. (1993) konnten sowohl unterschiedliche als auch identische HCV-Sequenzen aus Tumor- und Peritumorgewebe isolieren. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit die im Peritumor vorhandene HCV-Variante nicht im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Auch wurden in den Arbeiten von Chou et al. (1991) Kurosaki et al. (1995) und Paterlini et al. (1993) im Peritumor und im Tumor mehrere Varianten detektiert, während in dem hier untersuchten Gewebe im Peritumor nur eine HCV-Variante gefunden wurde. Ein Grund für die von Chou et al. (1991) Kurosaki et al. (1995) und Paterlini et al. (1993) beschriebene Variantenverteilung kann die ungenaue (makroskopische) Trennung zwischen Peritumor- und Tumorzellen sein. In den Arbeiten von Chou et al. (1991) Kurosaki et al. (1995) und Paterlini et al. (1993) konnte neben den identischen Varianten auch das Vorhandensein von Tumor- bzw. Peritumor-spezifischen Varianten aufgezeigt werden, was in



Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten ist. Die meisten der innerhalb der NS3- (Chou et al., 1991), NS 1- (Paterlini et al., 1993), Envelope- (Chou et al., 1991; Kurosaki et al., 1995 und Paterlini et al., 1993) und Core-Region (Chou et al., 1991) gefundenen Mutationen hatten keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge. Deletionen und Insertionen wurden nicht beschrieben. Der von Chou et al. (1991) untersuchte HCV-Core-Bereich umfaßte das 3'-Ende der Core-Region und liegt nicht innerhalb der Core-Sequenz, in welcher in der hier vorliegenden Arbeit die Mutationen gefunden wurden, die die meisten Veränderungen in den Proteinen ergaben.

Ein möglicher Grund, warum die gefundenen veränderten HCV-Core-Sequenzen nur auf das Tumorgewebe beschränkt und nicht im umgebenden Peritumorgewebe zu finden sind, kann sein, daß die im Tumor gefundenen Viren mit veränderten Core-Proteinen wahrscheinlich nicht in der Lage sind, benachbarte Zellen zu infizieren.

Veränderungen innerhalb der HCV-Core-Region von Tumorisolaten des Virus wurden auch von Horie et al. (1995 und 1996) und Shimizu et al. (1997) beschrieben. Die in den Arbeiten von Horie et al. (1995 und 1996) dargestellten Ergebnisse zeigen Mutationen im hydrophilen NH<sub>2</sub>-Ende des Core-Proteins. Die Sequenzen aus dem Tumor zeigen im Vergleich zu den Sequenzen aus dem Peritumor vermehrt Aminosäureänderungen. Auch Nonsense-Mutationen wurden gefunden (Horie et al., 1995). Die Aminosäure Serin an Aminosäureposition 45 ist in diesen Arbeiten dominierend in nicht-transformierten Zellen, während die Aminosäure Glycin an dieser Position im Tumorgewebe vorherrscht. Jedoch wurde nicht gezeigt, ob die gefundenen Veränderungen in der Core-Sequenz, Effekte auf die Zellproliferation haben. Shimizu et al. (1997) konnte zeigen, daß die Rate der Nukleotidaustausche im Core-Gen bei HCV-Isolaten von HCC-Patienten signifikant höher war, als die bei HCV-positiven Patienten ohne HCC. Ein direkter Vergleich von HCV-Isolaten aus Tumor- und Peritumorgewebe eines Patienten erfolgte in dieser Arbeit nicht.

Es wurden auch weitere Untersuchungen von anderen Regionen des Hepatitis C Virus in Verbindung mit der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome durchgeführt. Berichte über das transformierende Potential der NS3-Region des Hepatitis C Virus machen auch eine genauere Betrachtung dieser Region für nachfolgende Experimente interessant (Sakamuro et al., 1995). Jedoch sollte beachtet werden, daß die NS3-Sequenzen, welche für die Transformierungs-

experimente eingesetzt wurden, nicht aus Tumorgewebe isoliert wurden. Es handelt sich bei der in NIH/3T3-Zellen exprimierten NS3-Sequenz um eine künstlich verkürzte Teilsequenz der NS3-Region. Daher kann man die erhaltenen Daten nicht auf die Situation *in vivo* übertragen.

#### 5.2.2.4 Transformierendes Potential von HCV-Core-Sequenzen aus Tumorgewebe

Die im Tumor gefundenen veränderten HCV-Core-Sequenzen wurden für *in vitro* Expressionsexperimente in einen Expressionsvektor hinter einen CMV-Promotor kloniert und in NIH/3T3- bzw. Rat1-Zellen exprimiert. In den verschiedenen Malignitätstests (0,5 % FCS, Focusbildung, Weichagarkoloniebildung) wurden neben den im Tumor gefundenen veränderten HCV-Core-Sequenzen noch ein mutiertes *Ha-ras*-Gen als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der Vektor ohne eingebaute Fremd-DNA. Zusätzlich wurde, noch die Sequenz des gesamten Core-Proteins (21 kDa) kloniert, die ebenfalls als Kontrolle diente. Die durch die PCR künstlich verkürzte HCV-Core-Sequenz (Peritumorsequenz mit 94 Aminosäuren) wurde ebenfalls in den pcDNA3-Vektor kloniert. Diese Kontrollen wurden eingesetzt, da von Ray et al. (1996) über die Immortalisierung primärer Rattenembryo-Fibroblasten nach Expression des kompletten Core-Proteins in Verbindung mit mutiertem *Ha-ras*-Protein berichtet wurde. Dieses Ergebnis würde bedeuten, daß das native Core-Protein an der Entstehung hepatozellulärer Karzinome beteiligt sein kann, ohne daß Veränderungen des Proteins, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurden, notwendig sind.

Bei den Malignitätstests mit NIH/3T3-Zellen wurde bei den Sequenzen CV1/1, CV2/1 und CV2/6 ein transformierendes Potential in 0,5 % FCS und in Weichagar beobachtet. Die mit diesen Sequenzen transfizierten Zellen bildeten darüber hinaus in Medium mit 0,5 % FCS Foci aus. Die Zellen, die nur mit dem Vektor transfiziert wurden und somit als Negativkontrollen fungierten, zeigten keine transformierenden Eigenschaften. Die mit der künstlich verkürzten Peritumorsequenz transfizierten Zellen zeigten jedoch ebenfalls, wie die oben beschriebenen NIH/3T3-Zellen mit den Sequenzen CV1/1, CV2/1 und CV2/6, transformierende Aktivität in 0,5 % FCS. Weichagarkoloniebildung wurde nicht beobachtet. Die in den Zellen exprimierte gesamte Core-Sequenz hatte jedoch keinen Einfluß auf die

Proliferation der Zellen. Dies spricht nicht gegen die von Ray et al. (1996) berichtete Beobachtung, daß das Gesamt-Core-Protein in der Lage ist, Zellen zu immortalisieren. Die Entstehung von Tumorzellen ist nicht das Ergebnis einer einzigen Mutation bzw. einer einzigen Veränderung in der Zelle. Mehrere Veränderungen sind in einer Zelle notwendig, um sie zu transformieren. In den meisten Fällen stellt die Immortalisierung dieser Zellen den ersten Schritt zur Entstehung eines Tumors dar.

