

RNA-Strukturen im Hepatitis C Virus und ihre Bedeutung für Translation und Replikation

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Peter Friebe

Mainz/ Heidelberg, 2004

Dekan: Professor Dr.

Erster Berichterstatter: Professor Dr.

Zweiter Berichterstatter: Professor Dr.

Tag der mündlichen Prüfung:

Danke!

„Das Lernen ist wie ein Meer ohne Ufer.“

Konfuzius

Chin. Philosoph
551 - 479 v. Chr.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis Mai 2002 am Institut für Virologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz und von Juni 2002 bis Juni 2004 im Hygiene-Institut, Abteilung Molekulare Virologie, der Universität Heidelberg unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Ralf Bartenschlager ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. Bartenschlager für die Überlassung des interessanten Themas, das mir Einblicke in verschiedene Bereiche der Molekularbiologie erlaubte sowie die freundliche Aufnahme in seine Abteilung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Labors für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit:

ZUSAMMENFASSUNG.....VIII

1. EINLEITUNG	1
1.1 DIE HEPATITIS VIREN.....	1
1.2 MEDIZINISCHE BEDEUTUNG DES HEPATITIS C VIRUS.....	2
1.3 GENOMSTRUKTUR VOM HCV	3
1.4 GENOTYPEN	7
1.5 LEBENSZYKLUS DES HCV	7
1.5 DAS HCV-REPLIKONSYSTEM.....	9
1.7 THEMENSTELLUNG	12
2. MATERIALIEN & METHODEN.....	13
2.1 MATERIALIEN.....	13
2.1.1 Zellen.....	13
2.1.2 Medien.....	13
2.1.3 Vektoren	13
2.1.4 Puffer und Lösungen	13
2.2 METHODEN.....	15
2.2.1 Präparation von Plasmid DNA aus Kleinkulturen.....	15
2.2.2 Präparation von Plasmid DNA aus Großkulturen.....	15
2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	15
2.2.4 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	16
2.2.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	16
2.2.6 Auffüllen und Entfernen überhängender DNA Enden.....	16
2.2.7 Aufreinigung und Fällung von DNA	16
2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	17
2.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	17
2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
2.2.11 Kompetenzinduktion von <i>E. coli</i>	17
2.2.12 Transformation von <i>E. coli</i>	17
2.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.14 Mutagenese-PCR.....	18
2.2.15 Sequenzanalyse von DNA.....	18
2.2.16 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen.....	18
2.2.17 Reverse-Transkription von RNA und Amplifikation con cDNA (RT-PCR).....	19
2.2.18 <i>In vitro</i> Transkription.....	19
2.2.19 RNA-Formaldehyd-Gelelektrophorese.....	19
2.2.20 RNA-Transfektion und Passage der transfizierten Zellen.....	20
2.2.21 Luziferase-Aktivitätsbestimmung	20
2.2.22 <i>In vitro</i> Translation	20
2.2.23 Glyoxal-Agarose-Gelelektrophorese.....	21
2.2.24 Northern blot.....	21
2.2.25 Synthese radioaktiv-markierter <i>in vitro</i> Transkripte.....	21
2.2.26 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	21
2.2.27 Western blot.....	22

3. ERGEBNISSE	23
3.1 KARTIERUNG DER REPLIKATIONSSIGNALE IN DER 5' NTR	24
3.1.1 Rolle von Sequenzen „upstream“ der IRES für die RNA-Replikation	26
3.1.2 Kartierung der Replikationssignale in Domäne 2, 3 und 4 der 5' NTR.....	29
3.1.3 Rolle des 3' Endes des Minusstranges für die RNA-Replikation	36
3.2 KARTIERUNG VON RNA-REPLIKATIONSSIGNALEN IN DER 3' NTR DES HCV-GENOMS ..	39
3.2.1 Untersuchungen des Einflusses der variable Region auf die HCV-Replikation	40
3.2.2 Rolle des polyU/UC-Bereichs für die RNA-Replikation	43
3.2.3 Essentielle Rolle der 3'-terminalen X-Sequenz für die RNA-Replikation.....	45
3.2.4 Einfluß von Mutationen in der 3' NTR auf RNA-Stabilität und RNA-Translation.	49
3.3 RNA-ELEMENTE INNERHALB DER KODIERENDEN REGIONEN DES HCV	53
3.3.1 Einfluss von Core-RNA-Strukturen auf die HCV-Replikation	54
3.3.2 Einfluss von Core-RNA-Strukturen auf die HCV-IRES vermittelte RNA-Translation	56
3.3.3 Einfluss von RNA-Strukturen in der kodierenden Region auf die HCV-Replikation	58
3.3.4 Strukturen im 3' Ende der NS5B-kodierenden Region.....	59
3.3.5 Funktionelle Komplementation von HCV-Replikons mit veränderten	62
Stemloopsstrukturen NS5BSL3.1 bis 3.3	62
3.3.6 Charakterisierung der RNA-Motive in NS5BSL3.2, die für die RNA-Replikation	67
notwendig sind.....	67
3.3.7 Bestimmung der Sekundärstruktur von Stemloop NS5BSL3.2 und XTSL2 in der 3'	69
NTR mit Hilfe einer NMR Analyse	69
3.3.8 Evidenz für eine „kissing loop“-Interaktion zwischen NS5BSL3.2 und XTSL2 in der	71
3' NTR.....	71
3.3.9 Bedeutungen von Primärsequenz und Komplementarität für die Interaktion	74
zwischen den RNA Elementen NS5BSL3.2 und XTSL2	74
3.3.10 Untersuchungen zum Einfluss der heterologen Sequenzen auf die NS5BSL3.2-	76
XTSL2 Interaktion	76
3.3.11 Auswirkungen komplementärer Nukleotidmotive im 5' und 3' HCV-Genombereich	78
auf die RNA-Replikation.....	78
4. DISKUSSION	80
4.1 EINFLUSS DER HCV 5' NTR AUF DIE RNA-REPLIKATION	80
4.2 EINFLUSS DER HCV 3' NTR AUF DIE RNA-REPLIKATION UND –TRANSLATION	88
4.3 EINFLUSS VON RNA-STRUKTUREN IN DER KODIERENDEN REGION DES HCV AUF DIE	96
REPLIKATION	96
4.4 PERSPEKTIVEN.....	104
5. ABKÜRZUNGEN	106
6. REFERENZEN.....	107
7. ANHANG	120
7.1 KONSTRUKTE MIT MUTATIONEN IN DER 5' NTR	120
7.2 KONSTRUKTE MIT MUTATIONEN IN DER 3' NTR	125
7.3 KONSTRUKTE MIT MUTATIONEN IN DER KODIERENDEN REGION	130
8. PUBLIKATIONEN	138
9. LEBENS LAUF	139

Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist ein umhülltes Virus aus der Familie der *Flaviviridae*. Es besitzt ein Plusstrang-RNA Genom von ca. 9600 Nukleotiden Länge, das nur ein kodierendes Leseraster besitzt. Das Genom wird am 5' und 3' Ende von nicht-translatierten Sequenzen (NTRs) flankiert, welche für die Translation und vermutlich auch Replikation von Bedeutung sind. Die 5' NTR besitzt eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), die eine cap-unabhängige Translation des ca. 3000 Aminosäure langen viralen Polyproteins erlaubt. Dieses wird ko- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in 10 funktionelle Komponenten gespalten. Inwieweit die 5' NTR auch für die Replikation der HCV RNA benötigt wird, war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt. Die 3' NTR besitzt eine dreigeteilte Struktur, bestehend aus einer variablen Region, dem polyU/UC-Bereich und der sogenannten X-Sequenz, eine hochkonservierte 98 Nukleotide lange Region, die vermutlich für die RNA-Replikation und möglicherweise auch für die Translation benötigt wird. Die genaue Rolle der 3' NTR für diese beiden Prozesse war zu Beginn der Arbeit jedoch nicht bekannt. Ziel der Dissertation war deshalb eine detaillierte genetische Untersuchung der NTRs hinsichtlich ihrer Bedeutung für die RNA-Translation und -Replikation. In die Analyse mit einbezogen wurden auch RNA-Strukturen innerhalb der kodierenden Region, die zwischen verschiedenen HCV-Genotypen hoch konserviert sind und die mit verschiedenen computerbasierten Modellen vorhergesagt wurden.

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war ein System, das auf der autonomen Replikation subgenomischer HCV-RNAs (Replikons) in der humanen Hepatomazelllinie Huh-7 beruht. Diese Replikons besitzen anstelle der viralen Strukturproteine entweder ein selektionierbares Markergen (*neo*) oder ein einfach zu messendes Reportergen (die Luziferase des Leuchtkäfers). Nach dem Einschleusen in Huh-7 Zellen kann die Replikation dieser RNAs entweder anhand der Anzahl der nach G418-Selektion gebildeten Kolonien oder durch Messung der Luziferaseaktivität in den transfizierten Zellen bestimmt werden.

Zur Kartierung der für RNA-Replikation benötigten Minimallänge der 5' NTR wurde eine Reihe von Chimären hergestellt, in denen unterschiedlich lange Bereiche der HCV 5' NTR 3' terminal mit der IRES des Poliovirus fusioniert wurden. Dieser Ansatz erlaubte eine Untersuchung der Replikationssignale innerhalb der 5' NTR ohne Einfluss auf die Translation des Kontrollgens (*neo* oder Luziferase). Mit diesem Ansatz konnten wir zeigen, dass die ersten 120 Nukleotide der HCV 5' NTR als Minimaldomäne für Replikation ausreichen. Weiterhin ergab sich eine klare Korrelation zwischen der Länge der HCV 5' NTR und der Replikationseffizienz. Mit steigender Länge der 5' NTR nahm auch die Replikationseffizienz zu, die dann maximal war, wenn das vollständige 5' Element mit der Poliovirus-IRES fusioniert wurde. Die hier gefundene Kopplung von Translation und Replikation in der HCV 5' NTR könnte auf einen Mechanismus zur Regulation beider Funktionen hindeuten. Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, welche Bereiche innerhalb der Grenzen des IRES-Elements genau für die RNA-Replikation benötigt werden.

Untersuchungen im Bereich der 3' NTR ergaben, dass die variable Region für die Replikation entbehrlich, die X-Sequenz jedoch essentiell ist. Der polyU/UC-Bereich musste eine Länge von mindestens 11-30 Uridinen besitzen, wobei maximale Replikation ab einer Länge von 30-50 Uridinen beobachtet wurde. Die Addition von heterologen Sequenzen an das 3' Ende der HCV-RNA führte zu einer starken Reduktion der Replikation. In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte keines der Elemente in der 3' NTR einen signifikanten Einfluss auf die Translation.

Ein weiteres cis aktives RNA-Element wurde im 3' kodierenden Bereich für das NS5B Protein beschrieben. Wir fanden, dass Veränderungen dieser Struktur durch stille Punktmutationen die Replikation hemmten, welche durch die Insertion einer intakten Version dieses RNA-Elements in die variable Region der 3' NTR wieder hergestellt werden konnte. Dieser Versuchsansatz erlaubte die genaue Untersuchung der für die Replikation kritischen Strukturelemente. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Struktur und die Primärsequenz der Loopbereiche essentiell sind. Darüber hinaus wurde eine Sequenzkomplementarität zwischen dem Element in der NS5B-kodierenden Region und einem RNA-Bereich in der X-Sequenz der 3' NTR gefunden, die eine sog. „kissing loop“ Interaktion eingehen kann. Mit Hilfe von gezielten Mutationen konnten wir zeigen, dass diese RNA:RNA Interaktion zumindest transient stattfindet und für die Replikation des HCV essentiell ist.

Diese Ergebnisse geben einen ersten Einblick in die Mechanismen der HCV Replikation und die dabei beteiligten cis-aktiven RNA-Sequenzen.

1. Einleitung

1.1 Die Hepatitis Viren

Die „epedemic Ikterus“ (Gelbsucht) wurde zum erstenmal von Hippokrates (460-375 v. Chr.) beschrieben und tauchte danach immer wieder in Berichten auf. Allerdings wurde die „infektiöse Gelbsucht“ erst Anfang 1900 mit der Leberentzündung (Hepatitis) in Zusammenhang gebracht. Das typische Krankheitsbild der Hepatitis sind Übelkeit, Schmerzen im rechten Oberbauch und Gelbsucht. Die Erreger der viralen Hepatitis sind eine sehr heterogene Virusgruppe, deren Gemeinsamkeit auf dem Leberzelltropismus und einer im wesentlichen auf die Leber beschränkte Erkrankung beruht. Man kennt z.Z. fünf Hepatitis Viren, die mit den Buchstaben des Alphabets bezeichnet werden.

Das Hepatitis A Virus (HAV) konnte zuerst von Feinstone und Kollegen 1973 aus dem Stuhl von Patienten isoliert werden, die an akuter Leberentzündung erkrankt waren. 1979 gelang es, das Virus in Zellkultur zu kultivieren. HAV gehört zur Familie der *Picornaviridae* und bildet dort die Gattung der *Hepatoviren*. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral. Das Hepatitis B Virus (HBV) wurde bereits Anfang der 60er Jahre im Blut australischer Eingeborenen als sog. „Australia Antigen“ entdeckt. Das eigentliche Virus konnte erst 1976 visualisiert werden und wurde nach seinem Entdecker auch als Dane-Partikel benannt. HBV, der Erreger der Serumhepatitis, gehört zur Familie der *Hepadnaviridae*. Das Hepatitis Delta Virus wurde 1977 vom Gastroenterologen Mario Rizzetto entdeckt und zunächst fälschlicherweise für ein bis dato unbekanntes HBV Protein („Delta Antigen“) gehalten. Bereits 1980 stellte sich heraus, dass es sich um ein Virusoid handelt, das ein einzelsträngiges RNA-Genom besitzt. Es kann zwar autonom replizieren, benötigt zur Partikelausschleusung und Infektion aber die Hüllproteine des HBV.

Nach der Identifizierung von HAV und HBV stellte sich schnell heraus, dass es noch mindestens einen Erreger für enteral und einen für parenteral übertragene Hepatitis geben musste (ET-NANBH / PT-NANBH). Der Erreger der enteral übertragenen non-A, non-B Hepatitis, der 1957 eine große Epidemie in Indien verursachte, konnte 1989 von Reges kloniert und darauffolgend von Bradley charakterisiert werden. Das Virus wurde als Hepatitis E Virus (HEV) bezeichnet.

Der Haupterreger der parenteral übertragenen NANBH ist das Hepatitis C Virus (HCV). Allerdings gelang es erst 1989 das Genom dieses Erregers, mit Hilfe eines immunologischen Suchverfahrens aus einer Genbank, die aus dem Serum eines infizierten Schimpansen kloniert

wurde, zu isolieren (Choo *et al.*, 1989). HCV wurde hauptsächlich über Blutprodukte übertragen, aber aufgrund moderner Nachweisverfahren ist dieser Übertragungsweg heutzutage fast komplett eliminiert. Neue HCV Infektionen sind im wesentlichen auf Transfusion ungetesteter Blutproben oder parenterale Risikofaktoren, insbesondere der Gebrauch intravenöser Drogen, zurückzuführen. Sexuelle Übertragung ist eher selten. Aufgrund der genomischen Organisation des einzelsträngigen RNA-Genoms zählt HCV zum alleinigen Vertreter der *Hepaciviren* innerhalb der Familie der *Flaviviridae*.

Das Hepatitis G Virus/ GBV-C wurde simultan von zwei Arbeitsgruppen 1995 entdeckt. Es gehört wie HCV zur Familie der *Flaviviridae*. Allerdings ist unklar, ob es sich bei diesen Viren tatsächlich um Hepatitis Erreger handelt bzw. ob überhaupt ein Krankheitsbild mit ihnen assoziiert ist.

Das TT Virus wurde 1997 in Japan aus einem Patienten isoliert und nach dessen Initialen benannt. Wie bei HGV/GBV-C konnte jedoch auch TTV bisher mit keiner Erkrankung assoziiert werden. Aufgrund seiner biophysikalischen und molekularen Eigenschaften wurde es als Mitglied einer neuen Virus-Familie, den *Circinoviridae*, eingestuft.

1.2 Medizinische Bedeutung des Hepatitis C Virus

Weltweit sind ca. 170 Millionen Menschen chronisch mit HCV infiziert, allerdings variiert die Durchseuchung je nach Region stark (USA/Mitteleuropa 0,4%; Ägypten 14%). Die akute HCV Infektion verläuft bei 90-95% der Patienten inapparent. Unabhängig davon wird vermutet, dass etwa 80% der Infizierten das Virus nicht eliminieren. Patienten mit einer solchen Infektion können in drei Gruppen unterteilt werden: Die erste Gruppe (10-20%) entwickelt entweder gar keine oder nur eine milde nicht spezifische Leberentzündung. Die zweite Gruppe (50-70%) entwickelt eine moderate Leberentzündung, die im Laufe von 20-40 Jahren zu einer Leberzirrhose führen kann. Patienten der dritten Gruppe (10-20%) entwickeln eine sehr aggressive Erkrankung mit einem schnellen Fortschritt zur Zirrhose meist in weniger als 20 Jahren (s. Abb. 1).

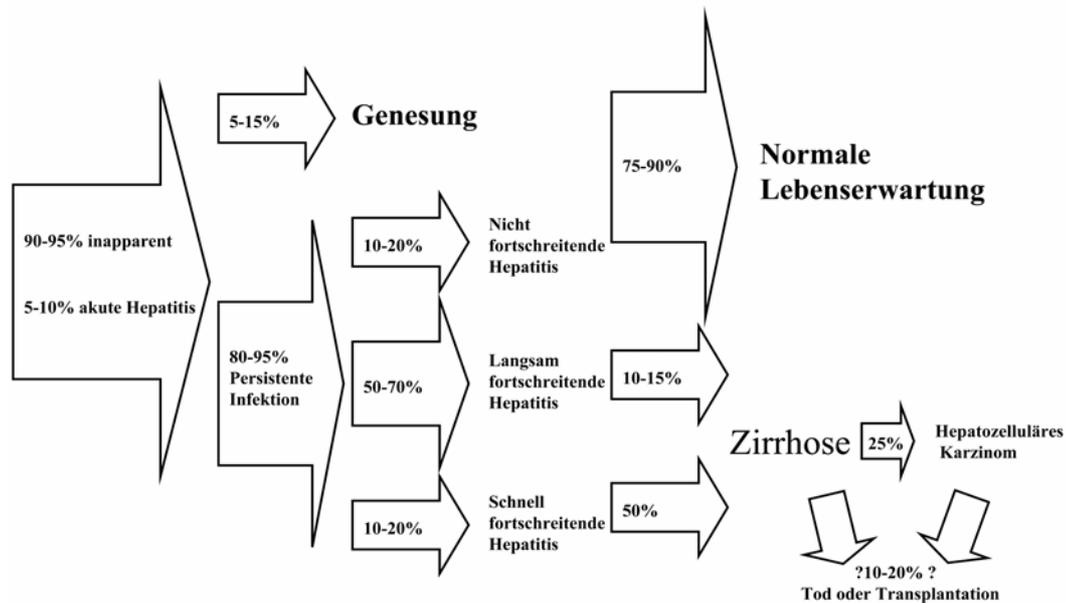


Abbildung 1: Verlauf einer HCV Infektion

Insgesamt schätzt man, dass ca. 20% der Patienten mit einer chronischen Hepatitis eine Leberzirrhose ausbilden, von denen wiederum 25% ein hepatozelluläre Karzinom entwickeln.

Die gegenwärtig einzige Therapiemöglichkeit einer chronischen HCV-Infektion beruht auf der Gabe von Interferon- α in Kombination mit dem Purin-Nukleosidanalogen Ribavirin. Dabei hängt die Erfolgsquote stark vom Genotyp (s. Kapitel 1.4) des HCV ab. 80-90% der Patienten, die mit Genotyp 2 oder 3 infiziert sind, können das Virus dauerhaft eliminieren, wohingegen nur 40% der Patienten, die mit Genotyp 1 infiziert sind, dazu in der Lage sind.

1.3 Genomstruktur vom HCV

HCV besitzt ein RNA-Genom von positiver Polarität mit einer Länge von ungefähr 9600 Nucleotiden. Das große offene Leseraster kodiert ein Polyprotein von ca. 3000 Aminosäuren dessen Expression cap-unabhängig ist. Sie wird durch eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) vermittelt, die im Bereich der 5' NTR liegt. Die 5' NTR umfasst die ersten 341 Nucleotide, wobei die Grenzen für das IRES Element zwischen den Nucleotiden 38-40 und 341 kartiert wurden. Inwieweit noch Nucleotide der Core-kodierenden Region benötigt werden, wird kontrovers diskutiert (Honda *et al.*, 1996a; b; Lu and Wimmer 1996; Reynolds *et al.*, 1995, Rijnbrand *et al.*, 2001). Weiterhin enthält die 5' NTR RNA-Elemente, die für die Replikation essentiell sind. Die 3' NTR weist eine 3-geteilte Struktur auf. Eine variable Region, die unmittelbar hinter dem Stop-Codon beginnt, einen poly-U/UC-Bereich mit

heterogener Länge und eine hochkonservierte 98 Nukleotide lange Sequenz mit ausgeprägter Sekundärstruktur (X-Sequenz), die essentiell für die Replikation *in vivo* ist. (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000).

Neben dem Polyprotein, welches ko- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in 10 verschiedene Polypeptide prozessiert wird (s.u.), wurde die Expression eines weiteren Proteins beschrieben. Das sogenannte ARFP (alternate reading frame protein) oder auch F- (frameshift) Protein wird in einem überlappenden Leserahmen in der aminoterminalen Region des Polyproteins kodiert (Walewski *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Varaklioti *et al.*, 2002). Obwohl Patientenserum Antikörper gegen das F-Protein aufweisen (Walewski *et al.*, 2001), was für eine Expression *in vivo* spricht, konnte gezeigt werden, dass es für die Replikation *in vitro* nicht essentiell ist (Lohmann *et al.*, 1999). Es ist unklar, ob das F-Protein für andere Funktionen bei der HCV-Vermehrung eine Rolle spielt.

Das Polyprotein enthält im aminoterminalen Bereich die Strukturproteine, die von zellulären Proteasen membranabhängig prozessiert werden (Hijikata *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994a; b; Santolini *et al.*, 1994; 1995). Im carboxyterminalen Bereich befinden sich die Nicht-Strukturproteine, die von den viruseigenen Proteasen NS2/3 und NS3/4A aus dem Polyproteinvorläufer herausgespalten werden (s. Abb 2). Innerhalb des Polyproteins sind die Proteine in der Reihenfolge (vom Amino- zum Carboxyterminus) Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B angeordnet (Hijikata *et al.*, 1991 und 1993; Bartenschlager *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993; Selby *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993; Mizushima *et al.*, 1994). Im folgenden werden die einzelnen Proteine näher beschrieben:

Das **Core-Protein** (21-23kDa) ist der Hauptbestandteil des Virus Partikels. Eine Assoziation mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und sog. „Lipid Droplets“ (Barba *et al.*, 1997; Moradpour *et al.*, 1996; Yasui *et al.*, 1998; Hope and McLauchlan 2000; Pietschmann *et al.*, 2002) wurde beschrieben, ebenso die membranabhängige Spaltung am Carboxyterminus von Core durch eine zelluläre Signalpeptid-Peptidase (McLauchlan *et al.*, 2002). Das Core Protein scheint Nukleinsäure-Chaperon-Aktivität zu haben (Cristofari *et al.*, 2004) und es wird vermutet, dass es im Verlauf des Viruszusammenbaus mit den viralen Glykoproteinen E1 und E2 interagiert.

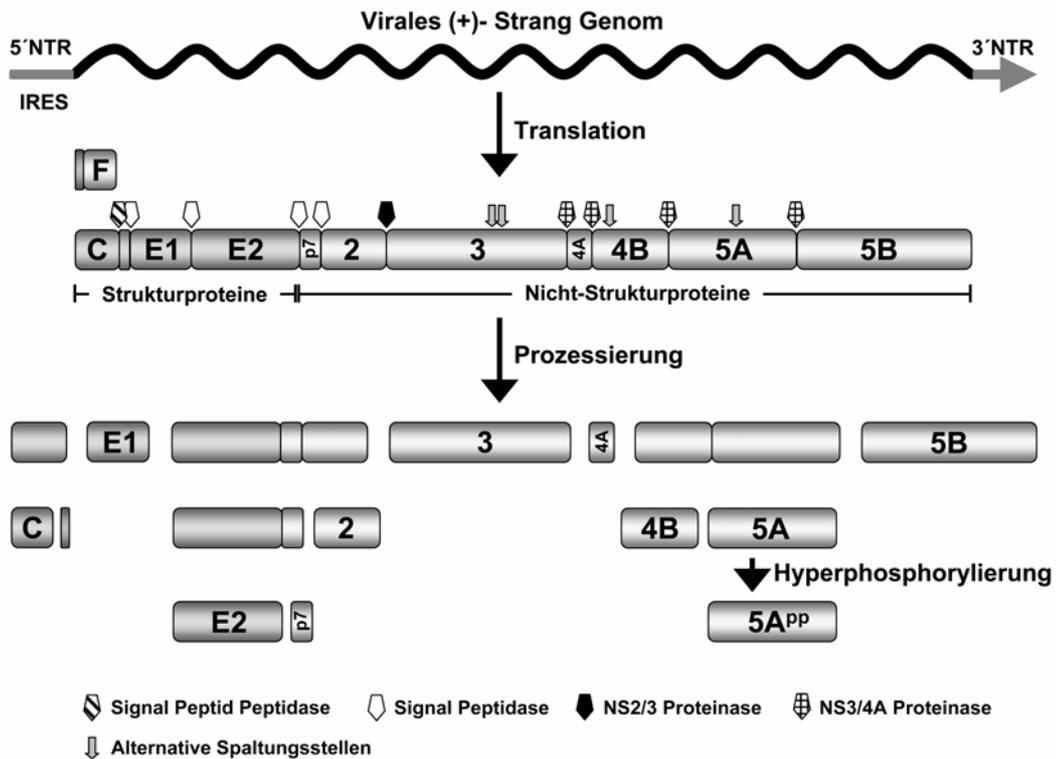


Abbildung 2: Die HCV Genomorganisation und Prozessierung des Polyproteins. Oben abgebildet ist eine schematische Darstellung des HCV Genoms mit den 5' und 3' NTRs, die Translationsprodukte sind darunter gezeigt. Proteasen, die an der Prozessierung des Polyproteins beteiligt sind, sind durch Pfeile angedeutet. Die Spaltungsprodukte sind darunter skizziert. Für Einzelheiten, siehe Text [Abbildung entnommen aus Bartenschlager *et al.*, 2004]

Die **Glykoproteine E1** (30-35kDa) und **E2** (70-72kDa) gehören zur Familie der Typ I Transmembranproteine (Dubuisson *et al.*, 2000). Ihre Biogenese involviert ER-spezifische Chaperone. Die Faltung von E2 ist unabhängig von anderen viralen Proteinen, wohingegen die Reifung von E1 die Hilfe von E2 (Michalak *et al.*, 1997) und Core (Merola *et al.*, 2001) benötigt. Es wird vermutet, dass E1 und E2 Heterodimere ausbilden (Dubuisson *et al.*, 1994; Ralston *et al.*, 1993; Deleersnyder *et al.*, 1997). E2 vermittelt die Anheftung des Virus an die Zelle. Als zelluläre Rezeptoren werden gegenwärtig CD81 und der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) diskutiert (Pileri *et al.*, 1998; Thomssen *et al.*, 1992; Agnello *et al.*, 1999; Monazahian *et al.*, 1999; Scarselli *et al.*, 2002). Für E1 wird angenommen, dass es den Fusionsprozess unterstützt und so das Genom ins Cytoplasma gelangen kann.