Die Sequenzen CV1/1 und CV2/1 unterscheiden sich nur in einer Aminosäure an Position 16. Beide Sequenzen ergeben ein trunkiertes Core-Protein mit 41 Aminosäuren. Dagegen besitzt die Sequenz CV2/6 kein Stopkodon. Die erhaltene Sequenz dieses Klones ist nur durch die Verwendung der für die Reaktion ausgewählten PCR-Primer verkürzt. Die an das generierte PCR-Produkt anschließende Genomsequenz in 3'-Richtung ist nicht bekannt. Gemeinsam ist den drei Sequenzen CV1/1, CV2/1 und CV2/6, daß nur die ersten 18 Aminosäuren mit der Sequenz des nativen HCV-Core-Proteins übereinstimmen und die nachfolgenden Aminosäuren im Vergleich zur originalen Core-Sequenz verändert sind. Ab Aminosäureposition 19 erfolgt aufgrund einer Mutation eine Änderung der Aminosäuresequenz, wobei sich die Sequenzen CV1/1 und CV2/1 von der Sequenz des CV2/6-Klons unterscheiden.

Die gleichen HCV-Core-Sequenzen, die zuvor in den NIH/3T3-Zellen transformierende Eigenschaften gezeigt hatten, zeigten auch die Fähigkeit, das Wachstum von Rat1-Zellen zu verändern. So konnten die mit diesen Sequenzen transfizierten Zellen in 0,5 % FCS-haltigem Medium wachsen und Foci bilden. Koloniebildung in Weichagar wurde nicht beobachtet. Auch hier hatte die künstlich verkürzte Peritumorsequenz Einfluß auf das Wachstum der Zellen. Dies spricht dafür, daß alleine die künstliche Trunkierung der im Peritumor bzw. im Serum des Patienten vorhandene HCV-Core-Sequenz ausreicht, um ein transformierendes Potential auszubilden. Möglicherweise ist in diesem Zusammenhang die von Ravaggi et al. (1994) gemachte Beobachtung, daß künstlich trunkierte HCV-Core-Proteine nicht mehr im Zytoplasma, sondern im Zellkern lokalisiert sind, ein entscheidender Faktor für die Transformation der Zellen. So wird bei bestimmten Togaviren (Semliki Forest Virus) das Core-Protein aktiv in den Zellkern transportiert, wo es für das Ausschalten der Wirtsproteinsynthese verantwortlich ist (Michel et al., 1990).

Die aus dem Tumor des Patienten isolierten HCV-Core-Sequenzen sind in der Lage das Wachstum der NIH/3T3-Zellen so zu verändern, daß die Zellen in Weichagar Kolonien bilden können. Die mit der verkürzten Peritumorsequenz transfizierten Zellen zeigen diese Eigenschaft nicht. Möglicherweise wird das transformierende Potential durch die in den Tumorsequenzen auftretenden Mutationen, die zu einem Verschieben des Leserasters führen, noch verstärkt.

Wie aus den Ergebnissen der Transformationsversuche zu ersehen ist, besitzen die veränderten HCV-Core-Sequenzen im Vergleich zur mutierten *Ha-ras*-Kontrolle nur ein schwach transformierendes Potential. Dies spricht auch für die lange Latenzzeit von 20 bis 30 Jahren bis es nach Infektion in einigen Patienten zur Entstehung hepatozellulärer Karzinome kommt (Kiyosawa et al., 1990). Für das nur schwach transformierende Potential der veränderten HCV-Core-Sequenzen spricht auch, daß in den Nacktmäusen keine "eindeutigen" Tumoren gebildet wurden.

Durch die *in vitro* Translation des Gesamt-Core-Proteins und des künstlich verkürzten Peritumorproteins konnte gezeigt werden, daß die Sequenzen dieser Proteine von Core-spezifischen Antikörpern erkannt werden können. Die Sequenzen der expressionsklonierten Amplifikate können *in vitro* korrekt translatiert werden. Durch Extraktion der DNA aus transformierten Zellen und nachfolgende Amplifikation der HCV-Core-Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die transfizierten Sequenzen in den Zellen vorhanden sind. Dies ist ein Hinweis darauf, daß es sich bei den transformierten Zellen nicht um spontane Transformanten handelt. Auch die Detektion eines 10 kDa Proteins in NIH/3T3-Zelllysaten die mit CV1/1 bzw. CV2/6 transfiziert waren, und die Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse in NIH/3T3- und Rat1-Zellen spricht gegen das Auftreten spontaner Transformanten. Was zur Zeit noch nicht geklärt ist, ist das Vorhandensein einer 10 kDa Proteinbande im Western-Blot der CV1/1 -transformierten Zellen. Die erwartete Größe des trunkierten HCV-Core-Proteins beträgt 4,5 kDa. Ein 10 kDa Protein würde entstehen, wenn das an Nukleotidposition 126 - 128 auftretende Stopkodon TAG überlesen würde. Die Ansequenzierung der Proteinbande wird Aufschluß darüber geben müssen, ob es sich bei dem 10 kDa Protein tatsächlich um das veränderte HCV-Core-Protein handelt. Auch wenn es sich bei dem 10 kDa Protein um ein anderes Proteins handelt, kann dies bei der Transformation der Zellen eine

Rolle spielen, da die 10 kDa-Bande nur in den transformierten Zellen gebildet wird, nicht aber in nicht-transformierten Zellen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse des transformierenden Potentials von HCV-Core-Sequenzen aus dem Tumorgewebe eines Patienten sprechen für einen direkten Einfluß des Hepatitis C Virus bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die erhaltenen Ergebnisse über das transformierende Potential der gefundenen veränderten Core-Sequenzen in artifiziellen Kultursystemen durchgeführt wurden. Faktoren wie z. B. das Immunsystem des Menschen, welches bei der Bekämpfung der Virusinfektion ebenso wie bei der Tumorentstehung eine bedeutende Rolle spielt, konnten bei den Versuchsansätzen nicht berücksichtigt werden. Man kann davon ausgehen, daß *in vivo* auch die indirekten, durch die Viruspersistenz hervorgerufenen Effekte, wie der ständig durch die Infektion hervorgerufene Zellerneuerung und die dadurch bedingte Zellerneuerung, Einfluß auf die Entstehung von Karzinomen besitzen.

### **5.3 Ausblick**

Die beschriebenen veränderten HCV-Core-Sequenzen wurden aus nur einem Patienten isoliert. Um eine Aussage über die klinische Relevanz dieser Sequenzen machen zu können, müssen weitere Tumore untersucht werden. Erste Versuche weitere Sequenzen aus Tumorgewebe zu erhalten scheiterten daran, daß HCV-RNA aus Formalin-fixiertem Tumorgewebe nur sehr schwer zu isolieren ist.

Die Tatsache, daß auch die künstlich verkürzte Peritumorsequenz transformierendes Potential aufweist, macht es notwendig, das Gesamt-Core-Protein systematisch zu trunkieren, um möglicherweise den für die Transformation verantwortlichen Nukleotidbereich zu lokalisieren.

Die in den Transformationsexperimenten benutzten Zellsysteme sind anfällig für spontane Transformationen. Die eingesetzten Fibroblasen (NIH/3T3- und Rat1-Zellen) sind ein artifizielles System für die Untersuchung eines hepatotropen Erregers. Daher ist es notwendig, weniger anfällige Testsysteme zu etablieren. Eine Möglichkeit ist die Generierung transgener

Mäuse. Durch geeignete Wahl des Promotors kann man die veränderten HCV-Core-Sequenzen entweder im gesamten Organismus bzw. nur in der Leber der Versuchstiere exprimieren. Auch induzierbare leberspezifische Promotoren können für die Experimente eingesetzt werden.

Ein weiteres Testsystem, um immortalisierende Eigenschaften von Sequenzen zu untersuchen, ist das System kooperierender Onkogene. Hierzu werden primäre Zellen gleichzeitig mit zwei verschiedenen Sequenzen, welche - für sich alleine gesehen - keinen Effekt auf die Zellproliferation haben, transfiziert.

Eine weitere interessante Fragestellung betrifft die Replikation des Virus in den Tumorzellen. Um diese Frage zu klären, müßten die gefundenen HCV-Isolate noch weiter in 3'-Richtung sequenziert werden. Jedoch würde auch das Auffinden weiterer Mutationen keinen genauen Aufschluß über die Translations- und Replikationsfähigkeit geben da die erhaltenen 3'-Sequenzen nicht ohne weiteres den verschiedenen HCV-Isolaten zugeordnet werden können. Die Amplifikation größerer Virusbereiche ist jedoch bei Verwendung von Formalin-fixiertem Gewebe nicht möglich.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### 6.1 RT-PCR zur Detektion von HCV

Für die Diagnostik und für Untersuchungen zur Pathogenese des Hepatitis C Virus ist es notwendig, eine sensitive und reproduzierbare RT-PCR zur Verfügung zu haben. Die Austestung verschiedener PCR-Verfahren zeigte, daß der Einsatz einer One-Step-PCR für die Diagnose der HCV-PCR die besten Voraussetzungen in bezug auf die Sensitivität und das Risiko für Produktkontaminationen besitzt. Die RT-PCR zeigte bei der Durchführung mit verschiedenen Primern, welche innerhalb der 5'-NC-Region anlagerten, große Unterschiede in der Sensitivität, welche wahrscheinlich auf die Sekundärstruktur der 5'-NC-Region zurückzuführen sind.

Um den Zusammenhang zwischen Virustiter und dem Krankheitsverlauf bzw. die *in vitro* Replikation von HCV zu untersuchen, wurde eine quantitative RT-PCR etabliert. Für die Generierung einer Standard-RNA wurde mit Hilfe der "site-directed mutagenesis" ein 25 Basen umfassender Bereich innerhalb der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus ausgetauscht. An die resultierende cDNA wurde durch die Amplifikation mit speziell konstruierten Oligonukleotiden eine T7-Promotor-Sequenz angehängt. Mit Hilfe der T7-Polymerase wurde die auf diese Weise konstruierte cDNA in RNA umgeschrieben. Die mit diesem RNA-Standard durchgeführte PCR hat nicht, wie andere beschriebene quantitative RT-PCR-Methoden, den Nachteil der Bildung von Heteroduplexstrukturen bzw. der bevorzugten Amplifikation kürzerer DNA-Fragmente, was zu einer Unter- oder Überschätzung der HCV-RNA führen kann. Mit der hier etablierten quantitativen RT-PCR ist es möglich, zehn RNA-Moleküle zu detektieren. Dies entspricht etwa 500 HCV-Molekülen pro ml Serum.

Die Anwendung der quantitativen RT-PCR bei 32 Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem Virustiter und der Höhe der Transaminasen bzw. des klinischen Erscheinungsbildes. Die Viruskonzentration schwankte von  $10^5$  bis  $10^9$  HCV-RNA-Molekülen pro ml Serum. Bei Patienten unter Interferon-Therapie zeigte sich, daß das Absinken der Transaminasen nicht in allen Fällen mit einer Eliminierung der HCV-RNA im Serum korreliert.

## 6.2 *In vitro* Replikation von HCV und Untersuchungen zur Tumorigenität

Für viele Untersuchungen zur Pathogenese insbesondere der Tumorigenese des Hepatitis C Virus ist es notwendig, ein *in vitro* Replikationssystem zu etablieren. Die Replikation von HCV konnte in den Zelllinien Molt4, Raji, Huh7 bzw. in PBMLs, immortalisierten Hepatozyten und primären Hepatozyten nachgewiesen werden. Jedoch war die Viruskonzentration nur sehr gering, und das Virus nur sporadisch an einigen Tagen in den Zellen bzw. im Überstand zu detektieren. Die ausgetesteten Zellsysteme waren nicht ausreichend, um Untersuchungen zur Pathogenese des Hepatitis C Virus korrekt durchführen zu können. Der Einsatz von PEG bzw. von Lipoproteinen hatte keinen Einfluß auf die *in vitro* Replikation des Virus.

Sequenzvergleiche zwischen HCV-Isolaten aus Tumorgewebe und Isolaten aus umgebendem "gesundem" Gewebe sollten Aufschluß über mögliche direkte Einflüsse des Hepatitis C Virus auf die Entstehung hepatozellulärer Karzinome geben. Sequenzvergleiche innerhalb der 5'-NC-Region des Hepatitis C Virus zeigten keine Unterschiede zwischen Virus-Isolaten aus Tumor- bzw. Peritumorgewebe. Anhand der direkten Sequenzierung eines Bereiches der NS5-Region konnte das Vorhandensein verschiedener HCV-Varianten im Tumor- und im Peritumorgewebe nachgewiesen werden. Durch Isolierung und Sequenzierung von Isolaten aus jeweils drei verschiedenen Bereichen des Tumors bzw. des Peritumors konnte gezeigt werden, daß es sich nicht um eine zufällige Verteilung von HCV-Varianten über das Lebergewebe handelt, sondern um Tumor- bzw. Peritumor-spezifische Varianten. Die aus dem Tumor isolierten HCV-Core-Sequenzen wiesen alle im Vergleich zur Peritumor- bzw. Serumsequenz Veränderungen auf. Die Tumorsequenzen besitzen Mutationen, die entweder zu einem Abbruch der Proteinsynthese nach 28 bzw. 41 Aminosäuren führen oder zu einem Verschieben des Leserasters und dadurch bedingt, zu einer veränderten Aminosäuresequenz nach 19 bzw. 51 Aminosäuren.