Die Funktion des hydrophoben Proteins **p7** war lange Zeit unklar. Erst in den letzten Jahren gelang die Zuordnung zur Familie der Viroporine (Carrere-Kremer *et al.*, 2002). Für diese Proteine ist bekannt, dass sie die Membranpermeabilität erhöhen können. In diesem Zusammenhang wird für p7 eine wichtige Funktion in der späten Phase des Viruszusammenbaus vermutet.

NS2 bildet mit **NS3** die **NS2/3** Protease, die die Spaltung von **NS2** und **NS3** katalysiert. Die Spaltung scheint zinkabhängig zu sein und es gibt Indizien, dass das zelluläre Chaperon **Hsp90** benötigt wird (Waxman *et al.*, 2001).

Unabhängig von der **NS2/3** Protease fungiert die **NS3/4A** Protease, die die Spaltung zwischen **NS3/4A**, **NS4A/4B**, **NS4B/5A** und **NS5A/5B** katalysiert. **NS3** ist ein bifunktionales Protein, das neben der Proteaseaktivität (aminoterminaler Domäne) noch eine Helikase/NTPase-Aktivität (carboxyterminale Domäne) besitzt. **NS3** kommt somit eine wichtige Funktion bei der RNA-Replikation zu.

NS4A ist der Cofaktor der **NS3/4A** Protease (s.o.).

NS4B induziert die Bildung eines speziellen Membran-Kompartiments, dem sog. „membranous web“ (Egger *et al.*, 2002; Gosert *et al.*, 2003), in dem die Formation der viralen Replikations-Komplexe stattfindet. Das „membranous web“ stammt wahrscheinlich von ER-Membranen ab, da zum einen die Translation am rauhen ER stattfindet, zum anderen alle **NS**-Proteine mit ER-Membranen assoziiert sind und das „membranous web“ meist in räumlicher Nähe zum ER liegt.

Die genaue Rolle des Phosphoproteins **NS5A** – das als phosphorylierte und hyperphosphorylierte Form vorliegen kann – ist bislang noch unklar. Zum einen wird eine Beteiligung an der **IFN- α** Resistenz diskutiert, zum anderen eine Funktion bei der RNA-Replikation. Für die Beteiligung an der Replikation spricht zum einen eine immense Ansammlung an Zellkultur adaptiven Mutationen in **NS5A**, zum anderen die Tatsache, dass bestimmte Mutationen die Replikation blockieren (N. Appel *et al.*, eingereicht zur Veröffentlichung). Weiterhin wurde eine direkte Interaktion mit **NS5B** (Shirota *et al.*, 2002), sowie eine Interaktion mit dem Protein **hVAP-A** (Tu *et al.*, 1999) beschrieben, das ebenfalls mit **NS5B** interagiert und eine Rolle bei der Bildung des Replikationskomplexes haben soll.

NS5B ist die RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RaRP) und somit das katalytische Zentrum des Replikationskomplexes. Der genaue Mechanismus der RNA-Replikation ist noch unklar. In vitro konnte gezeigt werden, dass die Polymerase die primer abhängige Initiation der RNA-Synthese bevorzugt, darüber hinaus aber auch in der Lage ist, de novo, also primer-unabhängig, RNA-Synthese zu initiieren (Luo *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000). Ob dies in vivo auch der Fall ist, ist nicht bekannt.

Fast alle **HCV** Proteine sind membran-assoziiert. Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht. Dieses Modell berücksichtigt allerdings weder Interaktionen der viralen Nichtstrukturproteine untereinander noch den Einbau zellulärer Proteine in den

Replikationskomplex oder die Tatsache, dass die virale RNA zumindest mit der NS3-Helikase und der NS5B-RaRP interagieren muss.

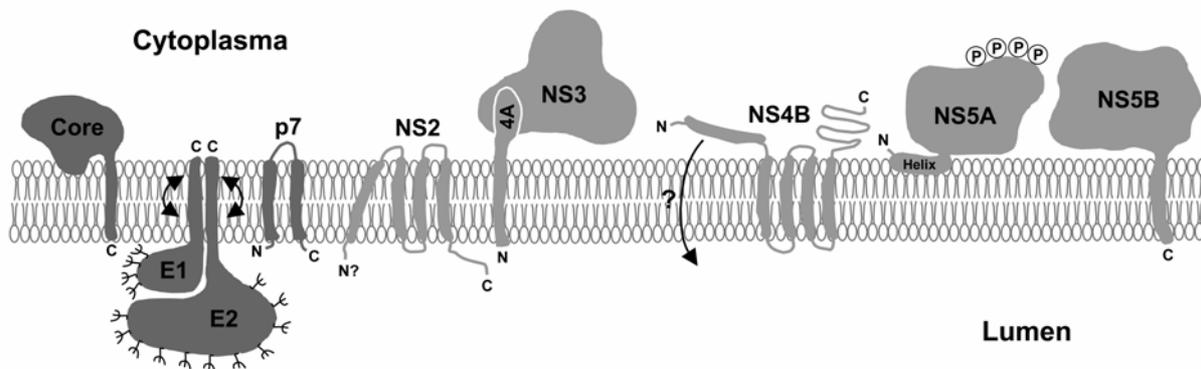


Abbildung 3: Membrantopologie der HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine. Gezeigt ist die N- und C-terminale Lokalisierung der Proteine relativ zum ER-Lumen [Abbildung entnommen aus Bartenschlager *et al.*, 2004].

1.4 Genotypen

Basierend auf Sequenzanalysen kann man HCV in 6 Genotypen einteilen, die sich untereinander in ihrer Nukleotidsequenz zwischen 31-34% unterscheiden (Pawlotsky 2003; Robertson *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 1993). Weiterhin können die Genotypen in verschiedene Subtypen unterteilt werden, deren Nukleotidsequenz um ca. 20% divergiert.

In West-Europa und den USA herrschen die Genotypen 1a und 1b vor, gefolgt von Infektionen mit Genotyp 2 und 3. Die anderen Genotypen sind eher selten in diesen Regionen. Genotyp 4 kommt vor allem im mittleren Osten vor, Genotyp 5 in Süd-Afrika und Genotyp 6 in Südostasien (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1993, Choo *et al.*, 1989)

1.5 Lebenszyklus des HCV

Da bis zum heutigen Zeitpunkt kein effizientes Zellkultursystem zum Studium von Viruspartikeln zur Verfügung steht, ist das folgende Modell in vielen Punkten eher hypothetischer Natur.

Das HCV ist ein umhülltes kugelförmiges Virus mit einem Durchmesser von 40-70nm (Kaito *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die Virushülle aus den viralen Glykoproteinen E1 und E2 besteht, die in Lipidmembranen eingebettet sind. Diese umgibt das Nukleokapsid, das aus vielen Kopien des Core-Proteins besteht und das virale RNA-Genom beinhaltet (Penin *et al.*, 2003).

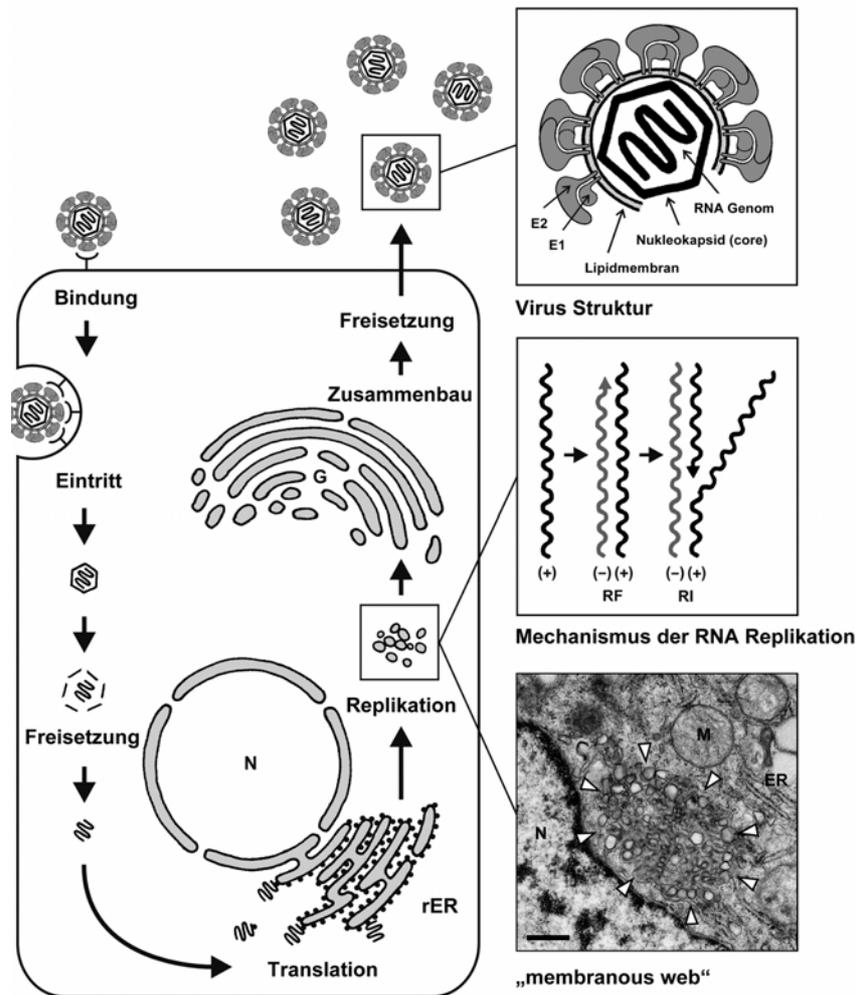


Abbildung 4: Hypothetischer HCV-Replikationszyklus. HCV Partikel binden an spezifische zelluläre Rezeptoren und gebundene Partikel werden durch Endozytose internalisiert. Nach Freisetzung des viralen Genoms und Translation der viralen Proteine bildet sich durch NS4B induziert das „membranous web“, der Ort der HCV RNA-Replikation. Die Plusstrang-RNA dient als Vorlage für die Synthese der Minusstrang-RNA, die mit der Plusstrang-RNA basenpaart und diese nun wiederum semikonservativ in einzelsträngige Plusstrang-RNA kopiert wird (RF = Replikative Form; RI = Replikatives Zwischenprodukt [engl. „replicative intermediate“]). Nach Amplifikation des Genoms und Expression viraler Proteine bilden sich neue Virionen, die über den konstitutiven sekretorischen Weg die Zelle verlassen [Abbildung entnommen aus Bartenschlager *et al.*, 2004].

Die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle beruht wahrscheinlich auf einer Rezeptor-vermittelten Endozytose. Es wird diskutiert, dass E2 durch Interaktion mit den zellulären Rezeptoren CD81 und/oder Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) oder – da HCV mit Lipoproteinen assoziiert ist – mit dem LDL-Rezeptor („low density lipoprotein receptor“) die Virusaufnahme vermittelt.

Nach der Freisetzung des HCV-Genoms kommt es am rauhen ER zur Synthese des viralen Polyproteins, die cap-unabhängig durch das IRES Element in der 5' NTR initiiert wird. Nach Spaltung des Polyproteins bilden insbesondere die Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B in Assoziation mit intrazellulären Membranvesikeln („membranous web“), deren

Bildung durch NS4B induziert wird sowie der viralen RNA und wahrscheinlich zellulären Faktoren einen Replikase-Komplex (Egger *et al.*, 2002). Die genomische Plusstrang-RNA dient als Vorlage für die Synthese der Minusstrang-RNA, die mit der Plusstrang-RNA basenpaart. Die doppelsträngige RNA, die sog. Replikative Form (RF), wird nun mehrmals semikonservativ in einzelsträngige Plusstrang-RNA kopiert. Auf diese Art und Weise kommt es zu einem 5-10-fachen Überschuss an Plusstrang-RNA gegenüber der Minusstrang-RNA. Die Plusstrang-RNA kann translatiert werden oder zur Synthese neuer RFs dienen oder in neue Viruspartikel eingebaut werden.

Die Partikelmorphogenese beginnt wahrscheinlich mit dem Zusammenbau des Nukleokapsids, bestehend aus Core-Proteinen und HCV-RNA. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass Core selbst die Knospung der viralen Nukleokapside in intrazelluläre Membranvesikel auslöst (Blanchard *et al.*, 2002), wodurch die Partikel eine membranöse Hülle mit den E-Proteinen erhalten. Die Viruspartikel werden wahrscheinlich über den konstitutiven Sekretionsweg aus der Zelle geschleust.

1.5 Das HCV-Replikonsystem

Erst seit 1999 gibt es ein effizientes Zellkultursystem für HCV, das auf der Transfektion der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh-7 mit selektionierbaren subgenomischen HCV-Molekülen beruht (Lohmann *et al.*, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass für verschiedene Plusstrang-RNA Viren (u.a. Flavi- und Pestiviren) bekannt war, dass die Strukturproteine für die Replikation nicht benötigt werden (Behrens *et al.*, 1998; Khromykh & Westaway, 1997; Liljestrom & Garoff, 1991), wurde der für die Strukturproteine kodierende Bereich deletiert und durch das Resistenzgen *neo*, das die Neomycin-Phosphotransferase kodiert, ersetzt. Da die HCV-IRES, unter dessen Kontrolle das *neo*-Gen steht, für die volle Aktivität noch einen Teil der für das Core-Protein-kodierenden Sequenz benötigt, wurden diese ersten 12 Kodons des ORF an das 5' Ende des *neo*-Gens fusioniert. Für die Translation der Nichtstrukturproteine von NS2 bzw. NS3 bis NS5B wurde ein zweites, heterologes IRES-Element (IRES des Encephalomyocarditis Virus; EMCV) eingesetzt. Sowohl die 5' NTR als auch die 3' NTR wurden als essentielle Bestandteile für die Translation bzw. Replikation unverändert beibehalten (s. Abb. 5).

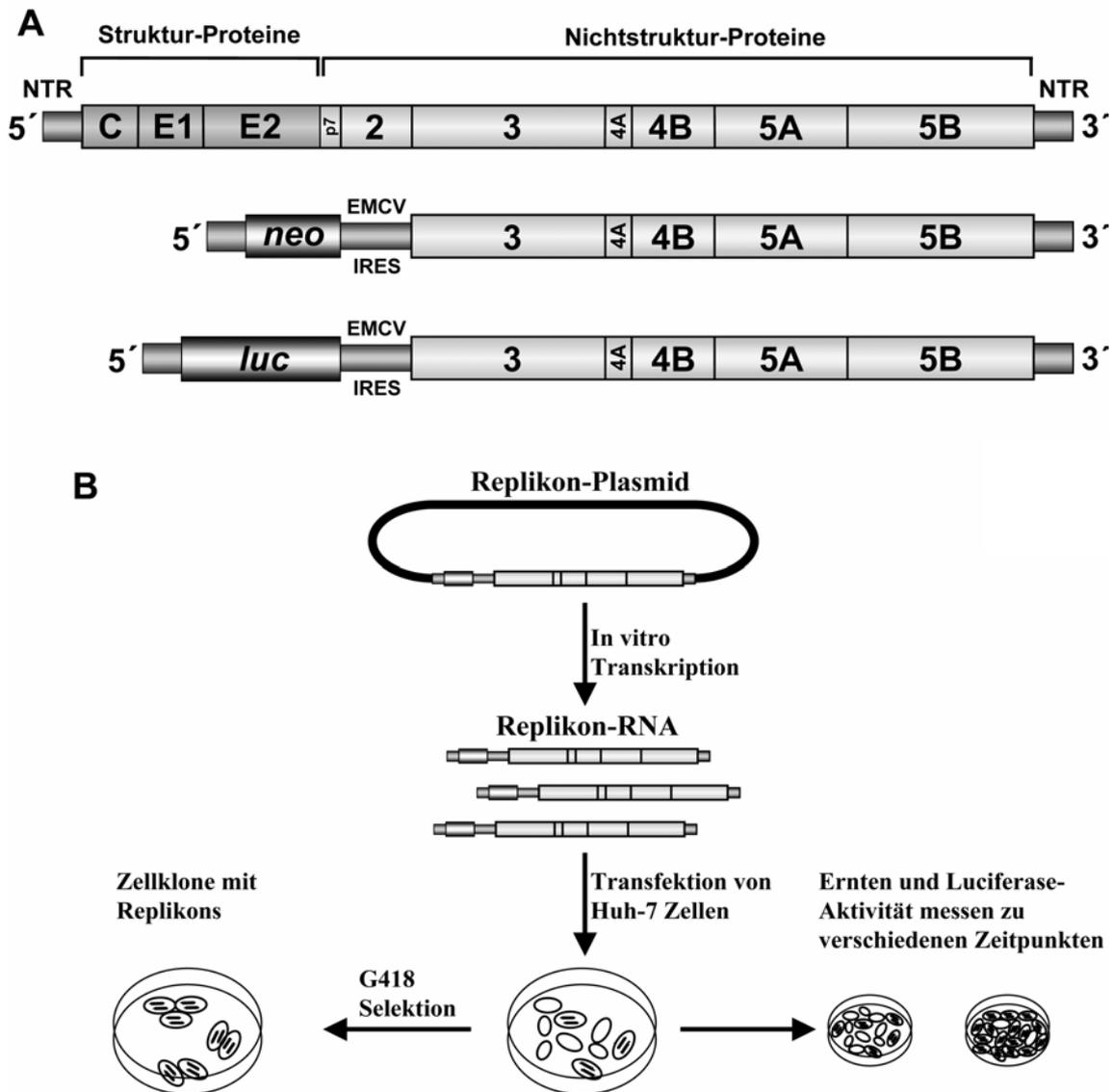


Abbildung 5: A) Vergleichende Darstellung des HCV Genoms mit den selektionierbaren (*neo*) und transienten (*luc*) subgenomischen Replikons (*neo* = Neomycin-Phosphotransferase-Gen, *luc* = Luziferasegen des Leuchtkäfers). B) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der HCV-Replikations-systeme. Oben dargestellt ist die Plasmid DNA, die mit *ScaI* linearisiert wurde. Nach in vitro Transkription und Aufreinigung der HCV-RNA wurden unterschiedliche Mengen dieser RNA in die Transfektion naiver Huh-7 Zellen eingesetzt. Zellen, die die Replikation der subgenomischen *neo*-RNAs unterstützen, bilden eine Resistenz gegen G418 aus und wachsen unter G418 Selektion zu resistenten Zellklonen aus (links). Im Falle der Luziferasereplikons wurde der Elektroporationsansatz auf mehrere Zellkulturschalen verteilt und jede Schale zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 24, 48, 72 usw Stunden) nach der Transfektion geerntet. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität im Lysat als Maß für die Replikation bestimmt.

Die Transfektion der mittels in vitro Transkription gewonnenen subgenomischen HCV-RNA erfolgte durch Elektroporation in Huh-7 Zellen. Durch das *neo*-Gen des Replikons wird Zellen, die die virale Replikation unterstützten, eine G418-Resistenz vermittelt. Zellen ohne HCV-RNA oder fehlender Replikation sterben unter der G418-Selektion ab. Auf diese Weise entstehen Zelllinien, in denen das Replikon unter G418-Selektion persistent repliziert. Die Anzahl G418-resistenter Kolonien, die nach Transfektion einer definierten Menge HCV-RNA

entsteht, wird als Koloniebildungskompetenz bezeichnet; sie wird ausgedrückt als „colony forming units“ pro μg RNA (cfu/ μg).

Aus den entstandenen Zelllinien wurde in ersten Versuchen die Gesamt-RNA präpariert und erneut in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Koloniebildungskompetenz der Gesamt-RNA höher war, als die der in vitro transkribierten Ursprungs-RNA. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Replikon-RNAs in den verschiedenen Zelllinien Mutationen besaßen, die die Koloniebildungskompetenz um mehrere Größenordnungen erhöhte. Die Ursache für das hohe Replikationsniveau ist vor allem im Auftreten adaptiver Mutationen in der HCV-Sequenz in selektierten Replikon-Zellklonen begründet (Blight *et al.*, 2000, Lohmann *et al.*, 2001, Krieger *et al.*, 2001), welche die Replikationseffizienz im Vergleich zu dem ursprünglich verwendeten Patientenisolat teilweise dramatisch steigern. Die Charakterisierung der Replikon-Klone, die für diese Arbeit verwendet wurden, ergaben für den Klon NK5.1 drei adaptive Mutationen (Aminosäureposition 1202 und 1280 in NS3 und Aminosäureposition 2197 in NS5A) und für den zur Zeit effizientesten Replikon-Klon ET die Kombination derselben NS3 Austausch mit einer Mutation in NS4B (Aminosäureposition 1846). Darüber hinaus spielt auch die Wirtszelle eine wichtige Rolle für eine effiziente Replikation. So konnten Replikon-Zellklone lange Zeit nur mit der humanen Hepatoma-Zelllinie Huh-7 generiert werden und selbst beim Vergleich verschiedener Passagen dieser Zelllinie zeigten sich signifikante Unterschiede in der Permissivität (Lohmann *et al.*, 2003).

Die Charakterisierung adaptierter HCV-Replikons mit hoher Koloniebildungskompetenz war die Voraussetzung zur Etablierung eines transienten Replikationssystems. Dieses beruht auf dem Austausch des *neo*-Gens gegen das Reporter-gen Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (s. Abbildung 5). Da jede HCV-RNA in der Zelle direkt als mRNA fungiert, spiegelt die gemessene Luziferase-Aktivität (gleichbedeutend mit der Luziferasegenexpression) die Replikation der HCV-RNAs wieder. Durch Bestimmung verschiedener Zeitwerte (4-96h nach der Transfektion) kann der Verlauf der RNA-Replikation verfolgt werden. Damit war es möglich, die Replikation in nicht-selektionierbaren Zellen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikationseffizienz in direktem Zusammenhang zur Koloniebildungskompetenz steht (N. Krieger, 2001).

1.7 Themenstellung

Neben der umfassenden Protein-Maschinerie, die die virale RNA-Vermehrung katalysiert, spielen Strukturen auf RNA-Ebene, sog. cis-aktive RNA-Elemente [engl. „cis acting RNA elements“ (CREs)], eine wichtige Rolle. Solche Elemente können sich an verschiedenen Positionen im RNA-Genom befinden, sind jedoch in den meisten Fällen in den terminalen NTRs lokalisiert. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung solcher Elemente sowohl in den NTRs als auch in der kodierenden Region des HCV-Genoms.

Die HCV 5' NTR umfasst die ersten 341 Nukleotide und sie besitzt ein IRES-Element, das eine cap-unabhängige Translation erlaubt. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die ersten 35-40 Nukleotide nicht für die IRES-Funktion benötigt werden (Honda *et al.*, 1996; Rijnbrand *et al.*, 1995; Yoo *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1999). In Anlehnung an BVDV wurde vermutet, dass diese 5' terminalen Nukleotide eine Rolle bei der RNA-Replikation des HCV spielen. Um detaillierte Deletionsstudien im Bereich der 5' terminalen Nukleotiden durchführen zu können, mussten zuerst chimärer IRES-Elemente hergestellt werden. Dies war notwendig, weil Mutationen in der HCV 5' NTR Einfluss auf die IRES-Funktion haben könnten. Somit musste die Translationsfunktion der HCV-IRES genetisch von einer möglichen Funktion als CRE getrennt werden. Darauf aufbauend sollten die 5' cis-aktiven Replikationselemente untersucht werden.

Die 3' NTR von HCV weist eine dreigeteilte Struktur auf: eine variable Sequenz, einen polyU/UC-Bereich und die sogenannte X-Sequenz. HCV-Genome ohne variable Region sind im Schimpansen infektiös (Yanagi *et al.*, 1999). Demgegenüber sind HCV-RNAs ohne polyU/UC-Bereich sowie ohne die 3' terminale X-Sequenz nicht mehr infektiös im Schimpansen (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte mit Hilfe des Replikonsystems eine detaillierte und quantitative Analyse der Elemente in der 3' NTR durchgeführt werden. Ferner sollte geklärt werden, ob die 3' NTR Einfluss auf die Translationsaktivität der 5' NTR ausübt.

Weiterhin wurden im Laufe dieser Arbeit zwischen verschiedenen Genotypen konservierte RNA-Strukturen innerhalb des ORFs vorhergesagt, deren funktionelle Eigenschaften hinsichtlich der RNA-Replikation näher charakterisiert werden sollten. Besonderes Augenmerk galt dabei Strukturen in der NS5B-kodierenden Region.