In Transformationsexperimenten mit NIH/3T3- und Rat1-Zellen konnte gezeigt werden, daß drei der aus dem Tumor isolierten Sequenzen die Proliferation der Zellen beeinflussen können. So konnten mit diesen Sequenzen transfizierte Zellen in 0.5 % FCS-haltigem Medium wachsen. Keine der Sequenzen konnte im Nacktmausversuch die Entstehung von Tumoren induzieren.



## 7 LITERATUR

- Alter M. J., Radier S. C., Judson F. N., Mares A., Alexander W. J., Hu P. Y., Miller J. K., Moyer L. A., Fields H. A., Bradley D. W., Margolis H. S.** Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA*. 1990, 264: 2231 - 2235
- 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.** 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
- Bartolome J., Castillo I., Quiroga J. A., Navas S., Carreno V.** Detection of hepatitis C virus RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells. *J. Hepatol* 1993, 17 (Suppl. 3): 90-93
- Bellentani S., Podda M., Tiribelli C., Callea F., Marazzi M., Sodde M., Merlini R., Batezzati P. M., Crosignani A., Zuin M.** Ursodiol in the long-term treatment of chronic hepatitis: a double-blind multicenter clinical trial. *J. Hepatol.* 1993, 19: 459 - 464
- Blum H. E.** Hepatitisviren und Leberkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt* 1993, 90: A2468 - 2474
- Bresters D., Zaaier H. L., Cuypers H. T. M., Teesink H. W., Winkel I. N., Van Exel-Oehlers P. J., Van Drimmelen A. A. J., Jansen P. L. M., Van der Peol C. L., Lelie P. N.** Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 1993, 33: 634 - 638
- Brillanti S., Masci C., Ricci P., Miglioli M., Barbara L.** Significance of IgM antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1992, 15: 998 - 1001
- Bruix J., Calvet S., Costa J., Ventura M., Bruguera M., Castillo R., Barrera J. M., Ercilla G., Sanchez-Tapias J. M., Vall M., Bru C., Rodes J.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* 1989, 2: 1004 - 1006
- Brown E. A., Zhang H., Ping L.-H., Lemon. M.** Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 1992, 20: 5041 - 5045
- Bukh J., Purcell R. H., Miller R. H.** Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89: 187 - 191
- Bukh J., Purcell R. H., 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. USA* 1993, 90: 8234 - 8238
- Bundschuh W. G., Madry M.** atwp-Mutante in einem Albino-Maus-Substamm (AB/Hum-1). *Z-Versuchstierkd.* 1988, 31: 249 - 254
- Camps J., Crisostomo S., Garcia-Granero M., Riezu-Boj J. I., Civeira M. P., Preto J.** Prediction of the response of chronic hepatitis C to interferon alfa: a statistical analysis of pretreatment variables. *Gut.* 1993, 34: 1714 - 1717
- Carson C. W., Conn D. L., Czaja A. J., Wright T. L., Brecher M. E.** Frequency and significance of antibodies to hepatitis C virus in polyarteritis nodosa. *J. Rheumatol.* 1993, 20: 304 - 309

- Causse X., Godinot H., Chevalleur M., Chossegras P., Zoulim F., Ouzan D., Heyraud J. P., Fontanges T., Albrecht J., Meschievitz C.** Comparison of 1 or 3 MU of interferon alfa-2b and placebo in patients with chronic non-A. non-B hepatitis *Gastroenterology* 1991, 101: 497 - 502
- Cha T.-A., Beall E., Irvine B., Kolberg J., Chien D., Kuo G., Urdea M. S.** At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1992, 89: 7144 - 7148
- Chan S.-W., McOmish F., Holmes E. C., Dow B., Peutherer J. F., Follett E., Yap P. L., Simmonds P.** Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J. Gen. Virol.* 1992, 73: 1131 - 1141
- Chemello L., Alberti A., Rose K., Simmonds P.** Hepatitis C serotype and response to interferon therapy. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330: 143
- Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome *Science* 1989, 244: 359 - 362
- Chou W. H., Yoneyama T., Takeuchi K., Harada H., Saito I., Miyamura T.** Discrimination of hepatitis C virus in liver tissues from different patients with hepatocellular carcinomas by direct nucleotide sequencing of amplified cDNA of the viral genome *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29: 2860 - 2864
- Clark J. M.** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16: 9677 - 9686
- Davis G. L., Baiart L. A., Schiff E. R., Lindsay K., Bodenheimer H., Perrillo R. P., Carey W., Jacobson I. M., Payne J., Dienstag J. L., Van Thiel D. H., Tamburro C., Lefkowitz J., Albrecht J., Meschievitz C., Ortego T. J., Gibas A.,** Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. *N. Engl. J. Med* 1989, 321: 1501 - 1506
- Davis G. L., Lau J. Y. N., Urdea M. S., Neuwald P. D., Wilber J. C., Lindsay K., Perrillo R. P., Albrecht J.** Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal conditions for specimen collection and clinical application in Interferon-treated patients. *Hepatology* 1994, 19: 1337 - 1341
- Deka N., Sharma M. D., Mukerjee R.** Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A. non-B hepatitis. *J. Virol.* 1994, 68: 7810 - 7815
- De Mitri M. S., Poussin K., Baccarini P., Pontisso P., D'Errico A., Simon N., Grigioni W., Alberti A., Beaugrand M., Pisi E., Brechot C., Paterlini P.** HCV-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995, 345: 413 - 415
- DiBisceglie A. M., Goodman Z. D., Ishak K. G., Hoofnagle J. H., Melpolder J. J., Alter H. J.** Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1991, 14: 969 - 974
- DiBisceglie A. M., Hoofnagle J. H., Krawczynski K.** Changes in hepatitis C virus antigen in liver with antiviral therapy. *Gastroenterology* 1993, 105: 858 - 862
- DiBisceglie A. M., Martin P., Kassianides C., Lisker-Melman M., Murray L., Waggoner J., Goodman Z., Banks S. M., Hoofnagle J. H.** Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized. double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 1989, 321: 1506 - 1510
- Dienstag J. L., Alter H. J.** Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Semin. Liver Dis.* 1986, 6: 67 - 81

- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., van der Poel S., DePolo N., Holland J.** The quasispecies (extremely heterogenous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance. - a review. *Gene*. 1985, 40: 1 - 8
- Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P. L., Sherlock S., McIntyre N., Simmonds P.** Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994, 19: 13 - 18
- Ellermann V., Bang O.** Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Bakteriol.* 1908, 46: 595 - 609
- Enomoto N., Kurosaki M., Tanaka Y., Marumo F., Sato C.** Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* 1994, 75: 1361 - 1369
- Enomoto N., Sakuma I., Asahina Y., Kurosaki M., Murakami T., Yamamoto C., Izumi N., Marumo F., Sato C.** Comparison of full-length sequences of Interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 224 - 230
- Failla C., Tomei L., De Francesco R.** Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 1994, 68: 3753 - 3760
- Farci P., Alter H. J., Wong D., Miller R. H., Shih J. W., Jett B., Purcell R. H.** A long-term study of Hepatitis C virus replication in non-A. non-B hepatitis. *N Engl. J. Med.* 1991, 325: 98 - 104
- Feitelson M.** Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992, 5: 275 - 301
- Flanagan S. P.** "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* 1966, 8: 295 - 309
- Fuchs K., Motz M., Schreier E., Zchoval R., Deinhardt F., Roggendorf M.** Characterization of nucleotide sequences from European hepatitis C virus isolates. *Gene* 1991, 103: 163 - 169
- Garson J. A., Tedder R. S., Briggs M.** Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and predicted infectivity. *Lancet* 1990, 335: 1419 - 1422
- Gerber M. A., Shieh Y. S. C., Shim K.-S., Thung S. N., Demetris A. J., Schwartz M., Akyol G., Dash S.** Detection of replicative hepatitis C virus sequences in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1992, 141: 1271 - 1277
- Grakoui A., Wychowski C., Lin C., Feinstone S. M., Rice C. M.** Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 1993, 67: 1385 - 1395
- Gretch D., Corey L., Wilson J., dela Rosa C., Wilson R., Carithers R., Busch M., Hart J., Sayers M., Han J.** Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: High-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *J.I.D.* 1994, 169: 1219 - 1225
- Gripon P., Diot C., Guguen-Guillouzo C.** Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology* 1993, 192: 534 - 540
- Hagiwara H., Hayashi N., Mita F., Takehara T., Kasahara A., Fusamoto H., Kamada T.** Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. *Gastroenterology* 1993, 104: 877 - 883
- Han J. H., Shyamala V., Richman K. H., Brauer M. J., Irvine B., Urdea M. S., Tekamp-Olson P., Choo Q.-L., Houghton M.** Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: Identification of conserved sequences in the 5' untranslated

- region and poly(A) tails at the 3' end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88: 1711 - 1715
- Herr W, Gerken G., Poralla T.** Hepatitis C virus-associated primary hepatocellular carcinoma in a noncirrhotic liver. Clin. Invest. 1993, 71: 49 - 53
- Higuchi R., Krummel B., Saiki R. K.** A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res. 1988, 16: 7351 - 7367
- Hijikata M., Mizushima H., Akagi T., Mori S., Kakiuchi N, Kato N., Tanaka T., Kimura K., Shimotohno K.** Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. J. Virol. 1993, 67: 4665 - 4675
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R.** Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 1989, 77: 51 - 59
- Holmes D. S., Quigley M.** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids Anal. Biochem. 1981, 114: 193
- Honda M., Kaneko S., Unoura M., Murakami S., Kobayashi K.** Sequence analysis of intrafamilial transmission of hepatitis C virus. Hepatology 1992, 16: 131A
- Honda M., Kaneko S., Sakai A., Unoura M., Murakami S., Kobayashi K.** Degree of diversity of hepatitis C virus quasispecies and progression of liver disease. Hepatology 1994, 20: 1144 - 1151
- Horie C., Iwahana H., Horie T., Shimizu I., Yoshimoto K., Yogita S., Tashiro S., Ito S., Itakura M.** Detection of different quasispecies of hepatitis C virus core region in cancerous and noncancerous lesions. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996, 718: 674 - 81
- Horie T., Shimizu I., Horie C., Yasuda M., Shiba M., Muguruma N., Kakehashi Y., Yokoi T., Nishikado T., Honda H., Ito S.** Mutations of the core gene sequence of hepatitis C virus in liver tissue with hepatocellular carcinoma. 4th UEGW Berlin 1995, Abstrakt 791
- Hosoda K., Omata M., Yodosuka O., Kato N., Ohto M.** Non-A, non-B chronic hepatitis is chronic hepatitis C: a sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in the liver. Hepatology 1992, 15: 777 - 781
- Ikeda K., Saitoh S., Tsubota A., Arase Y., Chayama K., Kumada H.** Risk factors for tumor recurrence and prognosis after curative resection of hepatocellular carcinoma. Cancer 1993, 71: 19 - 25
- Inchauspe G., Abe K., Zebedee S., Nasoff M., Prince A. M.** Use of conserved sequences from hepatitis C virus for the detection of viral RNA in infected sera by polymerase chain reaction. Hepatology 1991, 14: 595 - 600
- Jeffers L. J., Hasan F., DeMedina M., Reddy R., Parker T., Silva M., Mendez L., Schiff E. R., Manns M., Houghton M.** Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among patients with cryptogenic chronic hepatitis and cirrhosis. Hepatology 1992, 15: 187 - 90
- Jilg W.** Virushepatitis: Klinik, Epidemiologie, Diagnostik Therapie Prophylaxe Abbott Times 1993, 2: 10 - 17
- Johnson J. R., Gretch D. R., Yamabe H., Hart J., Bacchi C. E., Hartwell P., Couser W. G., Corey L., Wener M. H., Alpers C. E., Wilson R.** Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med. 1993, 328: 465 - 470
- Jouet P., Roudot-Thoraval F., Dhumeaux D., Metreau J. M. and le groupe francais pour l' etude du traitement des hepatites chroniques NANB/C.** Comparative efficacy of

- Interferon alfa in cirrhotic and noncirrhotic patients with non-A, non-B C hepatitis  
*Gastroenterology* 1994, 106: 686 - 690
- Kanai K., Kako M., Okamoto H.** HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to Interferon. *Lancet* 1992, 339: 1543
- Kato N., Yokosuka O., Hosoda K., Ito Y., Ohto M., Omata M.** Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: Increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 1993, 18: 16 - 20
- Kiyosawa K., Sodeyama T., Tanaka E., Gibo Y., Yoshizawa K., Nakano Y., Furuta S., Akahane Y., Nishioka K., Purcell R. H., Alter H. J.** Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990, 12: 671 - 675
- Kobayashi S., Hayashi H., Itoh Y., Asano T., Isono K.** Detection of minus-strand hepatitis C virus RNA in tumor tissues of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1994, 73: 48 - 52
- Koizumi K., Enomoto N., Kurosaki M., Murakami T., Izumi N., Marunio F., Sato C.** Diversity of quasispecies in various disease stages of chronic hepatitis C virus infection and its significance in interferon treatment. *Hepatology* 1995, 22: 30 - 35
- Kühnl P., Seidl S., Stangel W., Beyer J., Sibrowski W., Flik J.** Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989, 2: 324
- Kuo G., Choo Q.-L., Alter J. H., Gitnick G. L., Redeker A. G., Purcell R. H., Miramura T., Dienstag J. L., Alter M. J., Stevens C. E., Tegtmeier G. E., Bonino F., Colombo M., Lee W. S., Kuo C., Berger K., Shuster J. R., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M.** An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989, 244: 362 - 364
- Kurosaki M., Enomoto N., Sakamoto N., Tanaka Y., Tang L., Hoshino Y., Izumi N., Marumo F., Sato C.** Detection and analysis of replicating hepatitis C virus RNA in hepatocellular carcinoma tissues. *J. Hepatol.* 1995, 22: 527 - 535
- Kwok S., Higuchi R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989, 339: 237 - 238
- Kyte J., Doolittle R. F.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982, 157: 105 - 132
- Lanford R. E., Sureau C., Jacob J. R., White R., Fuerst T. R.** Demonstration of *in vitro* infection of Chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* 1994, 202: 606 - 614
- Lau J. Y. N., Davis G. L., Kiffen J., Qian K.-P., Urdea M. S., Chan C. S., Mizokami M., Neuwald P. D., Wilber J. C.** Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993, 341: 1501 - 1504
- Lavanchy D., Mayerat C., Morel B., Schneider P., Zufferey C., Gonvers J.-J., Pecoud A., Frei P. C.** Evaluation of third generation assays for detection of anti-hepatitis C virus (HCV) antibodies and comparison with presence of HCV RNA in blood donors reactive to c100-3 antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32: 2272 - 2275
- Lin C., Lindenbach B. D., Pragai B. M., McCourt D. W., Rice C. M.** Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* 1994, 68: 5063 - 5073
- Macpherson I., Montagnier L.** Agar Suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 1964, 23: 291 - 294
- Magrin S., Craxi A., Fabiano C., Fiorentino G., Marino L., Almasio P., Pinzello G. B., Palazzo U., Vitale M., Maggio A., Bucca G., Gianguzza F., Sbyamala V., Han J. H., Pagliaro L.** Serum hepatitis C virus (HCV)-RNA and response to alpha-interferon in anti-HCV positive chronic hepatitis. *J. Med. Virol.* 1992, 38: 200 - 206

- Magrin S., Craxi A., Fabiano C., Simonetti R. G., Fiorentino G., Marino L., Dequattro O., Di Marco V., Loiacono O., Volpes R., Almasio P., Urdea M. S., Neuwald P., Sanchez-Pescador R., Detmer J., Wilber J. C., Pagliaro L.** Hepatitis C viremia in chronic liver disease: Relationship to Interferon- $\alpha$  or Corticosteroid treatment. *Hepatology* 1994, 19: 273 - 279
- Marcellin P., Boyer N., Giostra E., Degott C., Courouce A. M., Gegos F., Coppere H., Cales P., Couzigou P., Benhamou J. P.** Recombinant human alpha-interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis: a multicenter randomized controlled trial from France. *Hepatology* 1991, 13: 393 - 397
- Martell M., Esteban J. I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., 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
- Michel M. R., Elgizoli M., Dai Y., Jakob R., Koblet H., Arrigo A.-P.** Karyophilic properties of Semliki Forest virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 1990, 64: 5123 - 5131
- Miller R. H., Purcell R. H.** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 2057 - 2061
- Mizutani T., Kato N., Saito S., Ikeda M., Sugiyama K., Shimotohno K.** Characterization of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line, MT-2. *J. Virol.* 1996, 70: 7219 - 7223
- Moradpour D., Wakita T., Tokushige K., Carlson R. I., Krawczynski K., Wands J. R.** Characterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *J. Med. Virol.* 1996, 48: 234 - 241
- Mori S., Kato N., Yagyu A., Tanaka T., Ikeda Y., Petchclai B., Chiewsilp P., Kurimura T., Shimotohno K.** A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1992, 183: 334 - 342
- Müller H. M., Pfaff E., Goeser T., Kallinowski B., Solbach C., Theilmann L.** Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J. Gen. Virol.* 1993, 74: 669 - 676
- Muerhoff A. S., Leary T. P., Simons J. N., Pilot-Matias T. J., Dawson G. J., Erker J. C., Chalmers M. L., Schlauder G. G., Desai S. M., Mushahwar I. K.** Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J. Virol.* 1995, 69: 5621 - 5630
- Nakajima N., Hijikata M., Yoshikura H., Shimizu Y. K.** Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1996, 70: 3325 - 3329
- Niu J., Kumar U., Monjardino J., Goldin R., Rosin D., Thomas H. C.** Hepatitis C virus replication in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1995, 48: 880 - 882
- Nouri Aria K. T., Sallie R., Sangar D., Alexander G. J. M., Smith H., Byrne J., Portmann B., Eddleston A. L. W. F., Williams R.** Detection of genomic and intermediate replicative Strands of hepatitis C virus in liver tissue by *in situ* hybridization. *J. Clin. Invest.* 1993, 91: 2226 - 2234
- Ogata N., Alter H. J., Miller R. H., Purcell R. H.** Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 3392 - 3396
- Ohba K.-L., Mizokami M., Ohno T., Suzuki K., Orito E., Ina Y., Lau J. Y. N., Gojobori T.** Classification of hepatitis C virus into major types and subtypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Research* 1995, 36: 201 - 214

- Ohto J., Terazavva S., Sasaki N., Sasaki N., Hino K., Ishiwata C, Kako M., Ujiie N., Endo C., Matsui A., Okamoto H., Mishiro S.** Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330: 744 - 750
- Okada S., Akahane Y., Suzuki H., Okamoto H., Mishiro S.** The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 1992, 16: 619 - 624
- Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y., Kurai K., Iizuka H., Machida A., Mivakawa Y.** Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J. Gen. Virol.* 1991, 72: 2697 - 2704
- Otlhoff K., Millis J. M., Rososve M., Goldstein L. I., Ramming K. P., Busutill R. W.** Is liver transplantation justified for the treatment of hepatic malignancies. *Arch. Surg.* 1990, 125: 1296- 1298
- Pagliario L., Craxi A., Cammaa C., Tine F., Di Marco V., Iacono O. L., Almasio P.** Interferon- $\alpha$  for chronic hepatitis C: An analysis of pretreatment clinical predictors of response. *Hepatology* 1994, 19: 820 - 828
- Pantelouris E. M.** Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 1968. 217: 370 - 371
- Parkin D. M., Stjernswärd J., Muir C. S.** Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull. World Health Organ.* 1984, 62: 163 - 182
- Paterlini P., Driss F., Naipas B., Pisi E., Franco D., Berthelot P., Brechot C.** Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HBsAg-negative patients: a study of a low-endemic area. *Hepatology* 1993, 17: 20 - 29
- Paul J.** Zell- und Gevebekulturen. de Gruyter-Verlag 1980
- Persico M., Romano M.** Alanine aminotransferase measurements and histological disease in hepatitis C. *Lancet* 1993, 342: 1369 - 1370
- Pillot J., Meng J., Dauguet C.** The "presumed" hepatitis F virus complementary data. Abstract 125, IX Triennial International Symposium On Viral Hepatitis And Liver Disease 1996, Rome, Italy
- Piperno A., D'Alba R., Roffi L., Fargion S., Mancia G., Fiorelli G.** Relation between  $\alpha$ -interferon response and liver iron stores in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1993, 18: 250A
- Poenaru D., Szilagyi A., Zabad F., Lamoureux E., Lough J. O.** Hepatocellular carcinoma: Comparison of clinical features among ethnic groups in an area of low prevalence. *Am. J. Gastroenterol.* 1991, 86: 487 - 494
- Pozzato G., Kaneko S., Moretti M., Croce L. S., Franzin F., Unolira M., Bereich L., Tirihelli C., Crovatto M., Santini G., Kobayashi K.** Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J. Med. Virol.* 1994, 43: 291 - 296
- Purcell R. H.** The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993, 104: 955 - 963
- Qian C., Camps J., Maluenda M. D., Civeira M. P., Prieto J.** Replication of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Hepatol.* 1992, 16: 380 - 383
- Ravaggi A., Natoli G., Primi D., Albertini A., Levrero M., Cariani E.** Intracellular localization of full-length and truncated hepatitis C virus core protein expressed in mammalian cells. *J. Hepatol.* 1994, 20: 833 - 836
- Ray R. B., Lagging L. M., Meyer K., Steele R., Ray R.** Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Research* 1995, 37: 209-220