2. Materialien & Methoden

Die im Rahmen dieses Material- und Methoden-Teils beschriebenen Zentrifugationsschritte ohne Angabe des Rotors beziehen sich auf Arbeiten mit einer Tischzentrifuge (z. B. Eppendorf 5417) bei Raumtemperatur. Enzymatische Reaktionen wie Restriktionsverdau wurden nach Angaben der Hersteller durchgeführt und können in den jeweiligen Firmenkatalogen nachgelesen werden (vor allem New England Biolabs, Schwalbach; Boehringer Mannheim; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Amersham, Braunschweig).

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

Bakterien

E. coli Sure (Stratagene, Heidelberg): $e14(McrA^-)$ $\lambda(mrcCB-hsdSMR-mrr)171$ $endA1$ $supE44$ $thi-1$ $gyrA96$ $relA1$ lac $recB$ $recJ$ $sbcC$ $umuC::Tn5(Kan^r)$ $uvrC$ [F' proAB $lacI^q\Delta M15$ $Tn10$ (Tet^r)]; **E. coli DH5 α** : F' $endA1$ $hsdR17A(r_k^-m_k^+)$ $supE44$ $thi-1$ $recA1$ $gyrA$ (Nal^r) $relA1$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$ $deoR(\phi 80dlac \Delta(lacZ)M15)$

Säugerzellen

Huh7: humane Hepatoma Zelllinie

2.1.2 Medien

Bakterien

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l Medium; Ampicillin wurde in einer Konzentration von 50-100 μ g/ml zugesetzt. Zur Verfestigung kann jedem Flüssigmedium 1,5% Agar-Agar zugesetzt werden.

Säugerzellen

Standardmedium (DMEM⁺): 400 ml DMEM (Gibco-BRL, Eggenstein, Nr. 41965-039) wurden ergänzt mit 45 ml FKS (Seromed, Berlin, 30 Min. bei 56°C inaktivieren), 5 ml Glutamin (100 mM, Seromed), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 Einheiten/ml Penicillin, 10000 μ g/ml Streptomycin, Seromed) und 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100fach, Seromed)

Selektionsmedium für Replikon-Zelllinien: DMEM cpl; 0,5-1 mg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen)

2.1.3 Vektoren

Die Konstrukte, die im Rahmen der Doktorarbeit hergestellt wurden, einschließlich der Klonierungsstrategie, sind im Appendix aufgeführt.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Acrylamid Stammlösung 30%: Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1; filtriert und entgast

Auftragspuffer für RNA-Formaldehydgel: 50% (v/v) Glycerol; 0,25mg/ml Bromphenolblau; 0,25mg/ml Xylencyanol; 1 mM EDTA (pH 8,0)

Auftragspuffer DNA: 1 mg/ml Bromphenolblau; 2 mg/ml Xylencyanol; 1mM EDTA; 50% Saccharose

Auftragspuffer-Glyoxal: 0,25 mg/ml Bromphenolblau; 0,25 mg/ml Xylencyanol; 10 mM NaPO₄ pH 7,0; 50% (v/v) Glycerol

Coomassie-Färbelösung: 0,6 g/l Coomassie Brilliant Blau R250 (Serva) in 50% Methanol; 10% Essigsäure

Cytomix: 120 mM KCl; 0,15 mM CaCl₂; 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6); 25 mM Hepes (pH 7,6); 2 mM EGTA; 5 mM MgCl₂; der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt; vor Gebrauch wurde der Lösung 2 mM ATP (pH 7,6 titrieren mit KOH); 5 mM Glutathion und 1,25% DMSO zugesetzt

Glyoxal-Auftragspuffer: 0,25 mg/ml Bromphenolblau; 0,25 mg/ml Xylencyanol; 10 mM NaPO₄ pH 7,0; 50% (v/v) Glycerol

Guanidin-Lösung: 4 M Guanidin Thiocyanat; 25 mM Natriumcitrat; 0,5% Sarcosyl. 0,1 M 2-β-Mercaptoethanol (70µl auf 10 ml Lösung) vor Gebrauch zugeben, danach ist die Lösung einen Monat haltbar

Hybridisierungslösung: 5xSSC; 5xDenhardtösung; 50% (w/v) Formamid; 1% (w/v) SDS; die Lösung wird nach Zugabe von 100 µg/ml Lachssperma-DNA als Prähybridisierungslösung verwendet

Luziferase Lysepuffer: 1% Triton-x-100; 25 mM Glycyl-Glycin (pH 7,8); 15 mM Magnesiumsulfat; 4 mM EGTA; bei 4°C lagern; vor Gebrauch 1 mM DTT frisch zusetzen

Luziferase Assaypuffer: 25 mM Glycyl-Glycin (pH 7,8); 15 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH7,8); 15 mM Magnesiumsulfat; 4 mM EGTA; vor Gebrauch 1 mM DTT und 2 mM ATP frisch zusetzen

Luziferase Substratlösung: 1mM Luziferinlösung in 25mM Glycyl-Glycin-Lösung 1:5 mit 25 mM Glycyl-Glycin-Lösung verdünnen

Methylenblau: 0,03% Methylenblau; 0,3 M NaAc; pH 5,2

Mops-Puffer (10fach): 0,4 M Mops (pH 7); 0,1 M NaAc; 0,01M EDTA; pH mit NaOH eingestellt

PBS (10fach): 80 mM Di-Natriumhydrogenphosphat; 20 mM Natrium-di-Hydrogenphosphat; 1,4 M NaCl

PCR-Puffer (10fach): 100 mM Tris/HCl (pH 8,3); 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01% Gelatine

Protein-Probenpuffer: 200 mM Tris/HCl (pH8,8); 5 mM EDTA; 0,1%Bromphenolblau; 10% Saccharose; wenn nicht anders vermerkt vor Gebrauch 3% SDS und 2% β-ME zusetzen

Sammelgel-Puffer: 1M Tris/ HCl pH 6,8; 0,8% SDS

SSC (20fach): 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat

TAE (40fach): 193,82 g Tris-OH; 65,62 g NaAc; 29,78 g EDTA in Wasser lösen; pH mit ca. 50 ml Essigsäure auf 8,3 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen

TBE (10fach): 250 mM Tris-OH; 55 g Borsäure; 8,3 g EDTA in einem Gesamtvolumen von 1l lösen

TE: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

TGS (10fach): 250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS

Thermo-Pol-Puffer (10fach): 100 mM Tris/Cl (pH 8,3); 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,01% Gelatine

Transkriptionspuffer RRL (5fach): 400 mM Hepes (pH 7,5); 60 mM Magnesiumchlorid; 10 mM Spermidin; 200 mM DTT

Translations-Mix (HeLa-extrakt): 8mM ATP; 0,48mM GTP; 80mM Creatin-Phosphat; ; 1/50 Vol. Creatin-Phosphat-Kinase (CPK; sigma; 10mg/ml 10mM Puffer); 152mM K-Hepes (pH7,6); 16mM DTT; 1/50 Vol. Calf-liver tRNA (Boehringer, 10mg/ml); 0,1mM Aminosäuremischung ohne Methionin; 2mM Spermidin

Translations-Master-Mix(HeLa-Extrakt): 0,56Vol Micrococcus Nuclease behandelte HeLa extracts; 0,188Vol Translations-Mix; 165mM KAc; 0,56mM MgAc; 1,2mM MgCl₂; 0,09Vol 35-S methionine

Trenngel-Puffer: 1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,4%SDS

Western blot Blockpuffer: 1x PBS; 0,5% (w/v) Tween 20; 2% Milchpulver

Western blot Semi-dry-Puffer: 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,00375% SDS; 20% Methanol

Western blot Tankblotpuffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% Methanol; bei 4°C lagern

Western blot Waschpuffer: 1x PBS; 0,5% (w/v) Tween 20

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid DNA aus Kleinkulturen

Kleinpräparationen von Plasmid-DNA wurden mit „NucleoSpin-Säulen“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers mit geringen Modifikationen durchgeführt.

Das Bakterienpellet aus 6ml Übernachtskultur (dreimalige Zentrifugation je 2 Min./6000upm) wurde sorgfältig in 250µl Puffer A1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250µl Puffer A2 (NaOH/SDS) und vorsichtigem Mischen wurden die Zellen durch 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 300µl Neutralisations-Puffer A3 und 5 Min. auf Eis wurde das Lysat 10 Min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine „NucleoSpin-Säule“ übertragen und 60 Sek. bei 8000 g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 500µl Puffer AW und schließlich ein Waschschrte mit 750µl Puffer A4. Anschließend wurde ein weiterer Zentrifugationsschrte zur Trocknung der Matrix durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 100µl 5mM Tris/HCL, pH 8,5 eluiert. Um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhöhen, konnte die Elution in zwei Zentrifugationsschritten durchgeführt werden. DNA Ausbeuten lagen dabei um 10µg.

Da die Kapazität der Nucleospin-Säulen nach Angaben des Herstellers 40µg betrug, wurde das Kulturvolumen zur Präparation größerer Mengen DNA auf 80ml erhöht. Die Volumina der Puffer A1, A2 und A3 wurden entsprechend angepaßt und der plasmidhaltige Überstand nach dem Neutralisationsschrte auf 2 Säulen verteilt, die mehrfach beladen wurden.

2.2.2 Präparation von Plasmid DNA aus Großkulturen

Großpräparationen von Plasmid-DNA wurden mit „Nucleobond AX 500-Säulen“ der Firma Macherey&Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bakterien aus 400-500 ml Übernachtskultur wurden durch 10 Min. Zentrifugation bei 8000 g (GS-3, 4°C) pelletiert und das Pellet in 12 ml Puffer S1 resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 12 ml Puffer S2 und 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S3 und weiteren 5 Min. auf Eis wurde das Lysat durch 45 minütige Zentrifugation bei 4°C, > 10000 g geklärt.

Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert und auf eine mit 5ml Puffer N2 äquilibrierte „NucleoBond-Säule“ gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 12 ml Puffer N3 gewaschen und anschließend bei geringerer Salzkonzentration und höherem pH-Wert in einem Volumen von 12 ml Puffer N5 eluiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gefällt und durch 30 Min. Zentrifugation bei 4°C, >15000 g pelletiert. Nach einem Waschschrte mit 70% Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und die DNA anschließend in 500µl TE gelöst.

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen wurde die Absorption bei 260, 280 und 320nm gemessen. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260nm, Proteine bei 280nm. Der Quotient der Absorption bei 260/ 280nm spiegelt die Reinheit der Nukleinsäuren wieder und beträgt für reine DNA 1,8-2. Die Absorption bei 320nm ist ein Zeichen für Schmutzpartikel in der Lösung oder unsaubere Küvetten.

DNA-Proben wurden in der Regel 1:20 mit Wasser, RNA-Proben 1:50 mit TE-Puffer verdünnt, wobei die Verdünnung so gewählt wurde, dass die Extinktion zwischen 0,1 und 1 lag. Der Extinktionskoeffizient für DNA-Messungen ist 50, für RNA-Messungen 40. Über das Lambert-Beersche Gesetz ($\text{Konz. Nukleinsäure } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * \epsilon * \text{Verdünnungsfaktor}$) konnte die Konzentration der Proben errechnet werden.

2.2.4 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen von DNA wurden mit verschiedenen Enzymen der Hersteller NEB (Schwalbach) und Böhlinger (Mannheim) durchgeführt. In Abhängigkeit von der DNA-Konzentration wurde das Volumen des Verdauansatzes gewählt ($\leq 0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Standard: $15\mu\text{l}$ analytische Verdau, präparative Verdau $100\mu\text{l}$). Es wurde je nach Enzym mit dem vom Hersteller empfohlenen 1x Reaktionspuffer gearbeitet und die Restriktionsansätze eine oder mehrere Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Eine Unit Restriktions-Endonukleaseaktivität ist vom Hersteller als die Menge an Enzym definiert, die notwendig ist um $1\mu\text{g}$ Substrat DNA (häufig λ -Bakteriophagen DNA) in einer Stunde vollständig zu verdauen. $1\mu\text{g}$ λ -DNA entspricht $1/32$ pmol. Um 1pmol λ -DNA mit einem Enzym, das einmal schneidet, in einer Stunde komplett zu verdauen, benötigt man 32 Units dieses Enzyms. Entsprechend benötigte man für den Verdau von 1pmol eines Plasmidmoleküls mit einer Schnittstelle dieses Enzym ebenfalls 32U. Trägt das Plasmidmolekül zwei Schnittstellen, so sind 64U Enzym notwendig.

2.2.5 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Zur Dephosphorylierung von DNA wurde „Shrimp Alkalische Phosphatase“ (Pharmacia; Freiburg) verwendet. $1\text{-}3\text{pmol}$ DNA wurden in 1-fach Reaktionspuffer mit einer unit SAP 30 Min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde hitzeinaktiviert (15 Min., 65°C) und die DNA entweder über ein präparatives Agarose-Gel oder mittels Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Für die Phosphorylierung von Oligonukleotiden ohne 5' Phosphatgruppe wurde Polynukleotidkinase (Amersham; Boehringer Mannheim) verwendet. Je nach Menge der DNA wurden Ansätze mit entsprechender Unit-Menge Enzym (nach Angaben des Herstellers) in 1-fach Reaktionspuffer 30 Min. bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung 5-10 Min. bei 65°C . Die Aufreinigung erfolgte mittels eines präparativen Agarose-Gels oder Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden).

2.2.6 Auffüllen und Entfernen überhängender DNA Enden

Bei Ligationen zwischen nicht kompatibler Enden mussten 5' überhängende Enden aufgefüllt bzw. 3' überhängende Enden restingiert werden. Hierzu wurde die DNA mit Klenow-Polymerase (pro μg DNA 1 unit Klenow) und $33\mu\text{M}$ dNTP-Mix in 1-fach Reaktionspuffer 15 Min. bei 25°C behandelt. Anschließend wurde das Enzym hitzeinaktiviert (20 Min., 75°C) und gegebenenfalls die DNA aufgereinigt.

Zum Auffüllen hybridisierter Oligonukleotide wurden je 100pmol Oligonukleotid annealt (5 Min. bei 65°C ; langsames Abkühlen; in 1-fach Klenow-Puffer) und nach Zugabe von 5 U Klenow-Polymerase und $250\mu\text{M}$ dNTPs $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Aufreinigung und Fällung von DNA

Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion. In der Regel wurde die DNA zweimal mit 1 Vol. TE gesättigtem Phenol und anschließend mit 1 Vol. Chloroform gemischt. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gefällt wurde die DNA durch Zugabe $1/10$ Vol. 3 M NaAc pH 6,0 und dem 2,5-fachen Vol. 100% Ethanol oder 0,7 Vol. Isopropanol. Bei der Ethanol-Fällung wurde die Probe ca. 30 Min. bei -70°C inkubiert; in beiden Fällen wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt (15 Min., 13000UpM). Die gefällte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in einem geeignetem Volumen Puffer oder Wasser gelöst.

2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-2,5% verwendet. Die entsprechende Menge Agarose (AGS, Heidelberg) wurde in 1-fach TAE-Puffer aufgekocht und auf 50-60°C abgekühlt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1µg/ml) wurde die noch flüssige Agarose in eine vorbereitete Gelkammer mit Kämmen gegossen. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 1/10 Vol. 10x Bromphenolblaumarker versetzt. Molekulargewichtsmarker der Firma MBI Fermentas (Lambda-DNA/ Eco130I/MluI bzw. Lambda-DNA/ Eco130I oder pUC19 DNA/MspI) dienten dazu, die Größe von DNA Fragmenten zu ermitteln. Die Elektrophorese analytischer Gele wurde horizontal in 1-fach TAE bei 5-10 V/cm durchgeführt. Präparative Gele wurden in vertikalen Gelapparaten ohne Zusatz von Ethidiumbromid durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte erst nach der Auftrennung.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese unter UV-Licht von 301nm sichtbar gemacht und mittels eines videogestützten Systems (Polaroid) dokumentiert.

2.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Qiaex II Gelextraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die dem gewünschten Fragment entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und je nach Gewicht mit mindestens 3 Vol. Puffer QX1 + 10µl QiaexII/5µg DNA gemischt. Nach 10 Min. schütteln bei 50°C wurde die verflüssigte Agarose zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte 30sec, 10000 Upm) und das Pellet in 500µl Puffer QX1 resuspendiert. Es folgten zwei Waschräume mit je 500µl Puffer PE. Danach wurde das Pellet mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe getrocknet und die DNA in 20µl Elutionspuffer, TE oder Tris pH 8,5 eluiert (je nach DNA-Fragment-Größe 5-10 Min. bei Raumtemperatur oder 50°C).

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

In eine Standard-Ligationsreaktion wurden 0,1pmol DNA des restringierten Vektors und 0,3pmol des gewünschten DNA-Fragments in einem Gesamtvolumen von 10µl in 1-fach Ligase Puffer (MBI-Fermentas) mit einer Einheit T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) 2h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz konnte direkt zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt werden.

2.2.11 Kompetenzinduktion von E. coli

Die Kompetenzinduktion von E.coli Zellen erfolgte durch die Behandlung mit CaCl₂. Hierzu wurden Bakterien einer Übernachtskultur 1:50 mit LB-Medium verdünnt und anschließend bis zu einer OD von 0,8-1 inkubiert. Eine OD von 0,8-1 entsprach der logarithmischen Wachstumsphase.

Alle weiteren Schritte mussten bei 4°C (oder auf Eis) durchgeführt werden. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (GS-3, 6000 UpM, 10 Min., 4°C) und die Zellen in einem Kulturvolumen 0,1 M MgCl₂ resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in einem Kulturvolumen 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Es folgte eine 30 Min. Inkubation auf Eis und ein Zentrifugationsschritt (GS-3, 6000 UpM, 5 Min., 4°C). Das Pellet wurde in 1/10 Kulturvolumen 0,1 M CaCl₂ mit 15% Glycerol resuspendiert, die Zellen anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gelagert wurden die Aliquots bei -70°C.

2.2.12 Transformation von E. coli

Zur Transformation wurden 200µl kompetente E.coli Zellen mit Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz vermischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 2 Min. bei 42°C, darauf folgten 5 Min. Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 800µl LB-Medium wurden die Bakterien 20-30 Min. bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert (2 Min. 6000 UpM), und der Überstand dekantiert. Zellen im verbleibenden Mediumrest von ungefähr 100µl wurden resuspendiert und auf LB-Agar mit Antibiotikum ausplattiert.

2.2.13 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für eine Standard-PCR wurden folgende Bedingungen gewählt: 1-fach PCR-Puffer, 0,25mM dNTPs, je 1pmol/µl Oligonukleotid und 0,1-1µg Matrizen-DNA in einem Gesamtvolumen von 100µl, überschichtet mit ca. 50µl Mineralöl. Die Zugabe von 1µl Polymerase erfolgte nach dem ersten Denaturierungs-Schritt bei 95°C, 5 Min., während der ersten Hybridisierungsperiode von 5 Min. bei 42-59°C. Der erste Zyklus endete mit 5 Min. bei 72°C.

Es folgten 15-35 Zyklen mit folgendem Verlauf:

- thermische Denaturierung der Matrizen-DNA bei 95°C/ 0,5-1Min.
- Hybridisierung der Primer an ihre komplementären Bereiche (Temperatur je nach Primerlänge und GC-Gehalt; i.d.R. zwischen 42-59°C/ 0,5-1Min.)
- Extension: DNA-Synthese ausgehend vom freien 3' OH-Ende der Primer durch eine hitzestabile Polymerase bei 72°C (Syntheserate ~1kb/Min.).

Im letzten Zyklus erfolgte eine Verlängerung der Extensionszeit um 5 Min., der PCR-Ansatz wurde danach bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gelagert. Mit Hilfe der PCR konnten DNA-Bereiche auf das 10^8 - 10^{10} -fache angereichert werden. Alle mit Hilfe der PCR synthetisierten DNA-Fragmente mussten wegen der hohen Fehlerrate der Polymerase einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

2.2.14 Mutagenese-PCR

Die „überlappende PCR“ wurde eingesetzt, um einzelne Basen auszutauschen oder Deletionen in eine Sequenz einzufügen. Für jede Mutagenese benötigt man je einen Sense- und einen Antisense-Primer, die zueinander komplementär waren und beide die veränderte Sequenz trugen. Des Weiteren wurde je ein flankierender Primer stromabwärts bzw. –aufwärts der zu mutierenden Stelle benötigt. Im ersten Schritt wurden 2 getrennte PCR-Reaktionen (Standardprotokoll) durchgeführt. Dabei wurde für die eine der mutierte Sense-Primer und der flankierende stromabwärts Primer verwendet, für die andere der mutierte Antisense-Primer und der flankierende stromaufwärts Primer. Als Matrize diente ein Plasmid mit der zu mutierenden Sequenz. Die Produkte wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des Qiaex II Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. $\frac{1}{20}$ des Eluats wurde als Matrize in eine weitere PCR (Standardprotokoll) eingesetzt. Als Primer dienten diesmal die beiden flankierenden Oligonukleotide. In dieser dritten PCR konnten die beiden unabhängigen PCR-Produkte über die Sequenz der Mutagenese-Primer hybridisieren und durch die Polymerasen zu einem zusammenhängenden Produkt ergänzt werden. Über die flankierenden Primer konnte dann der gesamte Bereich amplifiziert werden.

2.2.15 Sequenzanalyse von DNA

In die Sequenzier-PCR wurden in der Regel zwischen 300 und 500 ng Plasmid-DNA, 5 pmol Primer (sense oder antisense), sowie 1,5 µl „Big Dye“ (ABI, Darmstadt) in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Der „Big Dye“ enthält alle weiteren für die Reaktion erforderlichen Komponenten. Die PCR lief nach folgendem Schema ab: (10 sec 96°C; 15 sec 55°C; 4 Min.; 60°C) x 30; ∞ 4°C.

Danach wurden die PCR-Produkte denaturiert und gereinigt: Dem Ansatz wurde 1 µl 20% SDS zugegeben, auf 100 µl Volumen mit Wasser aufgefüllt und 5 Min. bei 98°C inkubiert. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 20 µl 3 M NaAc pH 6, 80 µl Wasser und 500 µl 100% Ethanol gefällt und für 20-25 Min. bei 14000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 20 µl Formamid aufgenommen.

Die Elektrophorese fand in dem Sequenziergerät ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer der Firma ABI statt. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen „Vector NTI“ und „Chromas“.

2.2.16 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Präparation von RNA aus kultivierten Zellen wurde eine Modifikation der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet. Die Zellen einer 60 bzw. 100 mm Schale wurden mit 750 µl Guanidin-Lösung lysiert und die freiwerdende chromosomale DNA durch mehrfaches Pipettieren zerkleinert. Je 750 µl der lysierten Zellen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, zuerst mit $\frac{1}{10}$ Volumen (75 µl) 2 M NaAc pH 4,0, dann mit 1 Volumen (750 µl) wassergesättigtem Phenol und $\frac{1}{5}$

Volumen (150 µl) Chloroform gemischt. Nach 15 Min. auf Eis wurden die Phasen durch Zentrifugation (4°C, 10 Min., 13000 Upm) getrennt. Die Oberphase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, die enthaltene RNA durch Zusatz von 1 Volumen Isopropanol 30 Min. bei -20°C gefällt und pelletiert (4°C, 15 Min., 13000Upm). Das Pellet wurde 10-15 Min. in 75% Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen, luftgetrocknet, in 25 µl Wasser gelöst und bei -70°C gelagert.

2.2.17 Reverse-Transkription von RNA und Amplifikation von cDNA (RT-PCR)

Die reverse Transkription wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Durchschnittlich 1 µg zelluläre Gesamt-RNA und 50 pmol eines spezifischen Oligonukleotids werden 10 Min. bei 65°C denaturiert. Anschließend wird der Ansatz direkt auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu verhindern. Zu jedem Ansatz werden 4µl RT-Puffer, 2µl 100mM DTT, 2µl 10 mM Na-dNTP und 0,5µl RNasin (1 U/µl) gegeben. Reverse Transkription wurde mit Hilfe des „Expand-RT“-Kit (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 20µl 1 Stunde bei 42°C durchgeführt. Unterschiedlich Mengen dieses Reaktionsansatzes wurden für die PCR mit dem „Expand Long Template PCR“-System (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 25µl eingesetzt. Hierzu wurden zwei Master-Mixe hergestellt (Master-Mix 1 bestehend aus 1,25µl 10mM dNTP; 6,25µl Wasser und spezifische Sense- und Antisense-Oligonukleotide. Master-Mix 2 bestehend aus 2,5µl 10 x Expand™ Long Template PCR-Puffer 3; 0,75µl 25 mM MgCl₂; 8,75µl Wasser und 0,5µl Expand™ Long Template-Polymerase-Mix). 9,5µl Master-Mix 1 und 12,5µl Master-Mix 2 wurden mit der Matrizen-DNA gemischt und initial 2 Min. bei 94°C denaturiert. Dann folgten 30 Zyklen 10 Sek. 94°C, 90 Sek. 54°C und 540 Sek. 68°C; gefolgt von 10 Min bei 68°C.

2.2.18 In vitro Transkription

Zur Herstellung von „run off“ Transkripten wurden i.d.R. 5µg Plasmid DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Soweit nicht anders beschrieben, wurde zuerst eine Restriktion mit 15u AseI und anschließend mit 30u ScaI durchgeführt. Vor der Transkription wurde die DNA zweimal mit TE- gesättigtem Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert, die Oberphase jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zusatz von 1/10 Vol. NaAc mit 2,5 Vol. Ethanol mind. 15 Min. bei -70°C gefällt. Durch Zentrifugation 15 Min. bei 13000 UpM wurde die DNA pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 40µl Wasser gelöst.