- Ray R. B., Lagging L. M., Meyer K., Ray R.** Hepatitis C virus core protein cooperates with *ras* and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J. Virol.* 1996, 70: 4438 - 4443
- Ray R. B., Steele R., Meyer K., Ray R.** Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 10983 - 10986
- Reyes G. R., Purdy M. A., Kim J. P., Luk K.-C., Young L. M., Fry K. E., Bradley D. W.** Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990, 247: 1335 - 1339
- Rizzetto M., Canese M. G., Arico S., Crivelli O., Trepo C., Bonino F., Verme G.** Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta / anti-delta) associated with hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers *GUT* 1977, 18: 997 - 1003
- Roggendorf M., Deinhardt F., Rasshofer R., Eberle J., Hopf U, Moeller B, Zachoval R. Pape G., Schramm W., Rommel F.** Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 1989, 2: 324 - 325
- Roth W. K., Lee J.-H., Rüster B., Zeuzem S.** Comparison of two quantitative hepatitis C virus reverse transcriptase PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34: 261 - 264
- Ruiz J., Sangro B., Cuende J. I., Beloqui O., Riezu-Boj J. I., Herrero J. I., Preito J.** Hepatitis B and C viral infections in patients with hepatocellular carcinoma *Hepatology* 1992, 16: 637 - 641
- Rüster B., Zeuzem S., Roth W. K.** Quantification of hepatitis C virus RNA by competitive reverse transcription and polymerase chain reaction using a modified hepatitis C virus RNA transcript. *Analytical Biochemistry* 1995, 224: 597 - 600
- Saito I., Miyamura T., Ohbayashi A., Harada H., Katayama T., Kikuchi S., Watanabe Y., Koi S., Onji M., Ohta Y., Choo Q.-L., Houghton M., Kuo G.** Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 6547 - 6549
- Sakamuro D., Furukawa T., Takegami T.** Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 1995, 69: 3893 - 3896
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989
- Sanger F., Mecklen S., Coulson A. R.** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74: 5463 - 5467
- Santolini E., Migliaccio G., La Monica N.** Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 1994, 68: 3631 - 3641
- Sherlock S.** Viruses and hepatocellular carcinoma. *Gut.* 1994, 35: 828 - 832
- Shih C.-M., Lo S. J., Miyamura T., Chen S.-Y., Lee Y.-H. W.** Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J. Virol.* 1993, 67: 5823 - 5832
- Shimizu I., Yao D. F., Horie C., Yasuda M., Shiba M., Horie T., Nishikado T., Meng X. Y., Ito S.** Mutations in a hydrophilic part of the core gene of hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in China. *J. Gastroenterol.* 1997, 32: 47 - 55
- Shimizu Y. K., Iwamoto A., Hijikata M., Purcell R. H., Yoshikura H.** Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89: 5477 - 5481
- Shimizu Y. K., Hijikata M., Iwamoto A., Alter J. H., Purcell R. H., Yoshikura H.** Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant virus. *J. Virol.* 1994, 68: 1494 - 1500



- Shimoyama R., Sekiguchi S., Suga M., Sakamoto S., Yachi A.** The epidemiology and infection route of asymptomatic HCV carriers detected through blood donations *Gastroenterol. Jpn.* 1993, 28 (Suppl. 5): 1 - 5
- Shindo M., Di Bisceglie A. M., Hoofnagle J. H.** Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with alpha-interferon. *Hepatology* 1992, 6: 1015-1016
- Shirai M., Akatsuka T., Pendleton C. D., Houghton R., Wychovvski C., Mihalik K. Feinstone S., Berzofsky J. A.** Induction of cytotoxic T cells to a cross-reactive epitope in the hepatitis C virus nonstructural RNA polymerase-like protein. *J. Virol.* 1992, 7: 4098 - 4106
- Simmonds P., Holmes E. C., Cha T.-A., Chan S.-W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P. L., Kolberg J. 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.* 1993a, 74: 2391 - 2399
- Simmonds P., McOmish F., Yap P. L., Chan S.-W., Lin C. K., Dusheiko G., Saeed A. A., Holmes E. C.** Sequence variability in the 5'non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *J. Gen. Virol.* 1993b,74: 661 - 668
- Simmonds P., Rose K., Graham S., McOmish F., Dow B. C., Follet E. A. C., Marsden H., Chan S.-W., Yap P. L.** Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. *J. Clin. Microbiol.* 1993c, 31: 1493 - 1503
- Simons J. N., Pilot-Matias T. J., Leary T., Dawson G. J., Desai S. M., Schlauder G. G., Muerhoff A. S., Erker J. C., Buijk S. L., Chalmers M. L., Van Sant C. L., Mushahwar I. K.** Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 3401 - 3405
- Stremmel W., Schwarzendrube J., Niederau C., Strohmeyer G.** Epidemiology, clinical course and treatment of chronic viral hepatitis. *Hepatogastroenterology* 1991, 38: 22 - 28
- Sullivan D. E. Gerber M. A.** Conservation of hepatitis C virus 5'untranslated sequences in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver. *Hepatology* 1994, 19: 551 - 553
- Suzuki R., Matsuura Y., Suzuki T., Ando A., Chiba J., Harada S., Izumu S., Miyamura T.** Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J. Gen. Virol.* 1995, 76: 53-61
- Takano S., Ito Y., Yokosuka O., Ohto M., Ucheinmi K., Hirota K., Omata M.** A multicenter randomized controlled dose study of ursodeoxycholic acid for chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994, 20: 558 - 564
- Takahashi K., Kishimoto S., Yoshizawa H., Okamoto H., Yoshikawa A., Mishiro S.** p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 1992, 191: 431 - 434
- Takamizawa A., Mori C., Fuke I., Manabe S., Murakami S., Fujita J., Onishi E., Anodoh T., Yoshida I., Okayama H.** Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* 1991, 65: 1105 - 1113
- Tanaka T., Kato N., Cho M.-J., Shimotohno K.** A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995, 215: 744 - 749
- Taparowsky E., Suard Y., Fasano O., Shimizu K., Goldfarb M., Wigler M.** Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982,300: 762-765