Der Reaktionsansatz für die Transkription wurde bei Raumtemperatur angesetzt. Für einen Ansatz mit 100µl Gesamtvolumen wurden 20µl 5x Transkriptionspuffer RRL; 12,5 µl 25mM NTPs, 2,5µl RNasin (Promega; 1u/µl Endkonzentration), 40µl DNA, 25µl H₂O und 4µl T7-RNA-Polymerase (15U/µl; Promega; Mannheim) eingesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurden 2µl T7-RNA-Polymerase zugegeben und der Ansatz weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 7,5µl RNase freie RQ1-DNase (1U/µl; Promega) zerstört. Nach Zugabe von 60µl 2M NaAc pH 4,5 wurde der Ansatz auf 600µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt, mit 2/3 Vol. saurem Phenol gemischt, 10 Min. auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (10 Min., 13000 UpM, 4°C). Nach der Extraktion der Oberphase mit Chloroform wurden die RNA-Transkripte durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol und 15 Min. Zentrifugation bei 13000 UpM (Raumtemperatur) gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und im Transkriptionsvolumen, d.h. 100µl Wasser gelöst. Die Reaktion lieferte etwa 0,5-1 µg/µl in vitro transkribierter RNA. Die quantitative Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch, zur qualitativen Analyse der Transkripte wurde eine RNA-Formaldehyd-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.19 RNA-Formaldehyd-Gelelektrophorese

In vitro transkribierte RNA wurde durch Elektrophorese in 1% Formaldehyd-Gelen qualitativ analysiert. Hierzu wurde 1g Agarose und 72g Wasser eingewogen, die Agarose durch Aufkochen gelöst und die Gellösung auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 10ml 10xMOPS-Puffer und 18 ml 12,3M Formaldehyd dazugegeben und das Gel in eine vorbereitete Kammer gegossen.

4µl in vitro transkribierte RNA wurden mit 2,5µl 10xMOPS-Puffer, 4,5µl 12,3 M Formaldehyd und 12,5µl Formamid gemischt und 15 Min. bei 55°C inkubiert. Nachdem der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde er mit 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, mit 5µl RNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in 1x Mops-Puffer bei 5V/cm statt.

2.2.20 RNA-Transfektion und Passage der transfizierten Zellen

Die Transfektion von in vitro Transkripten in Huh-7 Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Huh-7 Zellen wurden hierzu 1x mit PBS gewaschen, mit Trypsin/ EDTA abgelöst und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in Cytomix resuspendiert. Die gewünschte Menge RNA und 10µg Huh-7 Gesamt-RNA bzw. tRNA aus Kalbsleber wurde mit 400µl der Huh-7 Zellsuspension gemischt, in eine Elektroporationsküvette (0,4cm Spaltbreite, BioRad, München) überführt und mit einem Gene-Pulser (BioRad, München) bei 960µF und 270V elektroporiert. Die Pulsdauer sollte dabei etwa 20ms betragen. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in 8-10ml komplettem Medium aufgenommen und ausplattiert.

In Abhängigkeit vom jeweiligen Transfektionsexperiment wurde die gesamte Zellsuspension auf eine 10 cm Schale ausplattiert (Neomycin-Phosphotransferase-Replikons) oder je 3x2ml und 2x1ml des Ansatzes auf 35mm Schalen ausplattiert (Luziferase-Replikons).

Bei Transfektionsexperimenten mit Resistenz-Replikons wurden 4h nach der Elektroporation ein Mediumwechsel mit komplettem Medium inklusive 500µg/ml G418 (Gibco, Eggenstein) durchgeführt. Einmal wöchentlich musste das G418-haltige Medium erneuert werden, die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von 3-4 Wochen bis zum Auftreten makroskopisch sichtbarer Kolonien.

Bei Transfektionsansätzen mit Reporterreplikons (Luziferase-Replikons) wurden die 35mm Schalen mit 2ml Zellsuspension nach 4, 24 und 48 Stunden zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität geerntet, die Ansätze mit 1ml Elektroporationansatz nach 72 bzw. 96 Stunden.

2.2.21 Luziferase-Aktivitätsbestimmung

Zur Aktivitätsbestimmung der Leuchtkäfer-Luziferase wurden die Zellen jeder 35mm Kulturschale 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis in 350µl Lysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde zentrifugiert (3 Min., 13000g, 4°C) und vorsichtig mit einer Pipette durchmischt. 100µl des Lysats wurden in ein Luminometer-Röhrchen mit 360µl Assay-Puffer gemischt und ins Luminometer gegeben (Berthold). Nach Injektion von 200µl 200µM Luciferinlösung wurde die Freisetzung von Photonen infolge der Substratumsetzung durch die Luziferase nach 20 sek. gemessen.

Die Aktivität der Renilla-Luziferase wurde mit Hilfe des „Dual-Luziferase Reporter Assay System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers gemessen.

2.2.22 In vitro Translation

Die in vitro Translation wurde im HeLa-Zellextrakt durchgeführt. Zur Durchführung wurden 4,5µl in vitro transkribierter RNA (~0,5µg) mit 8µl Master-Mix (bestehend aus 75µl HeLa Extract, 11µl 2M KAc, 1,5µl 50 mM MgAc, 6µl 30 mM MgCl₂, 15 µl ³⁵S-Protein gelabelt Mix (NEN Life Science, Köln, Deutschland) und 25µl Translationspuffer/ TB (40µl 100mM ATP, 6µl 40mM GTP, 40µl 1 M Kreatinphosphate (Sigma), 10µl Kreatin-Phosphokinase (10mg/ml; Sigma), 76µl 1M Hepes-Puffer (pH 7,6), 80µl 100 mM DTT, 20µl Kalbsleber tRNA (5mg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland), 50µl 1mM Aminosäuren-Mix ohne Methionin (Promega), 10µl 100mM Spermidin (Sigma) und 168µl RNase freies Wasser)). Nach Inkubation von 14-16 Stunden bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Proteinproben-Puffer abgestoppt und 5 Min. bei 95°C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

Für in vitro Translationen in Huh-7 Zellextrakten wurden 0,5µl RNA (0,5µg) mit 16,5µl Zellextrakt, 3,5µl TB, 1µl ³⁵S-Protein gelabelter Mix, 0,5µl RNasin (40U/µl) und 3µl Salz-Mix (900 mM KAc, 7,3 mM MgCl₂, 3,3 mM Mg-Acetat) gemischt. Nach 2 Stunden bei 30°C wurde die Translation durch Zugabe von Proteinproben-Puffer abgestoppt und wie oben beschrieben weiter analysiert.

Für in vitro Translationen in Kaninchen-Reticulocyten-Lysate (RRT) wurden 1,75 µl RNA (~0,5 µg) mit 8,75 µl Lysate, 0,25 µl RNasin, 0,25 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin, 1,5 µl ³⁵S-Protein gelabelter Mix gemischt. Reaktionen wurden nach 1 Stunde Inkubation bei 30°C durch Zugabe von Proteinproben-Puffer abgestoppt und wie oben beschrieben weiter analysiert.

2.2.23 Glyoxal-Agarose-Gelelektrophorese

Eine Größenauftrennung von RNA, für z. B. die Analyse anhand eines Northern blots, erfolgte durch denaturierende Glyoxal-Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 1% Agarosegele in 10 mM NaPO₄ pH 7,0 hergestellt. Bei der Probenvorbereitung wurden bis zu 10 µg Gesamt-RNA in 10 µl Wasser mit 4,1 µl 100 mM NaPO₄ pH 7,0; 6 µl 6 M deionisiertem Glyoxal und 20,5 µl DMSO gemischt, 1h bei 50°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und mit 10,9 µl Glyoxal-Auftragspuffer versetzt. Zur Quantifizierung wurden Standards mit 10⁹, 10⁸ und 10⁷ Molekülen in vitro transkribierter Replikon-RNA verwendet. 25 µl jeder Probe wurden auf das Gel aufgetragen; die Elektrophorese wurde in 10 mM NaPO₄ pH 7,0 bei 4 Volt / cm Gel durchgeführt. Um den pH-Wert konstant zu halten, wurde der Puffer 5-10 Min. nach Beginn des Gellaufs bis zum Schluss der Elektrophorese mit Hilfe von Magnetrührern durchmischt.

2.2.24 Northern blot

Für Northernblot-Analysen wurde im Anschluss an eine Glyoxal-Agarose-Gelelektrophorese die RNA mit Hilfe eines Vakuum-Transfergerätes (Keutz, Gießen), durch 50 mM NaOH, unter 0,2 bar Druck 1 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond) übertragen. Die Membran wurde danach 1-2 h bei 80-90°C inkubiert und mit Methylenblau-Lösung gefärbt. Dadurch wurden die 18S und die 28S rRNAs sichtbar. Kurz unterhalb der 28S-rRNA-Bande wurde die Membran durchtrennt und die beiden Membranabschnitte, nach Entfärbung mit Wasser, in zwei Hybridisierungsflaschen mit Prähybridisierungslösung mindestens 15 Min. bei 58°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen Hybridisierungslösung ausgetauscht, die radioaktive Sonde zugegeben und die Membranen über Nacht bei 58°C hybridisiert. Der obere Membranabschnitt wurde mit einer HCV-spezifischen Sonde, der untere mit einer β-Actin-spezifischen Sonde hybridisiert, mit deren Hilfe eine Normierung der aufgetragenen RNA-Mengen möglich war. Der blot wurde nach der Hybridisierung zweimal mit 2x SSC, 0,1% SDS und einmal mit 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 58°C gewaschen und anschließend die Signale mittels Autoradiografie detektiert.

2.2.25 Synthese radioaktiv-markierter in vitro Transkripte

Ein Transkriptionsansatz zur Herstellung von Sonden für Northernblots enthielt 4 µl 5x Transkriptionspuffer (Promega); 2 µl 100 mM DTT; 0,5 µl rRNasin (Promega, 20U); je 1 mM ATP/UTP/GTP; 10 µM CTP; 0,5 µg DNA; 50 µCi α-[³²P]-CTP; 1 µl T7- oder T3-RNA-Polymerase (Promega, 40 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde zunächst 1h bei 37°C inkubiert, danach 1 U DNase RQ (Promega) zugegeben und weitere 30 Min. bei 37°C gehalten. Die Transkripte wurden direkt über NAP-5 Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in die Hybridisierung eingesetzt.

2.2.26 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Masse trennen. Aufgrund der Größe der zu untersuchenden Proteine wurden 11% Acrylamid-Gele verwendet. Für das Trenngel wurden 16,5ml 30%-Acrylamid-Stammlösung mit 11,25ml Trenngel-Puffer und 17,5ml Wasser gemischt. Nach Zugabe von 45µl Temed und der gleichen Menge gesättigter Ammonium-Persulfat-Lösung wurde die Gellösung in die vorbereitete Gelapparatur (Format 18 x 40cm) gegossen. Um eine glatte Oberkante zu erhalten wurde das Trenngel während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Für die Sammelgellösung wurden 3ml 30% Acrylamid-Stammlösung, 2,5ml Sammelgel-Puffer und 14,5ml

Wasser mit 20µl Temed und 40µl gesättigten APS gemischt, über das Trenngel gegossen und vorsichtig ein Kamm eingesetzt.

Zur Aufbereitung der Proben wurden diese mit Protein-Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95°C inkubiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts diente der „Prestained Protein Marker“ (NEB, Schwalbach). Die Elektrophorese fand in 1xTGS bei 45 mA statt. Die Proteingele wurden nach der Elektrophorese 20 Min. bei 60°C mit Coomassie-Lösung fixiert und gefärbt. Die Entfärbung wurde 20 Min. bei 60°C mit 5% Methanol/ 5% Essigsäure durchgeführt. Zur Analyse radioaktiver Proteine wurde das Trenngel getrocknet und die Signale mittels eines Phosphoimagers (Bas-2000, Fuji) und Autoradiographie detektiert

2.2.27 Western blot

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend das Sammelgel entfernt und das Trenngel auf eine erst mit Ethanol, dann mit Puffer benetzte PVDF-Membran aufgelegt. Der Transfer wurde entweder mit einer halbtrockenen Elektrotransfer-Apparatur oder einer Tankblot-Apparatur durchgeführt: Für den halbtrockenen Transfer wurden Filterpapiere und Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und wie folgt angeordnet: Anode – 2 Filterpapiere mit Semi-dry-Puffer – angefeuchtete Membran – Trenngel - 2 Filterpapiere mit Semi-dry-Puffer – Kathode. Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² Gel für 1 h.

Für die Tankblot-Apparatur wurde folgender Aufbau gewählt: Anode – Gitter – Vlies - 1 Filterpapier mit Tankblotpuffer – angefeuchtete Membran – Trenngel - 1 Filterpapier mit Tankblotpuffer – Vlies – Gitter – Kathode. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 14 V in Tankblotpuffer.

Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen und mindestens 1 h in Blockpuffer (1x PBS; 0,5% (w/v) Tween 20; 2% Milchpulver) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT mit dem in Blockpuffer entsprechend verdünntem Primär-Antikörper inkubiert, dreimal 5 Min. mit Waschpuffer (1x PBS; 0,5% (w/v) Tween 20) gewaschen und dann 1 h bei RT mit dem in Blockpuffer 1:10.000 verdünntem, Peroxidase-markiertem Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten erfolgte die Detektion mittels des ECL+ - Systems (Amersham). Hierzu wurde die Substratlösung nach Angaben des Herstellers angesetzt, auf die Membran aufgetropft und für 5 Min. bei RT inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit Röntgenfilmen detektiert.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, RNA-Bereiche in der 5' und 3' NTR sowie innerhalb des ORF des HCV zu kartieren, die für die RNA-Replikation von Bedeutung sind. Mutationen in den relevanten Regionen sollten durch Vergleich mit dem jeweiligen Ausgangsreplikon hinsichtlich ihrer Folgen für die Replikationsfähigkeit der entsprechenden RNA charakterisiert werden.

Zur Messung der Replikationskompetenz der verschiedenen RNAs wurden zwei verschiedene Meßsysteme genutzt:

1. Ein Replikon mit dem selektionierbaren Markergen *neo* (Abb. 5). Hierbei wurde die entstehende Koloniezahl nach Selektion mit G418 in Bezug gesetzt zur eingesetzten RNA-Menge und damit die Koloniebildungskompetenz in kolonieformenden Einheiten (cfu) pro μg RNA bestimmt. Veränderungen der Koloniebildungskompetenz dienten als Maß für die RNA-Replikation und gaben somit einen Hinweis auf die Bedeutung der mutierten Region für die Replikation. Als Positivkontrolle dienten Replikons mit unterschiedlichen adaptiven Mutationen die die RNA-Replikation maximal steigerten. Als Negativkontrolle wurde eine replikationsdefiziente Deletionsmutante eingesetzt, der 10 Aminosäuren im aktiven Zentrum der NS5B RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B fehlten ($\Delta 5\text{B}$ -Mutante). Selektionen wurden mit $500\mu\text{g/ml}$ G418 durchgeführt und nach 3-4 Wochen wurde die Anzahl aller G418-resistenter Kolonien durch Auszählen bestimmt.
2. Ein Replikonstrukt mit dem Gen, das für die Luziferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodierte (Abb. 5). Hierbei wurde die Luziferase-Expression in den Zelllysaten zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 4 und 96h nach der Elektroporation mittels eines enzymatischen Tests bestimmt und mit Referenzkonstrukten und Negativkontrollen verglichen. Die Luziferase-Expression korreliert dabei direkt mit der HCV-Replikation und diente als Maß für die Replikationseffizienz. Als Referenzkonstrukte wurden verschiedene adaptierte Replikons eingesetzt, die adaptive Mutationen in NS3 (E1280I, T1280I) und NS4B (K1846T) oder NS5A (S2197) trugen. Als Negativkontrolle wurde eine replikationsdefiziente RNA mitgeführt, die eine inaktivierende Punktmutation im Motiv C (GDD-Motiv) des aktiven Zentrums der RNA-abhängigen RNA-Polymerase besaß (Lohmann *et al.*, 1997). Sie wird im folgenden als GND-

Mutante bezeichnet. Die Luziferasemessungen erfolgte in den meisten Versuchen 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion. Der 4h-Wert spiegelt die Translation der transfizierten RNAs unabhängig von deren Replikation wieder und diente deshalb als Maß für die Transfektionseffizienz. Alle Werte wurden deshalb auf diesen 4 Stunden Wert normiert.

3.1 Kartierung der Replikationssignale in der 5' NTR

Das Genom des HCV besitzt am 5' Ende eine 341 Nukleotide lange NTR. Diese beinhaltet ein IRES-Element, das sich „downstream“ einer ca. 40 Nukleotide langen Sequenz mit unbekannter Funktion befindet (Abb. 6). IRES-Elemente wurden zuerst für das Poliovirus beschrieben, den Prototypen der Familie *Picornaviridae* (Pelletier & Sonenberg 1998). Ebenso wie das HCV kodiert das Genom des Poliovirus ein großes Polyprotein, das cap-unabhängig translatiert wird. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Nukleotide am äußersten 5' Ende nicht für die IRES-Funktion benötigt werden. Vielmehr bestätigten genetische Untersuchungen, dass dieser Bereich essentiell und ausreichend für die Replikation ist. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch Sequenzen innerhalb der IRES Einfluss auf die RNA-Vermehrung haben.

Die IRES-Elemente von HCV und Poliovirus unterscheiden sich sowohl funktionell (Pestova *et al.*, 1998, Meerovitch *et al.*, 1991, Lukavsky *et al.*, 2000) als auch hinsichtlich ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen (Lemon & Honda 1997). Die HCV 5' NTR kann in vier Domänen eingeteilt werden (Abb. 6). Stemloop I wird aus den Nukleotiden 5-20 gebildet. Er ist nicht essentiell für die IRES-Aktivität, spielt jedoch eine mögliche regulatorische Rolle bei der Translation (Honda *et al.*, 1996, Kamoshita *et al.*, 1997, Rijnbrand *et al.*, 1995,1997). Stemloop II scheint nach neusten Erkenntnissen strukturelle Veränderungen an der 40S Untereinheit auszulösen (Kim *et al.*, 2002, Spahn *et al.*, 2001) und die Translation zu verstärken (Rijnbrand *et al.*, 1995, Reynolds *et al.*, 1996, Honda *et al.*, 1996, Fukushi *et al.*, 1994). Das Kernstück der IRES ist Stemloop III. Diese Domäne erlaubt die direkte Bindung der 40S Untereinheit – in Abwesenheit zusätzlicher Initiationsfaktoren – und die Positionierung des AUG-Startcodons an den Peptidyl-Ort (P-Ort) des Ribosoms. Bereiche um den Stemloop IIIb binden den eukaryotischen Initiationsfaktor 3 (eIF3), der essentiell für die Anlagerung der 60S Untereinheit ist.

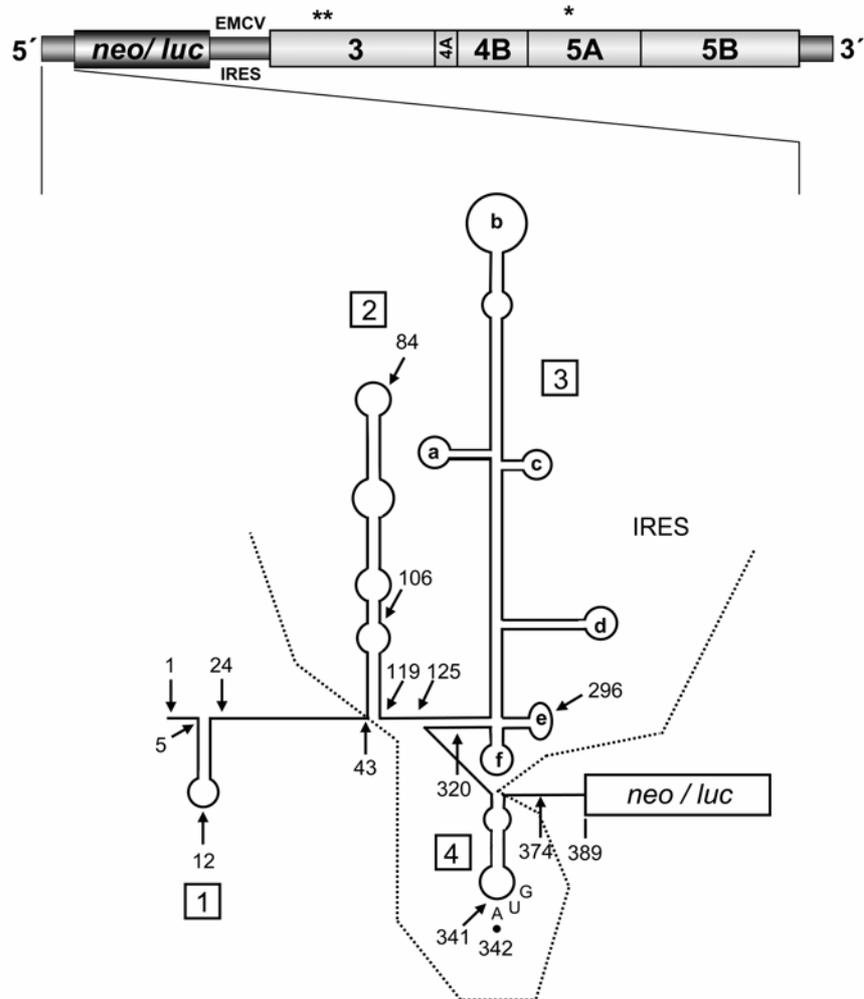


Abbildung 6: Oben: schematische Darstellung des Ausgangsreplikons. Die 5' NTR ist durch eine dicke Linie angedeutet und befindet sich entweder „upstream“ des Gens für die Neomycin-Phosphotransferase oder der Leuchtkäfer-Luziferase. Die Translation der Nichtstrukturproteine NS3-NS5B, die am 3' Ende von der 3' NTR (dicke Linie) flankiert sind, wird durch die EMCV-IRES vermittelt. Die Positionen der Zellkultur adaptiven Austausche sind durch „**“ angedeutet. Unten: Schematische Darstellung der Sekundär-Strukturen der 5' NTR (nach Honda et al., 1999). Die umrahmten Zahlen bezeichnen die Stenloops 1-4. Die Grenzen der IRES sind durch die gestrichelte Linie angedeutet. Die Pfeile deuten die 3' Enden der hier getesteten Deletionsmutanten in der 5' NTR an (s. Text). Das Startkodon befindet sich an Position 342 und ist mit einem Punkt markiert.

Während die Rolle der 5' NTR für die Translation im Detail untersucht wurde, ist der Einfluss auf die RNA-Replikation nicht charakterisiert.

Das Wissen über die Minimalstrukturen, die für die Replikation des Poliovirus benötigt werden (s.o.) und dass für die RNA-Replikation des Pestivirus BVDV zwei 5' terminale Hairpins eine entscheidende Rolle spielen (Frolov *et al.*, 1998), ließ annehmen, dass zumindest das äußerste 5' Ende der HCV 5' NTR für die Initiation der Replikation von Bedeutung ist. Zudem wurde neben der Bindung von Proteinen, die an der Translation beteiligt sind, auch die Bindung von Proteinen beschrieben, die möglicherweise eine Rolle bei der Replikation spielen. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war eine genaue Kartierung der

Domänen in der 5' NTR, die in den Replikationsprozeß involviert sind. Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden zumeist mit dem Ausgangsreplikon NK5.1 durchgeführt, das zwei adaptive Austausche in NS3 und einen in NS5A besitzt. Abweichungen davon sind im Text angegeben.

3.1.1 Rolle von Sequenzen „upstream“ der IRES für die RNA-Replikation

Die Tatsache, dass die ersten 40 Nukleotide nicht für die IRES-Aktivität und damit für die Translation benötigt werden sowie deren 5' proximale Lage und die Konserviertheit der RNA-Struktur von Domäne I, legte den Verdacht nahe, dass diese Region eine wichtige Rolle für die Replikation spielt.

Stemloop I bildet sich aus den Nukleotiden 5-20 und wird durch eine 23 Nukleotide lange Sequenz von Stemloop II getrennt. Um den Einfluss dieses Bereiches auf die Replikation zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte generiert. Bei dem Konstrukt NK5.1-del 5-20 („del5-20“) wurde der Stemloop I deletiert, bei NK5.1-del 24-40 („del24-40“) wurde die Verbindungssequenz zwischen Stemloop I und II entfernt (Abb. 7A). Beide Deletionen wurden sowohl in ein selektionierbares *neo*-Replikon als auch ein Luziferase-Replikon eingeführt.

Um einen möglichen Einfluss dieser beiden Mutationen auf die IRES-Aktivität zu überprüfen, wurden die *neo*-RNAs in *in vitro* Translationen mit radioaktivem ³⁵S- Methionin eingesetzt. Es war bekannt, dass IRES Elemente unterschiedlich aktiv in verschiedenen Zellextrakten sein können. Um einen Einfluss des Zellextrakts auf die Translationen auszuschließen, wurden die Untersuchungen in drei verschiedenen Extrakten (HeLa, Huh-7, Retikulozytenlysat von Kaninchen) durchgeführt. Aufgrund des bicistronischen Aufbaus des Replikons steht die Translation des ersten Cistrons (Neomycin-Phosphotransferase) unter der Kontrolle der HCV-IRES und die des zweiten Cistrons (NS3-5B) unter der Kontrolle der EMCV-IRES. Es war anzunehmen, dass die Translation des zweiten Cistrons nicht durch Mutationen in der HCV 5' NTR beeinflusst wurden und somit NS3 als interner Mengenstandard dienen konnte. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels SDS-Page und Autoradiographie.

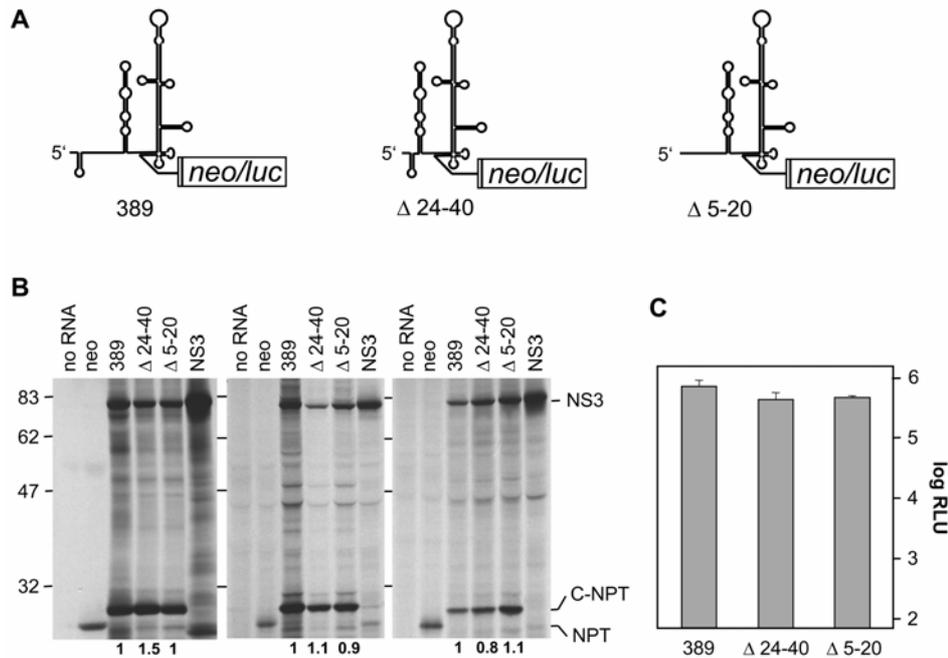


Abbildung 7: Sequenzen „upstream“ der HCV-IRES sind nicht essentiell für die Translation A) Schematische Darstellung der 5' NTRs der verschiedenen Replikons. B) In vitro Translationen der Replikons in verschiedenen Zellysaten (Kaninchen-Retikulozyten (links), Huh-7 (mitte) und HeLa (rechts)). Als Referenz dienten RNAs, bei denen NS3 unter der Kontrolle der EMCV-IRES bzw. die Neomycin-Phosphotransferase (NPT) unter der Kontrolle der Poliovirus IRES translatiert werden. Um den Hintergrund zu bestimmen, wurde ein Ansatz ohne Zugabe von RNA mitgeführt. Zu beachten ist, dass von den Replikon-RNAs ein NPT Protein translatiert wurde, an das die ersten 16 Aminosäuren des Core-Proteins fusioniert ist (C-NPT). Die Zahlen an der linken Seite beziehen sich auf Molekulargewichte von Referenzproteinen (in Kilodalton), rechts sind die Proteine spezifiziert. Die Zahlen unter den Ansätzen spiegeln die Menge an translatiertem C-NPT im Verhältnis zum internen Standard NS3 wieder. Dabei wurde die Translationseffizienz des Ausgangsreplikons (389) auf „1“ gesetzt. C) Translationseffizienz nach Transfektion von Huh-7 Zellen. Zellen wurden mit den verschiedenen Replikon-RNAs, die in diesem Ansatz das Luziferase-Reportergen besaßen und einer RNA die das β -gal-Gen unter der Kontrolle der EMCV-IRES besaß transfiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde mit Hilfe der β -gal Aktivität auf Translationseffizienz normalisiert.

Die Auswertung dieses Versuchs ergab, dass das Verhältnis zwischen internem Standard NS3 und dem Markergen in allen Fällen vergleichbar war (Abb. 7). Ein analoges Ergebnis wurde auch mit den Luziferase-Replikons erhalten. Dies lässt folgern, dass die Aktivität der HCV-IRES nicht durch die Mutationen in den ersten 40 Nukleotiden beeinflusst wird und dass sie unabhängig vom Reportgen ist. Weiterhin konnte damit auch bestätigt werden, dass die HCV-IRES in verschiedenen Zellextrakten aktiv ist (Borman *et al.*, 1997). Es ist anzumerken, dass in den in vitro Translationen – neben einigen Vorläuferproteinen – nur NS3 eindeutig nachweisbar ist. Dies könnte daran liegen, dass aufgrund fehlender microsomalier Membranen die Spaltung des Polyproteins ineffizient ist oder die meisten Spaltprodukte instabil sind und rasch abgebaut werden.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Mutationen im 5' Bereich der 5' NTR einen Effekt auf die IRES-Aktivität in Zellen ausüben. Zur Klärung dieser Frage wurden Huh-7 Zellen mit den entsprechenden Luziferase-Replikons transfiziert und die Luziferase-Aktivität 4 Stunden nach Transfektion bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wird die Luziferase-Aktivität nur von der Menge transfizierter RNA bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine nennenswerte RNA-Replikation stattfindet. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurde eine zweite RNA, die das β -Galaktosidase Gen unter der Kontrolle der EMCV-IRES kodiert, kotransfiziert. Gemessene Luziferase-Aktivitäten wurden auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert. Erstaunlicherweise hatten die Mutationen del 24-40 und del 5-20 in Zellen einen Einfluss auf die Translationaktivität der HCV-IRES. Verglichen mit der Aktivität der authentischen IRES kam es zu einer 2- bis 3-fachen Reduktion (Abb. 7).

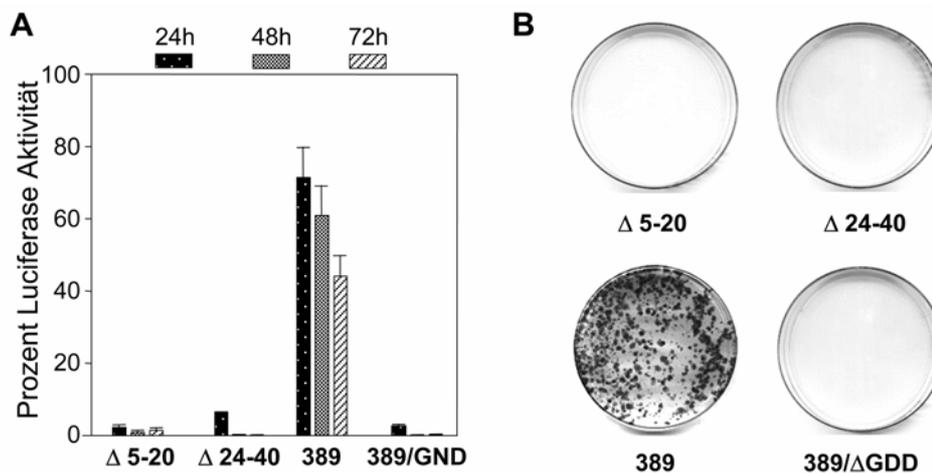


Abbildung 8: Sequenzen „upstream“ von Stemloop 2 sind essentiell für die RNA-Replikation A) Ergebnisse des transienten Zellsystems. Gezeigt sind die Luziferase Aktivitäten 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion der Zellen. Alle Werte sind auf die Aktivität 4 Stunden (=100%) nach Transfektion normalisiert. Als Positivkontrolle diente eine RNA, die die ersten 389 Nukleotide des HCV besaß (389), als Negativkontrolle eine entsprechende RNA mit inaktiver Polymerase (389/GND). B) Ergebnisse mit den selektionierbaren Replikons. Huh-7 Zellen wurden entweder mit 100ng RNA der Positivkontrolle (389) oder 100ng RNA der Deletionsmutanten (Δ 5-20, Δ 24-40) oder der Negativkontrolle (389/ Δ GDD) transfiziert und 24 Stunden nach Transfektion 3-4 Wochen einer G418 Selektion unterzogen.

Da der Einfluss der Mutationen auf die Translationseffizienz nur moderat war, wurden die Mutationen anschließend sowohl im selektionierbaren als auch transienten Zellsystem auf Replikation getestet. Als Positivkontrolle diente die parentale NK-5.1-RNA (389), als Negativkontrolle eine analoge RNA, die Mutationen in der NS5B-Polymerase besaß. In beiden Systemen waren die Konstrukte del5-20 und del 24-40 nicht fähig zu replizieren (Abb. 8). So entstanden im selektionierbaren System keine G418 resistenten Kolonien und der

Verlauf der Luziferase-Aktivität im transienten System war vergleichbar mit dem der inaktiven Punktmutante (389/ GND). Die Positivkontrolle (389) hingegen replizierte gut nachweisbar. Mit dem Ergebnis aus beiden Meßsystemen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im vorderen Bereich der 5' NTR zu einem Verlust der Replikationskompetenz der HCV-RNA führten. Daraus ist zu folgern, dass die ersten 40 Nukleotide essentiell für die HCV Replikation sind.

3.1.2 Kartierung der Replikationssignale in Domäne 2, 3 und 4 der 5' NTR

Weitere Untersuchungen der 5' NTR in Bezug auf ihre Bedeutung für die Replikation waren nicht möglich, da Mutationen innerhalb der IRES zu einer Beeinträchtigung der Translation des jeweiligen Reportergens und somit zu einer Verfälschung der Replikationsmessung führen konnten. Um dies zu verhindern, wurde die HCV 5' NTR mit der IRES des Poliovirus (PV) fusioniert (Abb. 9A). Diese wurde gewählt, da sie gut charakterisiert und in Huh-7 Zellen aktiv, zum anderen von der Struktur und Funktion sehr unterschiedlich zur HCV-IRES ist. Zur Unterscheidung von den herkömmlichen subgenomischen Replikons wurden die Konstrukte, deren Markergen unter dem Einfluß der Poliovirus-IRES stand, mit „nt xx Poliovirus-IRES“ (kurz: xx-PVI) bezeichnet. „nt xx“ bezeichnet dabei den Bereich der 5' HCV-NTR, der in den verschiedenen Deletionsmutanten noch vorhanden war (s. unten).

Im ersten Ansatz wurden alle 341 Nukleotide der HCV 5' NTR direkt mit der Poliovirus IRES fusioniert (Abb. 9A). Da dieser Klon als Referenz und Ausgangskonstrukt für alle weiteren Mutanten dienen sollte, wurde zunächst die Translation des Markergens *in vitro* und in Zellkultur getestet. Dabei wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Als Positivkontrolle diente zum einen die Expression des Markergens durch die HCV-IRES (389), zum anderen ein Konstrukt, in dem nur das erste Nukleotid der HCV 5' NTR an die Poliovirus-IRES fusioniert war (1-PVI). Während die Expression des Markergens in der *in vitro* Translation (in Zellextrakten von HeLa-Zellen) bei allen Konstrukten vergleichbar war, kam es zu einer 15-20-fachen Reduktion der Translation in Zellkultur, wenn die HCV 5' NTR unmittelbar mit der Poliovirus-IRES fusioniert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wiesen auf eine Interferenz zwischen den beiden hochstrukturierten RNA-Elementen hin.

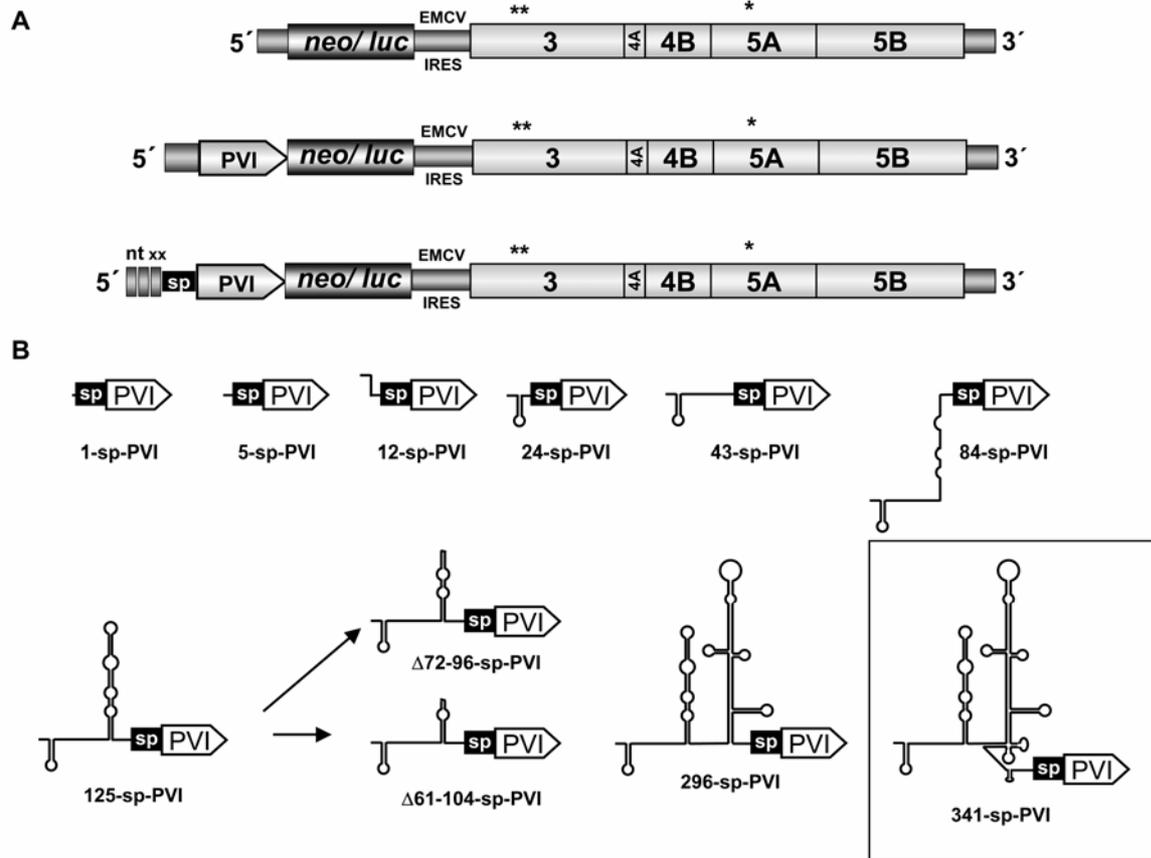


Abbildung 9: A) Schematische Übersicht der verwendeten Replikon-Konstrukte. Oben dargestellt ist das Ausgangsreplikon, darunter die Variante, in der die Poliovirus IRES (PVI) direkt an die HCV 5' NTR fusioniert wurde. Im unteren Replikondesign wurde zwischen den Sequenzbereichen der HCV 5' NTRs und der PVI ein 63 Nukleotide langer „Spacer“ Bereich inseriert. Der HCV 5' NTR Bereich ist dabei als gestrichelte dicke Linie, der „Spacer“-Bereich als schwarzer Kasten und die PV-IRES (PVI) als Pfeil angedeutet. B) Detaillierte Darstellung der verschiedenen 5' NTR Chimären. Das Ausgangskonstrukt, das die gesamte HCV 5' NTR besitzt, ist eingerahmt. Die zwei Konstrukte denen jeweils Teile des Stemloops 2 fehlen, sind von dem Konstrukt 125-sp-PVI abgeleitet.

Um die vollständige Aktivität der Poliovirus-IRES wieder herzustellen, wurden das HCV- und das Poliovirus-Element durch eine 63 Nukleotide langen RNA-Abschnitt („Spacerelement“) mit einer willkürlichen Sequenz voneinander getrennt. Translationsexperimente *in vitro* (Abb. 10A; Ansatz 4-14) und in Zellkulturen (Abb. 10B) zeigten, dass die räumliche Trennung der IRES-Elemente die komplette Poliovirus-IRES Aktivität wieder herstellte (Abb. 10B; vergleiche 341sp und 341sp/GND mit 341GND). Deswegen wurden alle weiteren Mutationen in der HCV 5' NTR in dieses Replikondesign eingeführt (xx-sp-PVI). Zur Kartierung der 5' Minimaldomäne wurden folgende Konstrukte hergestellt (Abb. 9B): 1-sp-PVI, 5-sp-PVI, 12-sp-PVI, 24-sp-PVI, 43-sp-PVI, 84-sp-PVI, 125-sp-PVI und 296-sp-PVI. Die Konstrukte 1-sp-PVI, 5-sp-PVI und 12-sp-PVI basierten auf der Beobachtung, dass bei den nahe verwandten Pestiviren die ersten Nukleotide der 5' NTR

als minimales Replikationssignal ausreichen (Frolov *et al.*, 1998). Die Untersuchungen im vorderen Bereich der 5' NTR ergaben, dass der erste Stemloop (Nukleotide 5-20) bzw. die Nukleotide 24-40 essentielle Bereiche für die Replikation beinhalteten. Deshalb wurden die Konstrukte 24-sp-PVI und 43-sp-PVI hergestellt, die den ersten Stemloop sowie die ersten

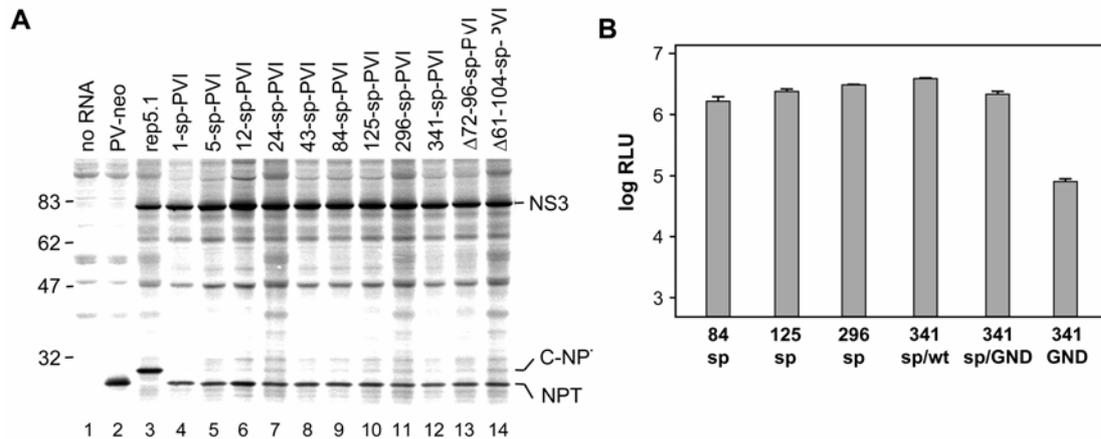


Abbildung 10: A) Translationsstudien der chimären HCV-PV 5' NTRs in in vitro Translationen in HeLa Extrakt. In allen Ansätzen wurde eine vergleichbare Menge in vitro transkribierter RNA eingesetzt und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Die Zahlen auf der linken Seite beziehen sich auf die Molekulargewichte von Referenzproteinen (kDa). Spalte 3 zeigt die Ergebnisse mit dem parentalen subgenomischen Replikon. Es ist zu beachten, dass in diesem Fall das Fusionsprotein C-NPT translatiert wurde, wohingegen bei den chimären Replikons das NPT-Gen direkt an die PVI fusioniert wurde. In Ansatz 2 wurde eine RNA verwendet, bei der das NPT-Gen unter der Translationskontrolle der PVI stand. B) Translationseffizienz der HCV-sp-PVI chimären RNAs in Huh-7 Zellen. Transfiziert wurde parallel zu den verschiedenen Replikon-Mutanten noch eine RNA, die für das β-gal Gen kodiert. 4 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferase sowie die β-gal Aktivität bestimmt. Gezeigt sind die auf die β-gal Aktivität normierten Luziferase Aktivitäten. Dargestellt ist nur eine repräsentative Auswahl. Zum Vergleich der Konstrukte mit oder ohne Spacersequenz zwischen HCV-IRES und PVI ist rechts das Ergebnis mit einer RNA ohne Spacersequenz dargestellt (341GND). Diese zeigt eine deutlich reduzierte Translationseffizienz. (PV=Poliovirus; PVI=Poliovirus-IRES; sp=Spacersequenz)

4 Nukleotide der Zwischenregion bzw. den gesamten vorderen Bereich der 5' NTR bis zum Beginn der eigentlichen HCV-IRES besaßen. Für den Fall, dass bei HCV für die Replikation auch Sequenzen/ Strukturen aus dem Bereich des IRES-Elements benötigt werden, wurden die Konstrukte 84-sp-PVI, 125-sp-PVI und 296-sp-PVI hergestellt. 84-sp-PVI beinhaltet den vorderen Bereich der HCV 5' NTR sowie eine Teilsequenz der Domäne II, 125-sp-PVI besitzt den gesamten Sequenzbereich der Domäne II, der für die IRES-Aktivität benötigt wird. 296-sp-PVI erstreckt sich bis in das Ende der Domäne III. Als Positivkontrolle für die Experimente mit dieser Konstruktreihe diente das Konstrukt 341-sp-PVI, das die gesamte 5' NTR bis zum Start-Codon des HCV-Polyproteins besitzt. Als Negativkontrollen wurden in diesem Kontext die für die jeweiligen Meßsysteme verwendeten NS5B Mutationen kloniert

(Δ GDD für die selektionierbaren Replikons und die GND-Mutante im Fall der Luziferasereplikons).

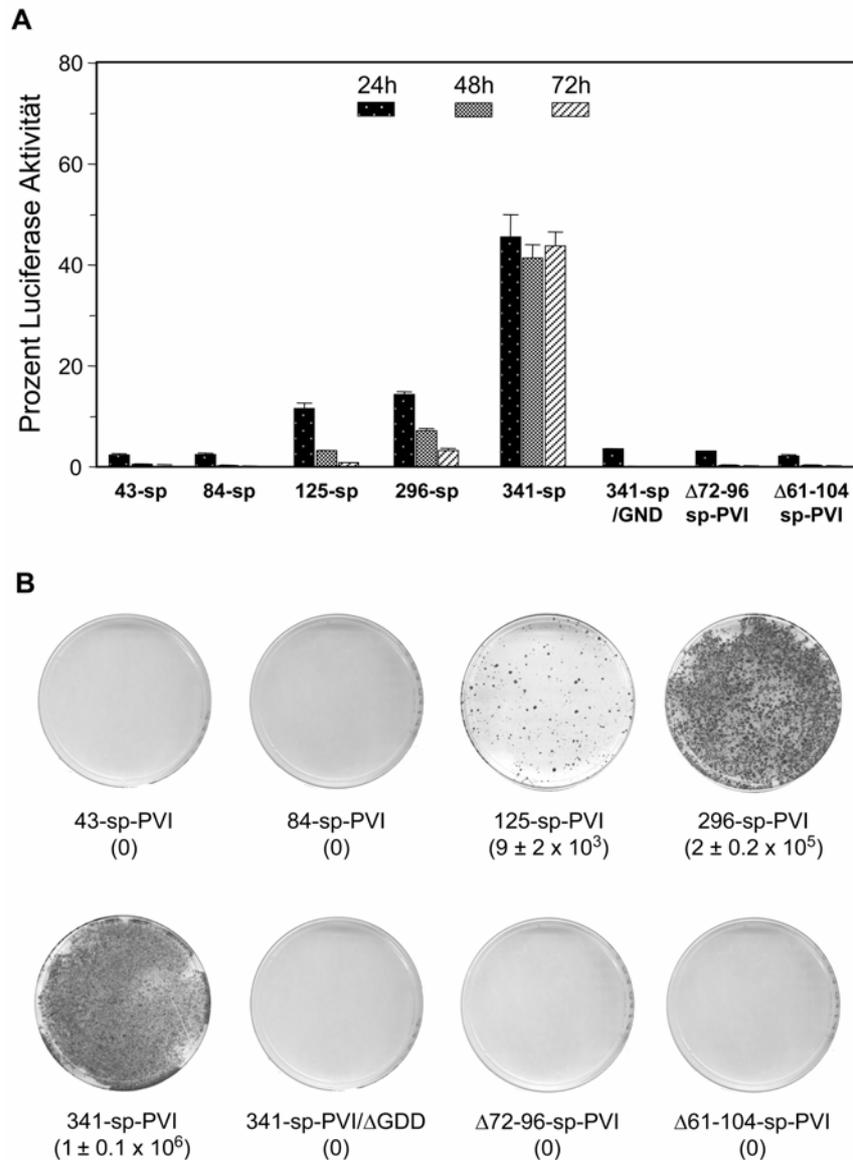


Abbildung 11: Die gesamte 5'NTR wird für effiziente HCV-Replikation benötigt A) Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellkultursystem. Replikon-RNAs mit chimären HCV-sp-PV 5' NTRs, die das Luziferase Reportergen besitzen, wurden in Huh-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 4, 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Alle Werte wurden auf den 4 Stunden Wert normalisiert, der auf 100% gesetzt wurde. B) Ergebnisse des selektionierbaren Zellkultursystems. Huh-7 Zellen wurden mit chimären *neo*-Replikon-RNAs transfiziert. Nach 3-4 wöchiger G418 Selektion wurden die Zellen mit „Coomassie brilliant blue“ fixiert und gefärbt. Die nach Auswertung verschiedener Verdünnungsreihen erhaltene cfu/ μ g RNA ist unter der jeweiligen Zellkulturschale angegeben.

Um ausschließen zu können, dass es trotz der Spacersequenz zu Beeinträchtigungen der Translation des vorderen Cistrons kam, wurden die Konstrukte zuerst *in vitro* auf ihre Translationskompetenz überprüft (Abb. 10). Die Analyse dieses Versuchs ergab keine

wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen. Auch nach Transfektion von Huh-7 Zellen mit den jeweiligen RNAs und Messung der Luziferaseaktivität 4 Stunden nach Transfektion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen RNAs (Abb. 10B). Im Vergleich dazu war eine deutliche Reduktion der Translation bei dem Konstrukt festzustellen, bei dem beide IRES Elemente direkt fusioniert wurden (341GND). Es ist noch einmal zu erwähnen, dass 4 Stunden nach Transfektion die RNA-Replikation keinen Einfluss auf die Luziferaseaktivität hat, wie der Vergleich der replikationskompetenten RNA 341-sp-PVI mit der replikationsdefizienten 341-sp-PVI/GND-RNA erkennen lässt. Nachdem sich die Funktionalität der Poliovirus-IRES in allen Konstrukten mit Spacerelement bestätigte, wurde zur eigentlichen Kartierung der Replikationsdomänen in der 5' NTR die Koloniebildungskompetenz der einzelnen Replikons näher untersucht. Dies erfolgte mittels Transfektion von Huh-7 Zellen mit den entsprechenden *neo*-Replikons und anschließender 4 wöchiger Selektion mit G418. Dabei zeigte sich, dass die Konstrukte 1-sp-PVI, 5-sp-PVI, 12-sp-PVI, 24-sp-PVI und 43-sp-PVI und 84-sp-PVI nicht mehr replikationskompetent waren. In mehreren Versuchen wurden keine G418 resistente Zellklone erhalten (Abb. 11B; Konstrukte mit weniger als 43 Nukleotide der HCV 5' NTR am 5' Ende nicht gezeigt). Die Klone 125-sp-PVI, 296-sp-PVI und 341-sp-PVI waren hingegen in der Lage, Replikation in den Zellen zu unterhalten. Dabei stieg die Koloniebildungskompetenz mit der Länge der HCV 5' NTR an. So hatte der Klon *neo*/125-sp-PVI eine Koloniebildungskompetenz von ungefähr 9.000 cfu/μg RNA, die um ein 20-faches gesteigert werden konnte, wenn die ersten 296 Nukleotide an die Poliovirus-IRES fusioniert wurden (*neo*/296-sp-PVI). Die höchste Effizienz hatte der als Positivkontrolle dienende Klon *neo*/341-sp-PVI mit ungefähr 10^6 cfu/μg RNA.