- Thaler M. M., Park C.-K., Landers D. V., Wara D. W., Houghton M., Veereman-Wauters G., Sweet R. L., Han J. H.** Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 1991, 338: 17 - 18
- Todaro G. J., Green H.** Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 1963, 17: 299
- Tokita H., Okamoto H., Tsuda F., Song P., Nakata S., Chosa T., Iizuka H., Mishiro S., Miyakawa Y., Mayumi M.** Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 11022 - 11026
- Tsubota A., Chayama K., Ieda K., Yasuji A., Koida I., Saitoh S., Hashimoto M., Iwasaki S., Kobayashi M., Hiromitsu K.** Factors predictive of response to interferon- $\alpha$  therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994, 19: 1088 - 1094
- Tsukiyama-Kohara K., Hzuka N., Kohara M., Nomoto A.** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 1992, 66: 1476 - 1483
- Tsukuma H., Hiyama T., Tanaka S., Nakao M., Yabiiichi T., Kitamura T., Nakanishi K., Fujimoto I., Inoue A., Yamazaki H., Kawashima T.** Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328: 1797 - 1801
- Utsumi T., Hashimoto E., Okumura Y., Takayanagi M., Nishikawa H., Kigawa M., Kumakura N., Toyokawa H.** Heterosexual activity as a risk factor for the transmission of hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* 1995, 46: 122 - 125
- Vallette F., Mege E., Reiss A., Adesnik M.** Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17: 723 - 733
- Van der Poel C. L., Reesink H. W., Lelie P. N., Leentvaar-Kuypers A., Choo Q.-L., Kuo G., Houghton M.** Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet* 1989, 2: 297 - 298
- Van der Poel C. L., Cuypers H. T. M., Reesink H. W., Weiner A. J., Qnan S. Di Nello R., Van Boven J. J. P., Winkel I., Mulder-Folderts D., Exel-Oehlers P. J., Schaasberg W., Leentvaar-Kuypers A., Polito A., Houghton M., Lelie P. N.** Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991, 337: 317 - 319
- Van Thiel D. H., Gavalier J. S., Wright H. I., Friedlander L.** Responses to  $\alpha$  interferon (IFN) therapy are influenced by the iron content of the liver. *Gastroenterology* 1992, 102: A904
- Wang A. M., Goyie M. V., Mark D. F.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86: 9717 - 9721
- Weiner A. J., Brauer M. J., Rosenblatt J., Richman K. H., Tung J., Crawford K., Bonino F., Saracco G., Choo Q.-L., Houghton M., Hau J.** Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991, 180: 842 - 848
- 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., Brunetto M., Barr P. J., Miyamura T., McHutchinson J., Houghton M.** Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope protein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89: 3468 - 3472
- Yamada N., Tanihara K., Takada A., Yoriyuzi T., Tsutsumi M., Shimomura H., Tsuji T., Date T.** Genetic organization and diversity of the 3'noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 1996, 223: 255 - 261

- Yokojama L, Todo S., Iwatsuki S., Starzi T. E.** Liver transplantation in the treatment of primary liver cancer. *Hepatogastroenterology* 1990, 37: 188 - 193
- Yoo B. J., Selby M. J., Choe J, Suh B. S., Choi S. H, Joh J. S, Nnovo G. J., Lee H.-S, Houghton M., Han J. H.** Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with *in vitro*-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. *J. Virol.* 1995, 69: 32 - 38
- Yoshioka K., Kakumu S., Wakita T., Ishikawa T., Itoh Y., Takayanage M, Higashi Y., Shibata M., Morishima T.** Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- $\alpha$  therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992, 16: 293 - 299
- Yuki N., Hayashi N., Kasahara A., Hagiwara H., Katayama K., Fiisamoto H.** Hepatitis B virus markers and antibodies to hepatitis C virus in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 1992, 37: 65 - 72
- Zeuzem S., Rüster B, Lee J.-H., Stripf T., Roth W. K.** Evaluation of a reverse hybridization assay for genotyping of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* 1995, 23: 654 - 661
- Zeuzem S., Schmidt J. M, Lee J.-H., Rüster B., Roth W. K.** Effect of interferon alpha on the dynamics of hepatitis C virus turnover *in vivo*. *Hepatology* 1996, 23: 366 - 371
- Zeuzem S., Franke A., Lee J.-H., Hernnann G., Rüster B., Roth W. K.** Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates and their correlation to viremia, liver function tests, and histology. *Hepatology* 1996, 24: 1003 - 1009
- Zhu M., Matsumoto M., Hwang S. B., Su P. Y., Van Arsdale T., Ware C. F., Lai M. M. S.** Hepatitis C virus core protein interacts with tumor necrosis factor receptors. *Keystone Symposia 16 1996*, Abstract 116

## Lebenslauf

Name: Rüster  
Vorname: Brigitte Inge

Geburtsdatum: 28. Februar 1967  
Geburtsort: Frankfurt / Main  
Wohnort: 60431 Frankfurt / Main

Schulbesuch: 1973 - 1983: Peter-Petersen-Schule (Gesamtschule)  
1983 - 1986: Elisabethen-Gymnasium  
1986: Abitur

Studium: Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt / Main  
Immatrikulation: WS 1986 / 87  
Vordiplomprüfung: WS 1988 / 89  
Hauptstudium: Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Biochemie  
Anthropologie  
mündliche Diplomprüfung: WS 1990 /91  
Die anschließende Diplomarbeit wurde über das Thema:  
"Wuchsstrategien von Bacillus subtilus" angefertigt.  
28. Februar 1992: Diplom

Promotion: Beginn: März 1992 am Georg-Speyer-Haus.  
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut,  
Frankfurt / Main  
Thema: "Untersuchungen zur Tumor Pathogenese des  
Hepatitis C Virus"  
1993: Wellcome Forschungsstipendium für klinische  
Virologie  
Die weitere Finanzierung der Forschungsarbeiten erfolgte  
mittels des Förderschwerpunktes des BMFT "Infektions-  
forschung" mit dem Titel "Pathogenese des HCV-  
Infektion"  
Frühjahr 1997: Anstellung an der Medizinischen Klinik II,  
Abteilung Gastroenterologie, Universitätsklinik der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main,  
als Wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Fortführung des  
BMFT-Förderschwerpunktes "Infekt'ionsforschung"

Frankfurt, 17.12.1997