Die Auswertungen des transienten Replikationstests bestätigten diese Ergebnisse (Abb. 11A). Auch hier lagen die Werte der Konstrukte 125-sp-PVI und 296-sp-PVI deutlich oberhalb derer der Negativkontrolle, was die Replikationskompetenz dieser RNAs bestätigte, wobei maximale Replikation mit dem Replikon beobachtet wurde, das die gesamte HCV 5' NTR besaß. Diese Ergebnisse zeigten, dass die ersten 125 Nukleotide, die Stemloop I und II beinhalten, die für Replikation benötigte Minimalsequenz darstellen. Die Replikationseffizienz wird allerdings deutlich gesteigert wenn die Sequenz der gesamten 5' NTR vorhanden ist.

Um den für Replikation benötigten Minimalbereich noch näher zu charakterisieren, wurden zwei weitere Replikons, die sich von 125-sp-PVI ableiten, generiert. Da die Konstrukte del 5-20 und del 24-40 gezeigt haben, dass diese Regionen unentbehrlich für die Replikation sind,

wurden weitere Deletionen im Stemloop II eingeführt: Replikon $\Delta 72-96$ -sp-PVI fehlen die beiden oberen und $\Delta 61-104$ -sp-PVI sogar die drei oberen Loopregionen (Abb. 9B). Diese beiden RNAs wurden sowohl im HeLa-Extrakt als auch in transfizierten Huh-7 auf ihre Translationkompetenz überprüft und sie zeigten keine Unterschiede zu den anderen Kontrukten dieser Serie (Abb. 10A). Allerdings waren diese RNAs sowohl im transienten als auch im selektionierbaren Replikonsystem nicht mehr replikationskompetent (Abb. 11A/B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der gesamte Sequenzbereich des Stemloops II für die RNA-Replikation notwendig ist. Ein weiteres Konstrukt bestätigte diese Vermutung. Im Kontext der 125-sp-PVI-RNA wurden in dem Bereich der Nukleotide 95-110 – dies entspricht dem mittleren Bereichs des Stemloops II - 9 Punktmutationen eingeführt (125mut95-110-sp-PVI). Dadurch wurde die Komplementarität in der Stemregion gestört, was die Ausbildung des Stems in dieser Region verhinderte (Abb. 12). So sollten sich im günstigsten Fall nur der unterste Stem (Nukleotide 44-52 und Nukleotide 111-118) und der oberste Teil des Stems mit dem apikalen Loop (Nukleotide 74 -92) ausbilden.

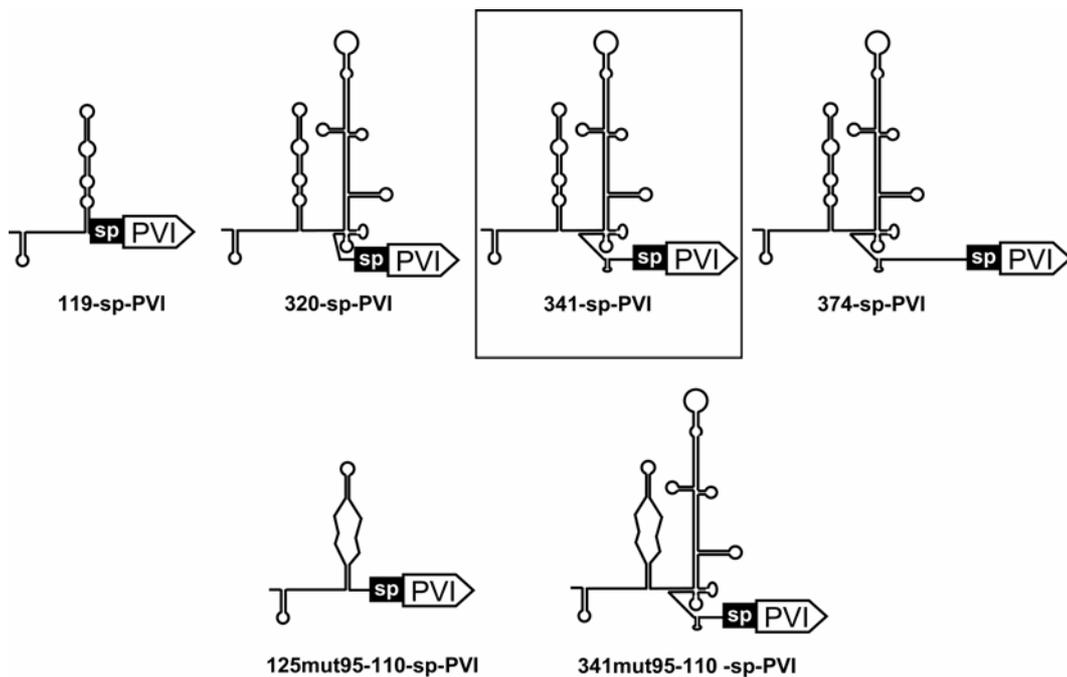


Abbildung 12: Detaillierte Darstellung der verschiedenen HCV-sp-PV 5' NTR Chimären. Das Ausgangskonstrukt, das die gesamte HCV 5' NTR besitzt, ist eingerahmt. Das Konstrukt 374-sp-PVI besitzt neben den Sequenzen aus der 5' HCV NTR noch die ersten 33 Nukleotide der core kodierenden Region. Die Konstrukte 125mut95-110-sp-PVI und 341mut95-110-sp-PVI besitzen die selben Punktmutationen im Bereich des Stemloops 2, allerdings entweder im Kontext der ersten 125 Nukleotide oder im Kontext der gesamten HCV 5' NTR.

Dieses Konstrukt war zumindest im transienten Zellsystem nicht in der Lage, zu replizieren (Abb. 13A). Untersuchungen auf Koloniebildungskompetenz und Analyse der eventuell entstehenden Kolonien hinsichtlich Revertanten stehen allerdings noch aus. Wenn dieselben 9 Punktmutationen im Kontext der gesamten 5' NTR untersucht wurden (Abb. 12; 341mut95-110-sp-PVI), war im transienten Testsystem eine minimale RNA-Replikation feststellbar, die jedoch ca. 100-fach geringer war als die des Wildtyps (Abb. 13A; vergleiche 341mut95-110-sp mit 341-sp). Diese Ergebnisse bestätigen eine wichtige Rolle des Sequenzbereichs des Stemloops II für die Replikation des HCV.

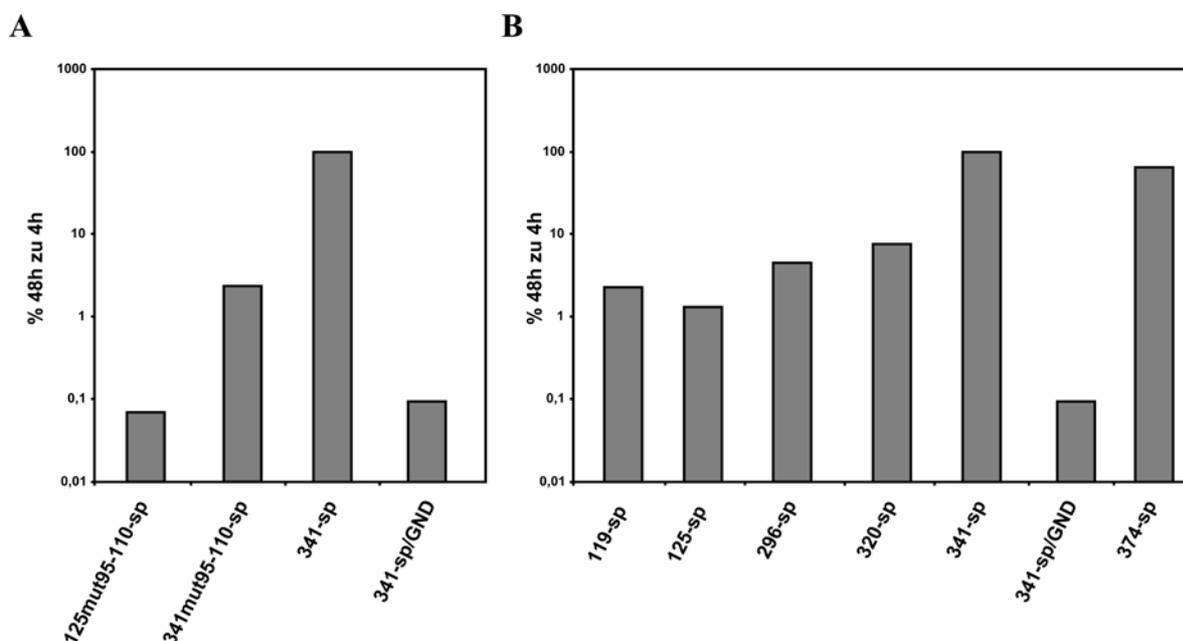


Abbildung 13: Stemloop 2 in der 5' NTR spielt eine wichtige Rolle für die HCV-Replikation A/B) Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Replikationssystem. Replikon-RNAs mit chimären HCV-sp-PV 5' NTRs, die das Luziferase Reporter gen besitzen, wurden in Huh-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 4, 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion lysiert und die Luziferase Aktivität bestimmt. Um die Analyse zu vereinfachen, wurde die Replikation als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität, gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion, angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI RNA (341-sp), als Negativkontrolle die GND Mutante mitgeführt.

Zur genaueren Bestimmung der 3' Grenze der Minimalregion der 5' NTR die für die RNA-Replikation benötigt wird, wurde ein weiteres Konstrukt kloniert, das unmittelbar hinter dem Stem endete (119-sp-PVI; Abb. 12). Diesem Konstrukt fehlten die 3' terminalen 5 Cytosine der 125-sp-PVI-RNA. Im transienten System replizierte es sogar besser als das parentale Replikon (Abb. 13B). Allerdings wurde der Versuch bislang nur einmal durchgeführt; weitere Experimente zur Klärung dieses Sachverhaltes stehen noch aus.

Die Konstrukte 320-sp-PVI und 374-sp-PVI dienten zur Feinkartierung der Replikationssignale innerhalb der 5'NTR. Bei der RNA 320-sp-PVI war im Gegensatz zur 296-sp-PVI-RNA, bei der der 5' Bereich im Stemloop IIIe endete, noch der gesamte Bereich des Stemloops IIIe sowie f erhalten (Abb. 12). Dieses Konstrukt wurde generiert, um die Frage zu klären, ob dieser Bereich für effiziente Replikation ausreichte oder ob der Sequenzbereich des Stemloops IV, in dessen Loop sich das Startkodon befindet, auch noch eine tragende Funktion spielt. Der Vergleich im transienten System zeigte, dass 320-sp-PVI zwar minimal besser als 296-sp-PVI replizierte, aber deutlich unterhalb des Niveaus der 341-sp-PVI-RNA blieb (Abb. 13B). Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage, dass die Replikationskompetenz mit steigender Länge der 5' NTR zunimmt und für maximale Replikationseffizienz die gesamte 5' NTR benötigt wird.

Über die Sequenzen „downstream“ des Startkodons gibt es unterschiedliche Berichte hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der IRES-abhängigen Translation. Um eine eventuelle Beteiligung bei der Replikation zu untersuchen, wurde das Konstrukt 374-sp-PVI hergestellt. Diese RNA besitzt neben der gesamten HCV 5' NTR noch die ersten 33 Nukleotide der Core-kodierenden Region (Abb. 12). Die Ergebnisse aus dem transienten Replikationssystem ergaben, dass dieser Bereich keinen Einfluss auf die Replikation zu haben scheint, da die Replikationseffizienzen der 341-sp-PVI und der 374-sp-PVI-RNAs vergleichbar waren (Abb. 13B).

3.1.3 Rolle des 3' Endes des Minusstranges für die RNA-Replikation

Im Laufe der beschriebenen Arbeit erschienen mehrere Veröffentlichungen über die Struktur des 3' Endes des Minusstranges des HCV (Schuster *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002), d.h. dem Komplement der 5' NTR des Plusstrangs. Im Minusstrang bilden die letzten 106 Nukleotide zwei stabile Stemloops aus (Abb. 14A). Somit lag die Vermutung nahe, dass nicht die ersten 119 Nukleotide, sondern sogar nur die ersten 106 Nukleotide des Plusstrangs, die den letzten 106 Nukleotiden des Minusstrang entsprechen, für die Replikation ausreichend sind. Deshalb

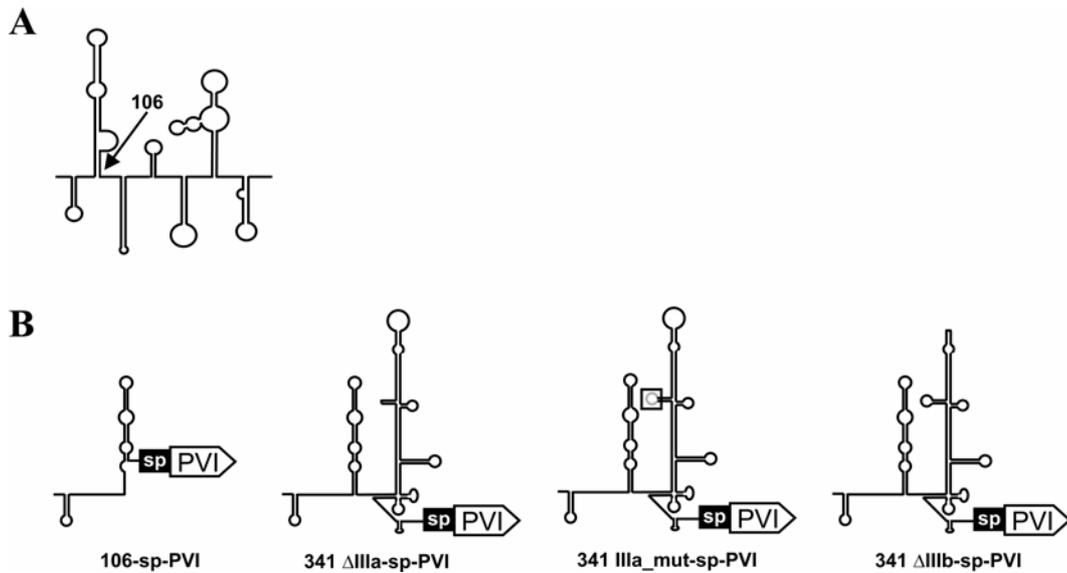


Abbildung 14: A) Schematische Darstellung der Sekundärstrukturen des 3' Endes des Minusstranges (nach Smith *et al.*, 2002). B) Detaillierte Darstellung der verschiedenen HCV-sp-PV 5' NTR Chimären. Die Mutationen im Loop IIIa der RNA 341 IIIa_mut-sp-PVI sind durch einen Rahmen angedeutet.

wurde das Replikon 106-sp-PVI hergestellt, bei dem die ersten 106 Nukleotide mit der Spacerregion und der Poliovirus-IRES fusioniert wurden. Tatsächlich replizierte diese RNA im transienten System auf vergleichbarem Niveau wie die 125-sp-PVI-RNA (Abb. 15). Dieses Ergebnis gab erste Hinweise auf die Richtigkeit der Vorhersage für die Struktur des Minusstrangs, zum anderen stärkte dies die Vermutung, dass dieser Bereich funktionell für die Initiation der Synthese des Plusstrangs benötigt wird und somit als Promotor fungiert.

Auf Basis der Vorhersagen für das 3' Ende des Minusstranges wurden noch zwei weitere Regionen untersucht, Stemloop IIIa und IIIb. Beide Regionen bilden auch auf Minusstrangebene analoge Strukturen aus (Schuster *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002) und eine Beteiligung an der Replikation ist somit naheliegend. Die Kartierungen wurden im Kontext des 341-sp-PVI-Replikons durchgeführt. Für den Bereich IIIa wurden zwei Konstrukte hergestellt, in der RNA 341ΔIIIa-sp-PVI wurde der gesamte Bereich IIIa deletiert (Abb. 14B), in der RNA 341 IIIa_mut-sp-PVI wurde die Loopsequenz „GAGUAC“ durch die Sequenz „GAAACG“ ersetzt. Diese Mutation betraf neben der Loopsequenz noch die an den Loop angrenzende G-C Paarung des Stems die gestört wurde, was zu einer Vergrößerung der Loopregion führte. In der Region IIIb wurde der gesamte Loopbereich deletiert (341 ΔIIIb-sp-PVI; Abb. 14B). Im transienten System replizierte 341ΔIIIb-sp-PVI vergleichbar mit der Positivkontrolle, nt341ΔIIIa-sp-PVI zeigte eine 5-fache Reduktion, wohingegen 341 IIIa_mut-sp-PVI wiederum der Replikation der parentalen 341-sp-PVI glich (Abb. 15). Da dieser Versuch bislang nur einmal durchgeführt wurde, müssen weitere Untersuchungen

zeigen, ob Stemloop IIIa einen Einfluss auf die Replikation besitzt oder ob dieser Bereich - wie es für IIIb zu sein scheint - nicht in die RNA-Vermehrung involviert ist.

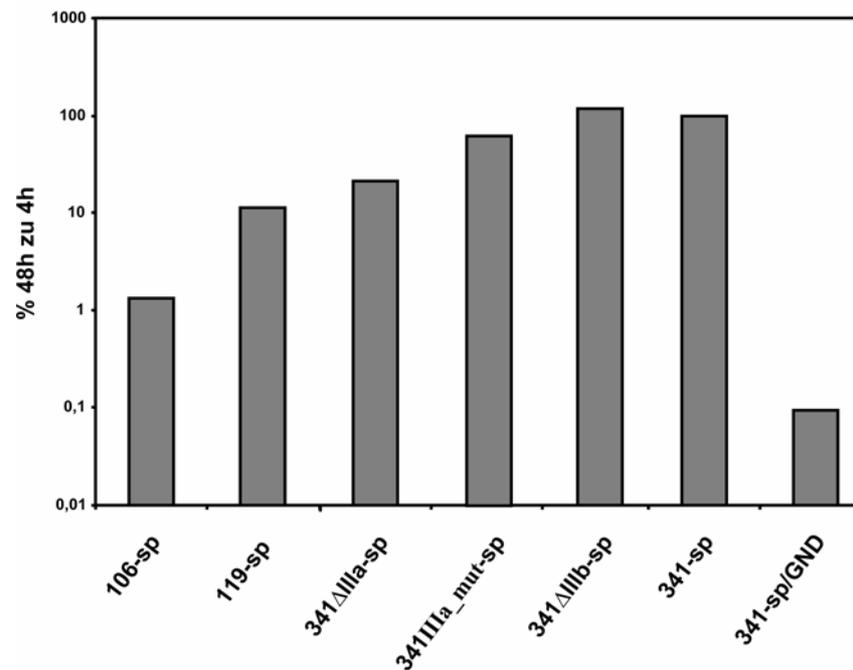


Abbildung 15: Die ersten 106 Nukleotide der 5' NTR sind ausreichend für eine minimal RNA-Replikation. Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Replikationssystem. Die Replikation wurde als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion dargestellt. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI RNA (341-sp), als Negativkontrolle die GND Mutante mitgeführt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die ersten 106-125 Nukleotide der 5' NTR des HCV Plusstrang-Genoms, die den ersten zwei Stemloopstrukturen der 3' Endes des Minusstrangs entsprechen, für die Replikation essentiell sind. Für eine effiziente Replikation wird jedoch die gesamte 5' NTR benötigt, dies entspricht auf Minusstrangebene dem gesamten 3' Endes. Sequenzen „downstream“ des Startkodons scheinen keinen Einfluss auf die Replikation auszuüben.

3.2 Kartierung von RNA-Replikationssignalen in der 3' NTR des HCV-Genoms

Die 3' NTR von HCV besitzt eine 3-geteilte Struktur (Abb. 16). Auf das Stop-Codon des Polyproteins folgt ein Bereich mit einer Länge zwischen 21-39 Nukleotiden, dessen Sequenz in verschiedenen HCV-Isolaten sehr variabel ist (variable Region). Die sich anschließende polyU-UC-Region besteht nur aus Uridinen und vereinzelt Cytosinen. Die Länge ist dabei sehr heterogen und liegt zwischen 70 und 120 Nukleotiden bei verschiedenen HCV-Isolaten. Die letzten 98 Nukleotide des HCV-Genoms sind stark konserviert und werden als X-Sequenz bezeichnet (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1995, 1996; Yamada *et al.*, 1996).

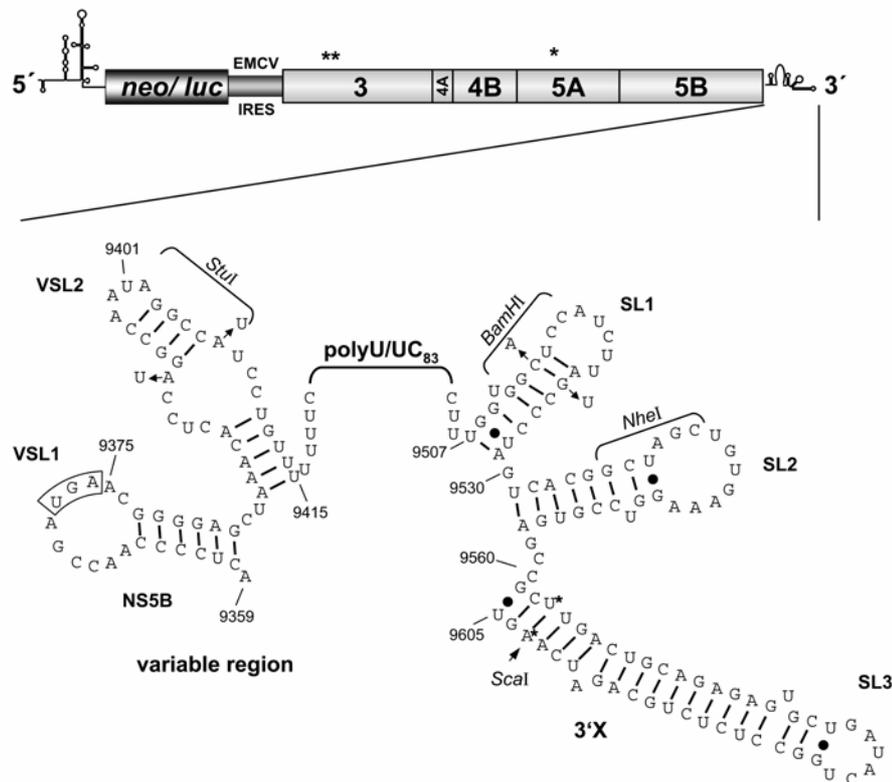


Abbildung 16: Oben: Schematische Darstellung des Replikons, das für diese Studie verwendet wurde. Die 5' und 3' NTRs sind mit ihrer Sekundärstruktur dargestellt. Die HCV-IRES in der 5' NTR kontrolliert die Translation entweder des *neo*- oder des Luziferase-Gens (*luc*). Die EMCV-IRES steuert die Translation der Nichtstrukturproteingene NS3-NS5B. Die Positionen der Zellkultur-adaptiven Mutationen sind mit einem „*“ gekennzeichnet („NK5.1 Kontext“). Unten: Potentielle Struktur der 3' NTR (Blight *et al.*, 1997). Die variable Region besteht aus zwei Stemloops (VSL1 und VSL2), der poly U/UC Bereich hat bei dem hier verwendeten Con1-Isolats eine Länge von 83 Nukleotiden. Die X- Sequenz bildet 3 Stemloops (XT-SL1, -SL2, -SL3) aus. Die Positionen der eingefügten Schnittstellen (*StuI* und *BamHI*) sowie der authentischen Schnittstelle *NheI* sind angedeutet. Des weiteren sind die Mutationen am 3' Ende zur Generierung einer *Scal*-Restriktionsschnittstelle mit „*“ markiert.

Computervorhersagen und Strukturanalysen weisen darauf hin, dass die variable Region zwei Stemloops (VSL1 und -2) und die X-Sequenz 3 Stemloops (XT-SL1, -2 und -3) ausbilden kann (Blight & Rice, 1997; Ito & Lai, 1997; Tanaka *et al.*, 1996).

Zu Beginn der Arbeit lagen gegensätzliche Aussagen über die Funktion dieser 3' Region hinsichtlich der Replikation vor. So wurden HCV Genome beschrieben, denen große Teile der 3' NTR fehlten, die in menschlichen Leberzellen replizierten (Dash *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1995). Zum anderen zeigten *in vivo* Untersuchungen in Schimpansen, dass sowohl der polyU/UC-Bereich als auch die X-Sequenz für eine Infektion essentiell sind (Yanagi *et al.*, 1999, Kolykhalov *et al.*, 2000). Allerdings konnten aufgrund des Versuchsaufbaus keine Aussagen über die Replikationseffizienz getroffen werden. Auch der Einfluss der 3' NTR auf die IRES-vermittelte Translation wurde kontrovers diskutiert (Ito *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2001; Imbert *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der 3 Bereiche der 3' NTR für die HCV-RNA-Replikation und -Translation untersucht werden. Das dafür verwendete Zellkultursystem sollte erstmals auch quantitative Aussagen erlauben. Die Untersuchungen wurden mit bicistronischen Replikons (Abb. 16; oben) die vorwiegend die adaptive Mutationen in NS3 (E1202G, T1280I) und NS5A (S2197P) trugen („NK5.1“) durchgeführt. Abweichungen sind im Text angegeben.

3.2.1 Untersuchungen des Einflusses der variable Region auf die HCV-Replikation

Zur Vereinfachung der Klonierungen wurde zuerst versucht, zwei Restriktionsschnittstellen in die nähere Umgebung des polyU/UC Bereichs einzuführen. Deshalb wurden in den Stemloop VSL2 des variablen Bereichs eine *StuI*- und in den Stemloop SL I der X-Sequenz eine *BamHI*-Schnittstelle eingeführt, die vor bzw. hinter dem polyU-UC-Bereich lagen (Konstrukname NK5.1-Stu bzw. NK5.1-BamHI; Abb. 16). Zur Einführung der *StuI*-Schnittstelle in die variable Region musste das Adenin an Position 9407 durch ein Uridin ersetzt werden. Um Veränderungen im Stembereich, in der die Schnittstelle lag, auszuschließen, wurde eine kompensatorische Mutation eingefügt (Nukleotid 9394: A→T). Um die *BamHI* Schnittstelle in den SL 1 der X-Sequenz einzuführen, wurde ein Cytosin (Position 9513) durch ein Adenin substituiert. Damit die Sekundärstrukturen auch in diesem Bereich erhalten blieben, musste eine kompensatorische Mutation eingefügt werden (9523: G→ T). Allerdings wurde dadurch eine GC- durch eine AU-Paarung ersetzt und der XT-SL I

möglicherweise destabilisiert. Um die eingeführten Mutationen auf ihre Replikationskompetenz zu überprüfen, wurden sie im Kontext des Replikons NK5.1 sowohl

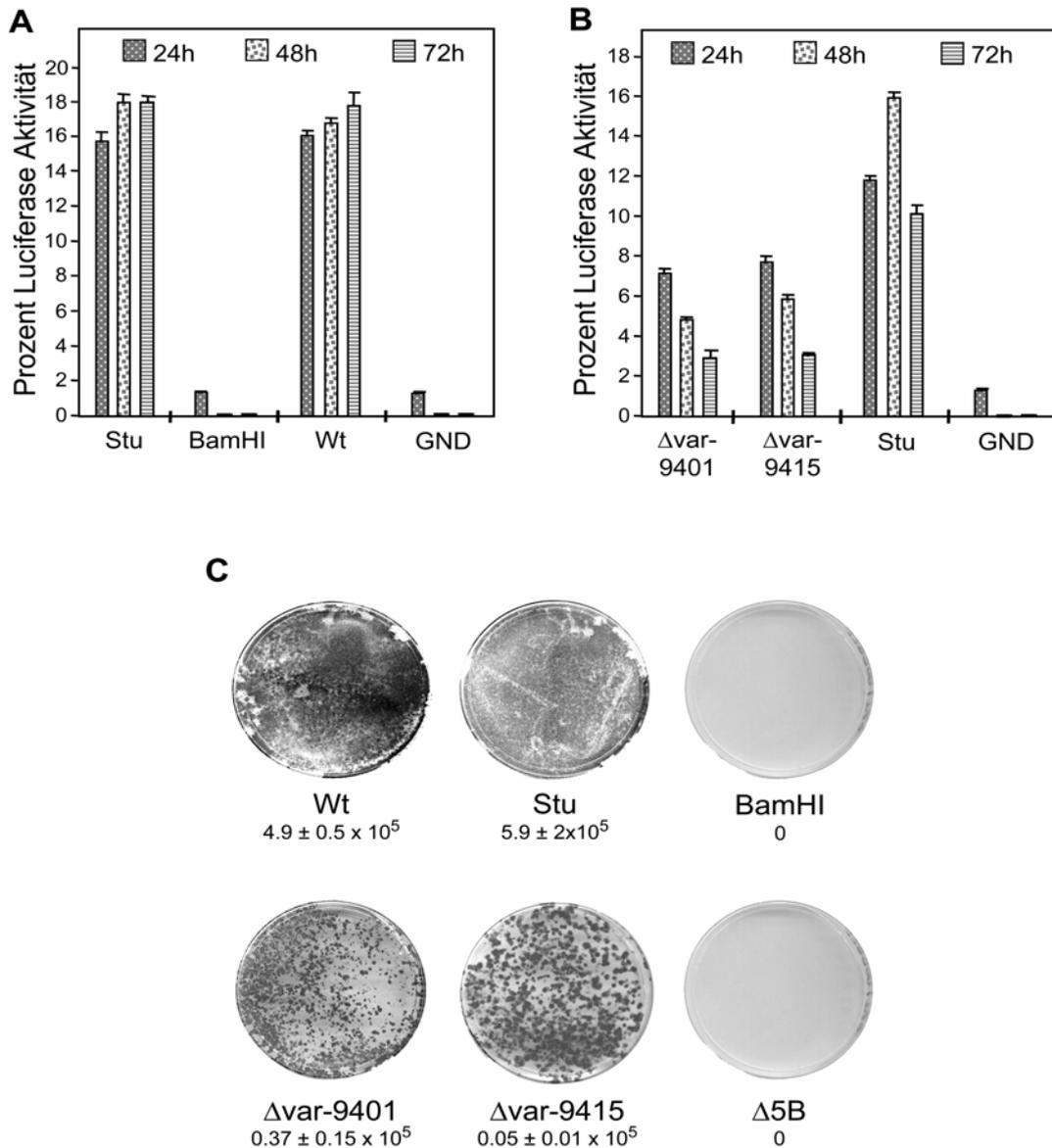


Abbildung 17: Einfluss von Mutationen in der 3' NTR auf die Replikationseffizienz im transienten und selektionierbaren Replikonsystem. A) Ergebnisse des transienten Zellsystems. Getestet wurden die in die 3' NTR eingefügten Mutationen zur Herstellung der *StuI*- bzw. *BamHI*- Schnittstellen. Als Vergleich diente eine Replikon-RNA mit Wildtyp-Sequenz (WT) und eine mit inaktivierenden Mutationen in NS5B (GND). B) Transiente Replikation von Replikon-RNAs, denen entweder ein Teil oder die gesamte variable Region fehlt (Δ var-9401 und Δ var-9415). Als Positivkontrolle diente die RNA mit eingefügter *StuI*-Schnittstelle. C) Effekt von Mutationen in der variablen Region auf die G418 Transduktionseffizienz von selektionierbaren Replikons. 3-4 Wochen nach Transfektion von Huh-7 Zellen mit den angegebenen RNAs und Selektion mit G418 wurden die G418-resistenten Kolonien mit „Coomassie brilliant blue“ fixiert und gefärbt. Die nach Auswertung verschiedener Verdünnungsreihen erhaltene cfu/μg RNA ist unter der jeweiligen Zellschale angegeben.

im selektionierbaren als auch im transienten Zellkultursystem getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Nukleotidsubstitutionen im SL I der X-Sequenz die Replikationskompetenz der HCV-RNA in beiden Systemen zerstörte. Die Einführung der *StuI*-Schnittstelle in die variable Region hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Replikation (Abb. 17A/C).

Aus diesem Grund wurde dieser Klon als Ausgangskonstrukt für weitere Mutationen in der 3' NTR verwendet. Die RNA des Konstruktes NK5.1-Stu diente bei allen Transfektionen als Positivkontrolle und als Referenz für die Normierung der Replikationseffizienz der nachfolgend beschriebenen Mutanten. Eine in der X-Sequenz natürlich vorkommende *NheI*-Schnittstelle wurde zusammen mit der künstlich eingeführten *StuI*-Schnittstelle benutzt, um alle Mutationen in der 3' NTR einzuführen.

Die variable Region der HCV 3' NTR umfasst je nach HCV-Isolat zwischen 21-39 Nukleotiden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HCV-RNAs mit einer Deletion des 5' proximalen Bereichs der variablen Region im Schimpansen infektiös sind (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000). Allerdings waren weder quantitative Aussagen über die Replikationseffizienz möglich, noch konnte die Frage geklärt werden, ob auch der gesamte variable Bereich für die Replikation entbehrlich ist. Aus diesem Grund wurden zwei Konstrukte generiert. Der RNA NK5.1- Δ var-9401 fehlten die Nukleotide 9375-9401. Dies entsprach weitgehend der bereits im Schimpansen getesteten Deletionsmutante (Yanagi *et al.*, 1999). Der Replikon-RNA NK5.1- Δ var-9415 wurde die gesamte variable Region entfernt (Nukleotide 9375-9415). Im transienten Replikationssystem erwiesen sich beide Mutanten als replikationskompetent, zeigten aber eine signifikante Reduktion der Replikation verglichen mit der parentalen RNA NK5.1-Stu (Abb. 17B/C).

Um eine quantitative Aussage über den Einfluss der variablen Region auf die Replikation treffen zu können, wurden beide Mutanten auch im sensitiveren Selektionssystem untersucht. Es zeigte sich, dass die Koloniebildungskompetenz der RNA NK5.1- Δ var-9401 ca. $0,4 \times 10^5$, die der RNA NK5.1- Δ var-9415 ca. $0,05 \times 10^5$ kolonieformenden Einheiten (cfu) pro μg RNA entsprach, verglichen mit einer cfu von ca. 6×10^5 der NK5.1-Stu RNA (Abb. 17C). Dies bedeutet, dass die partielle Deletion der variablen Region die Replikation um den Faktor 10, die Entfernung des gesamten Bereichs die RNA-Synthese 100-fach reduziert. Es muss erwähnt werden, dass aus klonierungstechnischen Gründen der polyU/UC-Bereich der NK5.1- Δ var-9415-RNA durch eine 52 Nukleotide lange, homopolymere Uridin-Sequenz ersetzt wurde. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf die Replikation (s. Kapitel 3.2.2) und erklärt nicht die 10-fach schlechtere Koloniebildungskompetenz der RNA ohne variabler Region (NK5.1- Δ var-9415) verglichen mit der Mutante, die nur eine partielle Deletion besitzt

(NK5.1-Δvar-9401). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die variable Region zwar nicht essentiell für die Replikation ist, diese aber erheblich steigert.

3.2.2 Rolle des polyU/UC-Bereichs für die RNA-Replikation

Obwohl die Länge und Zusammensetzung des polyU/UC-Bereichs bei verschiedenen HCV-Isolaten sehr unterschiedlich ist, spricht die Tatsache, dass alle HCV-Genome eine solche RNA-Sequenz besitzen, für eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus.

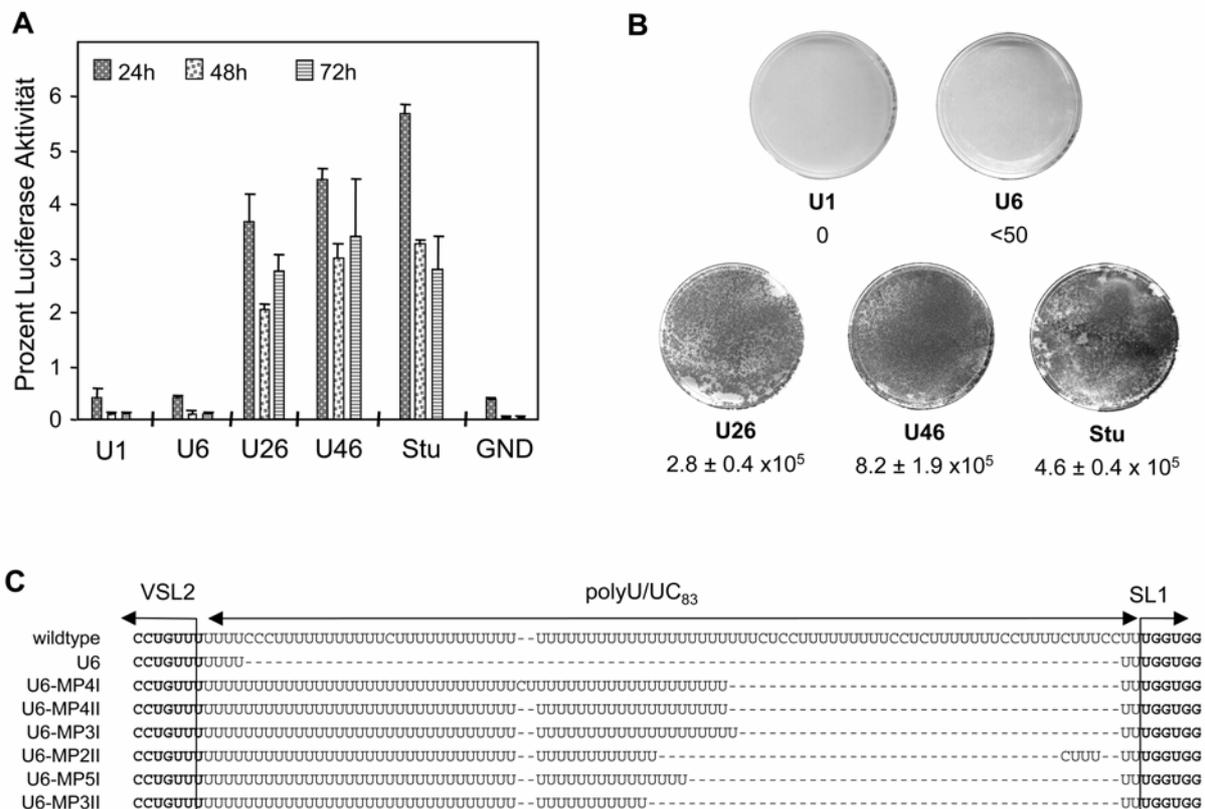


Abbildung 18: Wichtige Rolle des polyU/UC-Bereichs für die RNA-Replikation A) Getestet wurden Replikon-RNAs, bei denen der polyU/UC-Bereich durch 1-,6-,26- und 46-Uridinreste ersetzt wurde. Als Kontrolle diente die Replikon-RNA mit der *Stu*-Schnittstelle in der variablen Region und dem authentischen polyU/UC-Bereich (Stu). B) Anzahl der G418 resistenten Kolonien nach 3-4 wöchiger Selektion. Die cfu/μg RNA ist jeweils unter dem Konstrukt aufgelistet. C) Sequenzanalyse des polyU/UC-Bereich von Replikons, die aus Huh-7 Zellen isoliert werden konnten und die ursprünglich mit U6-Replikon-RNAs transfiziert wurden und nach G418 Selektion resistente Kolonien ausbildeten. Von 6 unabhängigen Kolonien wurde die Replikon-RNA mittel RT-PCR amplifiziert, kloniert und mindestens zwei Klone von jeder RNA sequenziert. Dargestellt ist jeweils nur eine Sequenz; „-“ markieren Deletionen. Die Sequenzen der Bereiche VSL2 und SL1 sind fett gedruckt.

Um den Einfluss dieses Elements auf die Replikation zu überprüfen und die minimal benötigte Länge zu bestimmen, wurde eine Serie von Replikons generiert, in denen die Sequenz zwischen VSL 1 und SL 1 der X-Sequenz (Nukleotidbereich 9415-9507) gegen

homopolymere Sequenzen mit einer Länge von 46, 26, 6 oder einem Uridin-Rest ersetzt wurde (NK5.1-U46, -U26, -U6 und -U1). Im transienten Zellkultursystem replizierten die Replikons NK5.1-U26 und -U46 genauso effizient wie die Positivkontrolle NK5.1-Stu mit einem authentischen polyU/UC-Bereich von 86 Nukleotiden. Die RNAs NK5.1-U6 und NK5.1-U1 zeigten demgegenüber keine messbare Replikation. Diese Ergebnisse wurden im selektionierbaren Replikonsystem bestätigt. Auch hier zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Replikons NK5.1-U46, NK5.1-U26 und NK5.1-Stu hinsichtlich der Koloniebildungskompetenz (Abb. 18A/B). Die RNA NK5.1-U6 war im Gegensatz zur RNA NK5.1-U1, unter G418 Selektion in der Lage, wenige resistente Kolonien zu bilden (weniger als 50 cfu/ μ g RNA). Aufgrund der geringen Anzahl von Kolonien und dem Ergebnis der transienten Untersuchungen, wurde vermutet, dass es sich hierbei um (Pseudo-) Revertanten handelte. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden 6 Zellklone expandiert und die darin enthaltene Replikon-RNA anschließend untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA isoliert, die HCV-RNA mittels RT-PCR amplifiziert und die so erhaltene cDNA kloniert. Die Bereiche der 3' NTR von jeweils zwei Klonen der 6 untersuchten Ausgangskolonien wurden sequenziert und die Auswertung ergab, dass der ursprüngliche 6 Uridin-lange polyU-Bereich bei diesen Revertanten mindestens eine Länge von 40 Nukleotiden besaß (Abb. 18C). Dies bestätigte, dass es sich bei allen Klonen der mit NK5.1-U6-RNA transfizierten Zellen um Revertanten handelte.

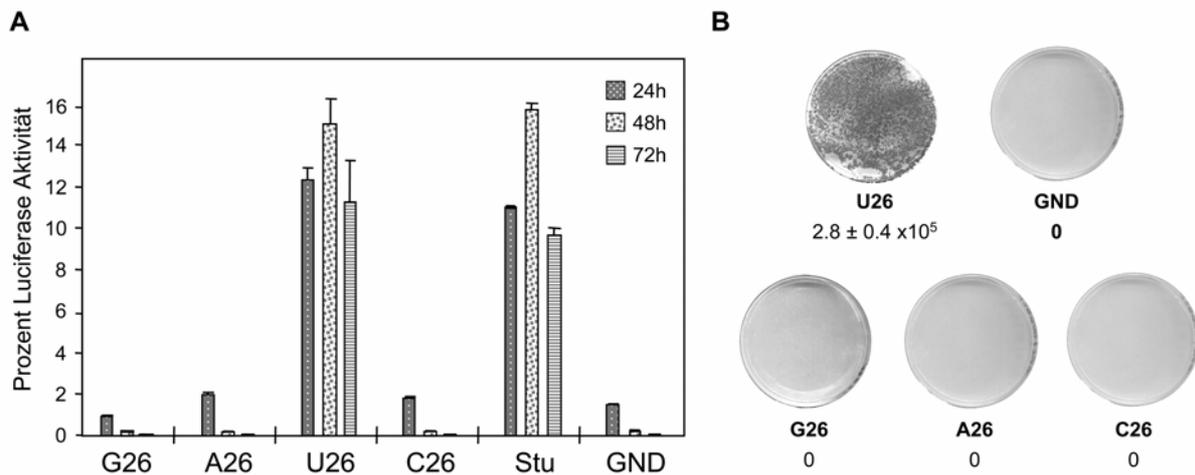


Abbildung 19: Nur HCV-Replikons mit einem polyU-Bereich sind in der Lage zu replizieren A) Replikons mit Luziferase-Reportergen, die entweder einen 26 Nukleotide langen homopolymeren Guanosin-, Adenosin-, Cytosin- oder Uridin-Bereich besitzen, wurden in Huh-7 Zellen transfiziert und die Replikation 4, 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion gemessen. Alle Werte sind auf die Luziferase Aktivität 4 Stunden nach Transfektion normiert (=100%). Als Positivkontrolle diente NK5.1-Stu (Stu), als Negativkontrolle eine replikationsdefiziente RNA (GND). B) Untersuchungen der in A) beschriebenen Replikons im selektionierbaren Replikonsystem. Die cfu/ μ g RNA ist jeweils unter dem Konstrukt aufgelistet.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob auch andere homopolymere Sequenzen die Replikation unterstützen. Zu diesem Zweck wurde der polyU/UC-Bereich gegen 26-Nukleotide lange homopolymere Guanosin-, Adenosin- oder Cytosin-Sequenzen ausgetauscht (NK5.1-G26, NK5.1-A26 und NK5.1-C26). Im transienten Replikationssystem konnte nur die Replikation der NK5.1-U26 beobachtet werden (Abb. 19A). Auch im selektionierbaren Zellkultursystem konnte keine Replikation der RNAs NK5.1-G26, NK5.1-A26 und NK5.1-C26 nachgewiesen werden (Abb. 19B). Da keine Kolonien erhalten wurden war es nicht möglich, eventuelle (Pseudo-) Reversionen zu analysieren.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass ein homopolymerer Bereich mit einer minimalen Länge zwischen 6 und 26 Uridinresten für die Replikation benötigt wird.

3.2.3 Essentielle Rolle der 3'-terminalen X-Sequenz für die RNA-Replikation

Die X-Sequenz des HCV ist stark konserviert. Sie umfasst die letzten 98 Nukleotide des Genoms und bildet wahrscheinlich 3 Stemloopstrukturen aus, von denen nur SL 3 experimentell bestätigt werden konnte (Blight & Rice, 1997). Um die Bedeutung dieser Region für die Replikation zu untersuchen, wurde zuerst ein Konstrukt generiert, dem die gesamte X-Sequenz fehlt ($\Delta 3'X$). Aus technischen Gründen endete diese RNA mit einer homopolymeren Sequenz von 50 Uridinresten, gefolgt von den Nukleotiden „AGU“, die für die *Scal*-Schnittstelle zur Herstellung von „run-off in vitro Transkripten“ benötigt wurden. Diese RNA (NK5.1- $\Delta 3'X$) war nicht mehr in der Lage zu replizieren (Abb. 20). Um den Stemloop zu identifizieren, der für den Verlust der RNA-Vermehrung verantwortlich ist, wurden drei weitere Mutanten hergestellt, denen jeweils einer der drei Stemloops fehlte (NK5.1- $\Delta SL1$, NK5.1- $\Delta SL2$ oder NK5.1- $\Delta SL3$). Um die Klonierungen zu vereinfachen, wurden die Deletion von SL2 und SL3 in ein Replikon eingeführt, das am 3' Ende 46 Uridinreste besaß, während die Deletion von SL1 in ein Replikon eingeführt wurde, das am 3' Ende 50 Uridinreste besaß. Darüber hinaus endet das Konstrukt NK5.1- $\Delta SL3$ mit einem SL2, der am 3' terminal noch die Nukleotide „GU“ trug, um die *Scal*-Schnittstelle zu erhalten (s. oben). Keines dieser Replikons erwies sich als replikationskompetent was die essentielle Rolle der gesamten X-Sequenz am 3' Ende des HCV-Genoms belegte (Abb. 20).

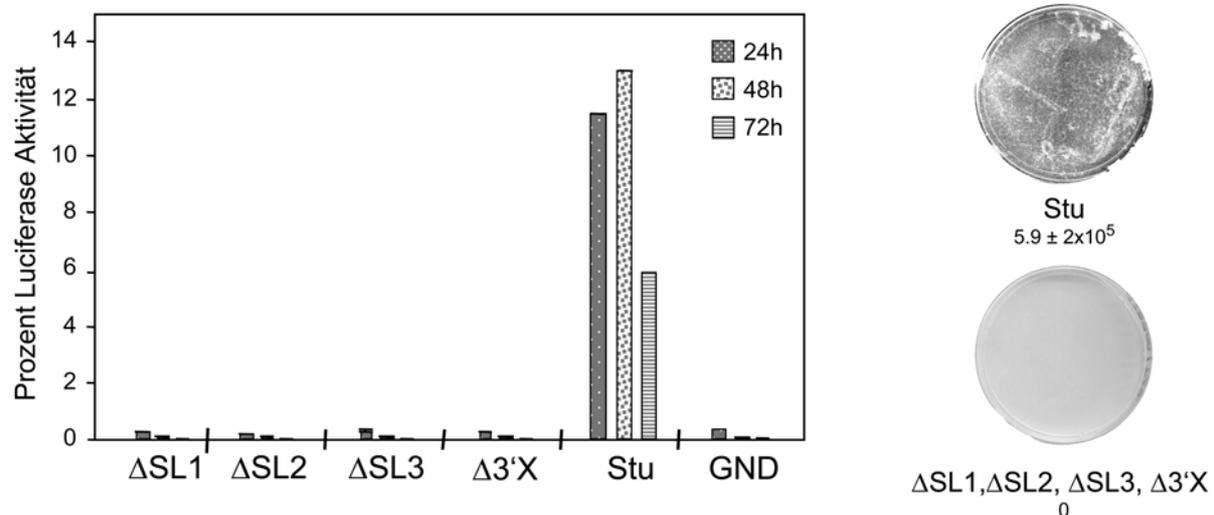


Abbildung 20: Ergebnisse aus dem transienten und selektionierbaren Replikonsystem mit Replikon-RNAs, denen entweder SL1, SL2, SL3 oder der gesamte X-Bereich fehlt. Links: Alle Luciferase Aktivitäten sind auf die Aktivität 4 Stunden nach Transfektion (=100%) normiert. Rechts: Die cfu/µg RNA ist jeweils unter dem Konstrukt aufgelistet. Die cfu/µg RNA der Negativkontrolle betrug 0.

Um zu überprüfen, ob die Reihenfolge von SL1 und 2 für die Replikation von Bedeutung ist, wurde ein Replikon hergestellt, in dem die Positionen dieser beiden Stemloops vertauscht wurden (ET-SL1 \leftrightarrow 2; Abb. 21A). Diese Mutationen wurden im Kontext eines Replikons durchgeführt, das zwei adaptiven Mutationen in NS3 (E1202G, T1280I) und eine in NS4B (K1846T) trug („ET“-Kontext). Das Ergebnis in Abbildung 22 zeigt, dass diese Mutante nicht mehr in der Lage war, zu replizieren (Abb. 22; ET-SL1 \leftrightarrow 2). Es ist jedoch unklar, ob dies auf die Orientierungsveränderung von SL1 und SL2 per se oder auf grundlegende Veränderungen der RNA-Struktur zurückzuführen ist.

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben führen die Mutationen in der RNA NK5.1-BamHI zu einem Verlust der Replikationskompetenz. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Struktur, sondern auch die Primärsequenz dieser Region wichtig für die Replikation ist. Um auch einen ersten Eindruck über die Rolle von SL2 bzw. SL3 bei der RNA-Replikation zu gewinnen, wurden auch in diese Bereiche Mutationen eingefügt.

So wurde im Stem des SL2 analog zu der Mutation in SL1 eine C-G Basenpaarung (Position 9533 und 9553; Replikon ET-SL2m) durch eine A-U Basenpaarung ersetzt und der Stem dadurch möglicherweise destabilisiert (Abb. 21B). Des Weiteren wurde eine RNA hergestellt (Replikon ET-SL2'), in der die Primärsequenz des Stems verändert wurde unter Beibehaltung der Basenpaarung aber Verkürzung des Stems um ein Basenpaar (Abb. 21B; ET-SL2'). Allerdings war keine der beiden HCV RNAs in der Lage zu replizieren (Abb. 22; ET-SL2m

und ET-SL2'). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass entweder die Sequenz oder die Stabilität des Stems von SL2 essentiell für die Replikation ist.

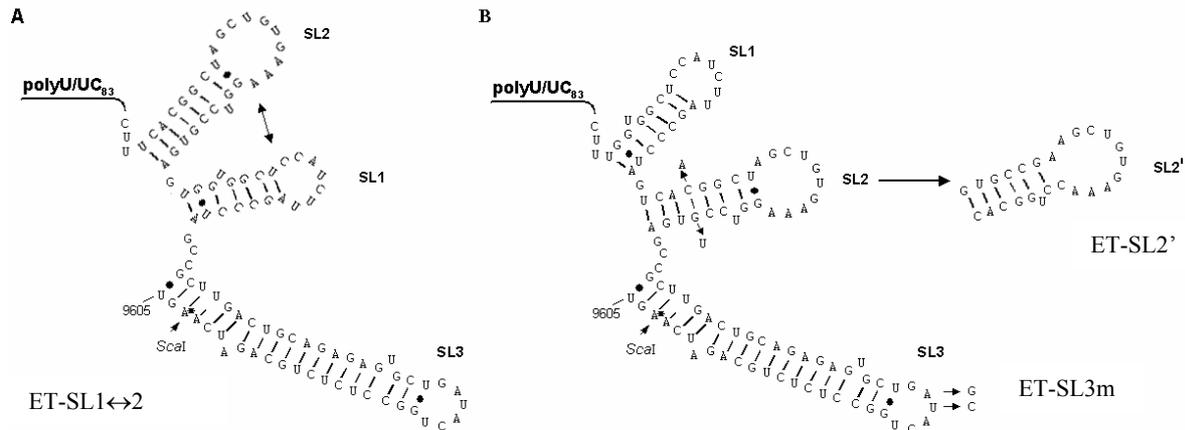


Abbildung 21: Die dargestellte Struktur des 3' Endes des Replikons ET-SL1↔2 ist hypothetischer Natur. Es wurden keine experimentellen Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt. Dargestellt ist nur die X-Sequenz, der polyU/UC- Bereich ist angedeutet. B) Die in den Bereich von SL2 (Replikon ET-SL2m) und SL3 (Replikon ET-SL3m) eingefügten Mutationen sind mit Pfeilen markiert. SL2' zeigt die potenzielle Struktur des veränderten Stemloops im Replikon ET-SL2'.

Um die Bedeutung des SL3 etwas näher zu charakterisieren, wurde eine RNA mit zwei Nucleotidsubstitutionen im Loopbereich hergestellt (Replikon ET-SL3m). Hierzu wurden die Nucleotide „AU“ an Position 9581 und 9582 gegen die Nucleotide „GC“ ersetzt (Abb. 21B). Diese Veränderung der Loopsequenz resultierte in einer leicht verminderten Replikationskompetenz der HCV RNA (Abb. 22; ET-SL3m).

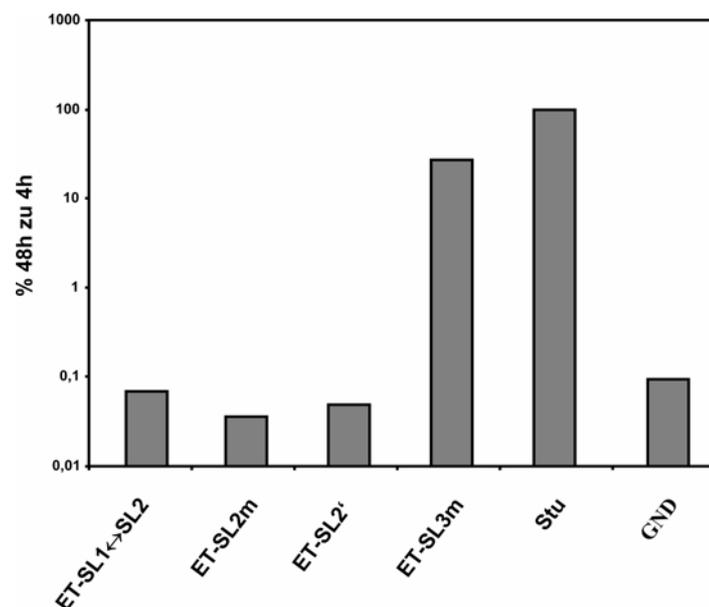


Abbildung 22: Essentielle Rolle des SL2 in der X-Sequenz für die RNA-Replikation. Replikon-RNAs die das Luziferase Reportergen besitzen wurden in Huh-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 4, 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion lysiert und die Luziferase Aktivität bestimmt. Um die Analyse zu vereinfachen, wurde die Replikation als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität, gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion, angegeben. Als Positivkontrolle wurde ET-Stu, als Negativkontrolle das GND-Replikon mitgeführt.

Insgesamt weisen diese Versuchsergebnisse und eine wichtige Rolle der X-Sequenz für die RNA-Replikation hin.. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um die für die RNA-Vermehrung essentiellen Sequenzen und Strukturen genauer zu kartieren (s. auch Kapitel 3.3).

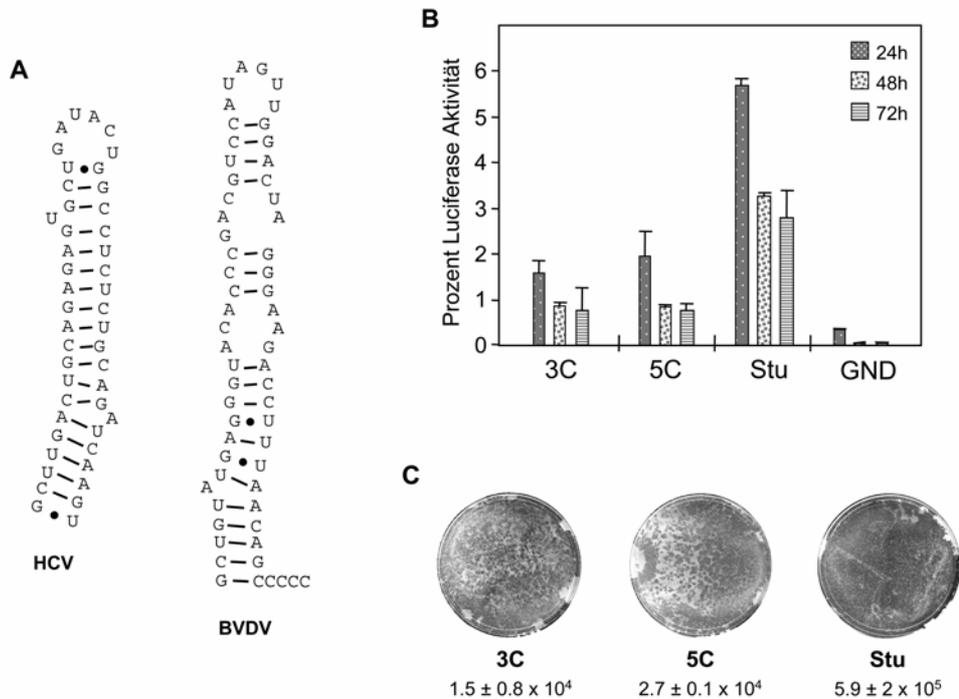


Abbildung 23: A) Sekundärstrukturen der terminalen Stemloops von HCV (Blight et al., 1997) und BVDV (Yu et al., 1999). B) Transiente Replikation der Luziferase Replikons mit zusätzlichen 3 bzw. 5 Cytosinen am 3' Ende der HCV 3' NTR. C) Koloniebildungskompetenz der selektierbaren Replikons mit 3 bzw. 5 Cytosinen am 3' Ende der HCV 3' NTR. Die cfu/μg RNA sind unter den Konstruktnamen angegeben.

Im Zusammenhang mit der X-Sequenz sollte weiterhin überprüft werden, ob eine Veränderung des authentischen 3' Endes einen Einfluss auf die RNA-Replikation hat. Für die virale NS5B-Polymerase konnte in vitro gezeigt werden, dass sie die RNA-Synthese de novo initiieren kann und dieser Mechanismus wird auch in vivo vermutet (Luo *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000). Obwohl die Polymerase auch ATP als Initiationsnukleotid nutzen kann, ist die effizienteste de novo Initiation mit GTP beobachtet worden, d.h. mit einer RNA-Matrize mit einem 3' terminalen Cytosin-Rest. Das 3' Ende des naheverwandten Pestivirus BVDV endet mit 3 bis 5 ungepaarten Cytidinresten (Abb. 23A). Da sich das BVDV sehr effizient in Zellkultursystemen vermehrt, sollte untersucht werden, ob 3 bzw. 5 zusätzliche ungepaarte Cytidinreste am 3' Ende des HCV Genoms eine Verbesserung der Replikation bewirken. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Mutationen (NK5.1-3C bzw. -5C) in ein Replikon eingeführt, das zwei adaptive Austausche in NS3 (E1202G, T1280I) und einen in NS5A (S2197P) trug. Beiden RNAs replizierten deutlich schlechter als

die Referenz mit authentischem 3' Ende (Abb. 23B/C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein 3' terminaler Uridinrest wichtig für die HCV-Minusstrangsynthese ist und dass die Mechanismen der BVDV- und HCV-Replikation deutlich von einander abzuweichen scheinen.

3.2.4 Einfluß von Mutationen in der 3' NTR auf RNA-Stabilität und RNA-Translation

Da es Vermutungen gab, dass die 3' NTR Einfluss auf die RNA-Stabilität des HCV-Genoms haben könnte (Fang 2000), musste überprüft werden, ob der Verlust der Replikation der 3' NTR Mutanten mit einer Destabilisierung der RNA korreliert. Zu diesem Zweck wurde die Halbwertszeit der RNAs bestimmt. Nach Elektroporation der verschiedenen Mutanten-RNAs in Huh-7 Zellen wurde die Gesamt-RNA 2, 4 und 8 Stunden nach Transfektion isoliert und die Menge an HCV-RNA mittels Northern-Hybridisierung und Phospho-Imaging quantifiziert. Unterschiedliche RNA-Mengen, die auf das Gel aufgetragen wurden, wurden durch Bestimmung der β -Aktinmenge korrigiert und die 4 und 8 Stunden Werte wurden auf den 2 Stundenwert normiert. Die Auswertung dieses Experiments zeigte, dass keine der eingeführten Mutationen eine signifikante Veränderung der RNA-Stabilität bewirkte (Abb. 24A/B). In allen Ansätzen konnte die RNA auch 8 Stunden nach Transfektion noch detektiert werden. Die vergleichbare Menge der RNA 8 Stunden nach Transfektion zwischen replizierender Positivkontrolle (NK5.1-Stu) und nicht replizierender Negativkontrolle (GND) zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt neu synthetisierte RNA keinen Einfluss auf die Messung hat. Somit kann der Verlust der Replikation der untersuchten Mutanten nicht durch eine Destabilisierung der Replikon-RNA erklärt werden.

Neben einem Einfluss auf die RNA-Stabilität wird der Einfluss der 3' NTR auf die RNA-Translation kontrovers diskutiert (Ito *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2001). Um die Auswirkungen der oben beschriebenen Mutationen auf die IRES Aktivität zu untersuchen, wurde ein bicistronisches Konstrukt generiert. In diesem wird die Translation der Renilla-Luziferase von der HCV-IRES und die der Luziferase des Leuchtkäfers von der EMCV-IRES kontrolliert (Abb. 25A). In diesem Replikonaufbau dient die Expression der Luziferase des Leuchtkäfers als interner Standard während die der Renilla-Luziferase die Aktivität der HCV-IRES und somit den Einfluss der verschiedenen 3' NTRs widerspiegelt. Dieser Aufbau erlaubt die Messung der IRES-Aktivität unabhängig von der RNA-Replikation. Die 3' NTR Mutationen Δ SL1, Δ SL2, Δ SL3, Δ 3'X, Δ var-9215, Δ var-9401, U46, U26 und U6 wurden

zuerst in diesem Kontext mit Hilfe der *in vitro* Translation Retikulozytenlysat aus Kaninchen getestet. Die Proteine wurden dabei durch den Einbau von ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert

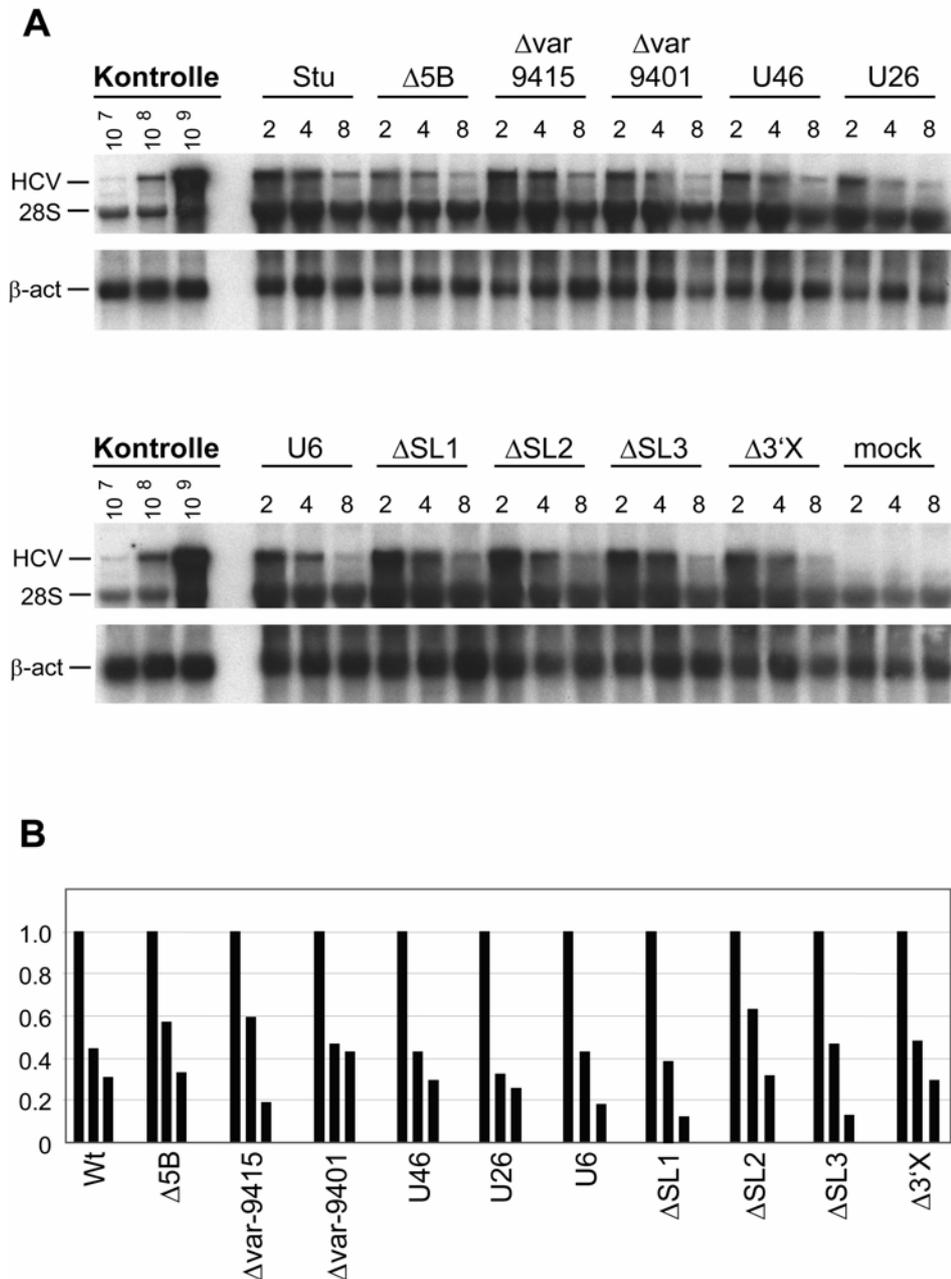


Abbildung 24: Keine Auswirkungen von Mutationen in der 3' NTR auf die RNA-*in vitro* Translation A) Huh-7 Zellen wurden mit *neo*- Replikons, die die angegebenen Mutationen in der 3' NTR trugen, transfiziert und 2, 4 und 8 Stunden später lysiert. Die Gesamt-RNA wurde präpariert und mittels Northern-Hybridisierung analysiert. Als Größenmarker dienten *in vitro* transkribierte RNAs definierter Menge (10^7 , 10^8 und 10^9 RNA-Moleküle). Die Positionen der Replikon-, Beta-Aktin (β -act)- und 28S-rRNA sind links angegeben. B) Die Menge der Replikon-RNA wurde mittels Phospho-Imaging quantifiziert und die Werte auf die β -Aktin Signale normalisiert. Die RNA-Menge, die nach 2 Stunden detektiert werden konnte, wurde auf 1 gesetzt. Als Kontrolle dienten sowohl die NK5.1-Stu- (wt), als auch die GND-RNA. Es ist zu bemerken, dass sich 8 Stunden nach Transfektion die RNA-Menge dieser beiden Kontrollen nicht signifikant unterscheidet und die Messung bis zu diesem Zeitpunkt nicht durch RNA-Replikation verfälscht wurde.

und nach Auftrennung mittels SDS-Page mit Hilfe eines Phospho-Imagers quantitativ ausgewertet. In diesem in vitro System zeigte keine Mutation in der 3' NTR einen Einfluss auf die IRES-abhängige Translation (Abb. 25B). So war die Menge der exprimierten Renilla-Luziferase nach Normalisierung auf den internen Standard bei allen RNAs vergleichbar.

Um den Einfluß der verschiedenen 3'NTRs auch in Zellkulturen zu überprüfen, wurden die entsprechenden Konstrukte in Huh-7 Zellen transfiziert und die Luziferase-Aktivitäten 3 Stunden nach Transfektion gemessen. Auch hier zeigten sich nach Normalisierung auf den internen Standard keine signifikanten Unterschiede der HCV-IRES Aktivitäten im Kontext der verschiedenen 3' Enden (Abb. 25C).

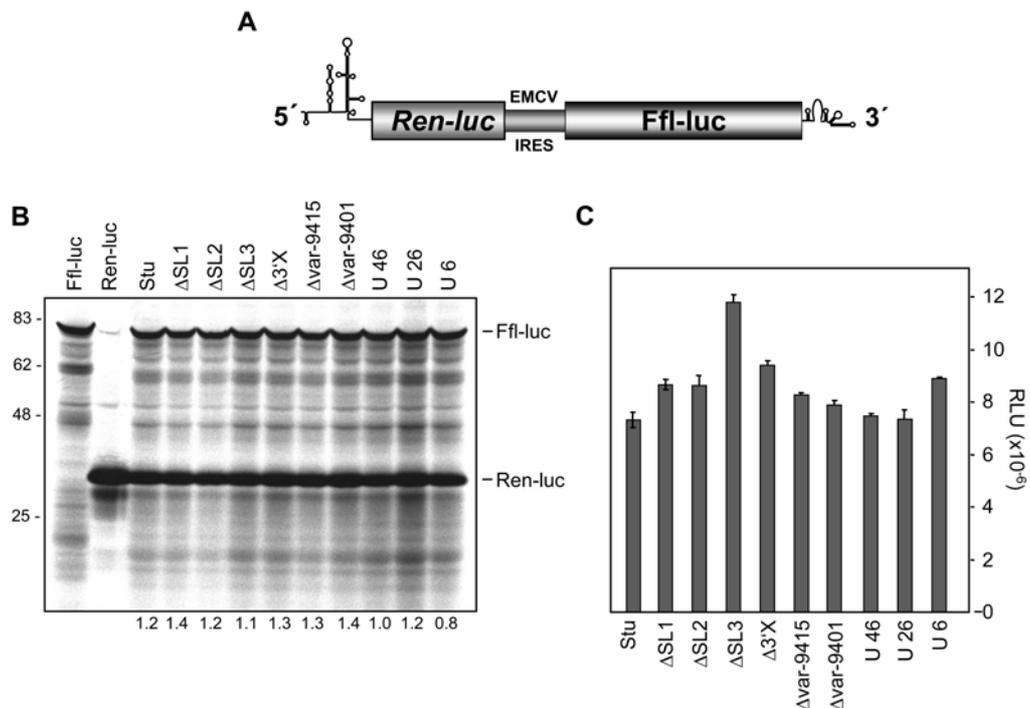


Abbildung 25: Keine Auswirkungen von Mutationen in der 3' NTR auf die RNA-Translation in Zellkultur
 A) Schematische Darstellung des bicistronischen Reporterkonstrukts. Die *Renilla*-Luziferase (*Ren-luc*) steht unter der translationellen Kontrolle der HCV-IRES, die Luziferase des Leuchtkäfers (*Ffl-luc*) unter der Kontrolle der EMCV-IRES. Die NTRs sind mit ihrer Sekundärstruktur gezeigt. B) In vitro Translationen der bicistronischen Reporterkonstrukte, die die angegebenen Mutationen in der 3' NTR besitzen. Als Kontrolle wurden RNAs translatiert, die entweder nur die *Renilla*- oder die Leuchtkäfer-Luziferase kodieren. Die Zahlen unter den Spalten beziehen sich auf das relative Verhältnis der Expression der beiden Reporterproteine. Die Proteine sind rechts spezifiziert, links ist der molekulare Massenstandard angegeben (in kDa). C) Translationseffizienz der verschiedenen bicistronischen RNAs in Huh-7 Zellen. Luziferase Aktivitäten wurden 3 Stunden nach Transfektion der Zellen gemessen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die relativen Lichteinheiten (RLU) der *Renilla*-Luziferase, normalisiert auf die Leuchtkäfer-Luziferase Aktivität, die als interner Standard diente.

Um die Auswirkungen der 3' NTR auf die Translation in einem authentischeren Zusammenhang zu untersuchen, wurden in vitro Translationen wie oben beschrieben im Kontext des selektionierbaren Replikons durchgeführt. In diesem Ansatz wurde NS3 als

interner Standard verwendet während die Expression des Neomycin-Phosphotransferase-Proteins die Aktivität der HCV-IRES widerspiegelte. Dieser Versuch bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse. Dasselbe gilt auch für Expressionsversuche in Huh-7 Zellen, in denen Replikons mit der Luziferase des Leuchtkäfers verwendet wurden. In diesem Fall wurde die Luziferase-Aktivität auf die Expression von NS5B normalisiert, die mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.3 RNA-Elemente innerhalb der kodierenden Regionen des HCV

Für viele RNA Viren mit positiver Polarität wurden - neben RNA-Signalen in den NTRs - weitere „cis-aktive Elemente“ („CRE“ = „cis-acting RNA elements“) innerhalb der kodierenden Sequenz beschrieben. Eines der am besten studierten Beispiele hinsichtlich der RNA-Replikation sind die „CREs“ der Picornaviren, zu denen unter anderem das menschliche Rhinovirus-14 (HRV-14), das Poliovirus (PV) und das Mengo Virus gehören. In diesen Fällen besteht die Funktion des „CRE“ darin als Matrize für die „Uridylylierung“ des genomgebundenen Proteins (VPg) zu dienen (Paul *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 2000). Dabei ist die Funktion des „CRE“ positions-unabhängig, d.h. seine Translokation innerhalb des Genoms führt zu keinem Funktionsverlust.

Phylogenetische und thermodynamische Untersuchungen des HCV-Genoms weisen ebenfalls auf das Vorhandensein hoch konservierter RNA-Sekundärstrukturen in der kodierenden Region hin. Diese potenziellen RNA-Strukturen sind über das gesamte Genom verteilt, konzentrieren sich aber besonders auf die kodierenden Bereiche des Core- und des NS5B-Proteins (Hofacker *et al.*, 1998; Rijnbrand *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997; Tuplin *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten RNA-Sekundärstrukturen liegen im Bereich der Core-kodierenden Region sowie im Bereich der NS5A- und NS5B-Gene. Die Untersuchungen der Sequenzen im 5' Bereich der NS5B-kodierenden Region (Nukleotidposition 8544-8529) weisen darauf hin, dass diese Region potenziell mit der Nukleotidsequenz 95-110 innerhalb der 5' NTR interagieren kann (Turner 2004). Weiterhin wurden RNA-Sekundärstrukturen im 3' Ende der NS5B-kodierenden Region vorhergesagt, deren mögliche Relevanz für die Virusreplikation jedoch ungeklärt war.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mit Replikons durchgeführt, die ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle der Poliovirus-IRES trugen und die zwei adaptive Mutationen in NS3 (E1202G, T1280I) sowie eine in NS4B (K1846T) besitzen („ET“-Kontext). Als Meßsystem wurde hauptsächlich das transiente Replikonsystem verwendet; Abweichungen sind im Text angegeben. Um die Analyse zu vereinfachen, wird in den hier beschriebenen Experimenten die Replikation als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivitäten angegeben, die 48 Stunden und 4 Stunden nach der Transfektion gemessen wurden.

3.3.1 Einfluss von Core-RNA-Strukturen auf die HCV-Replikation

Im Bereich der Core-kodierenden Region wurden zwei mögliche RNA-Strukturen identifiziert, die in allen untersuchten HCV-Sequenzen konserviert waren (Tuplin *et al.*, 2002). Mit Hilfe des Strukturvorhersageprogramms „mfold“ wurden die entsprechenden Sequenzbereiche für das hier verwendete HCV Con1-Isolat untersucht. Die vorhergesagten RNA-Strukturen sind in Abbildung 26 dargestellt.

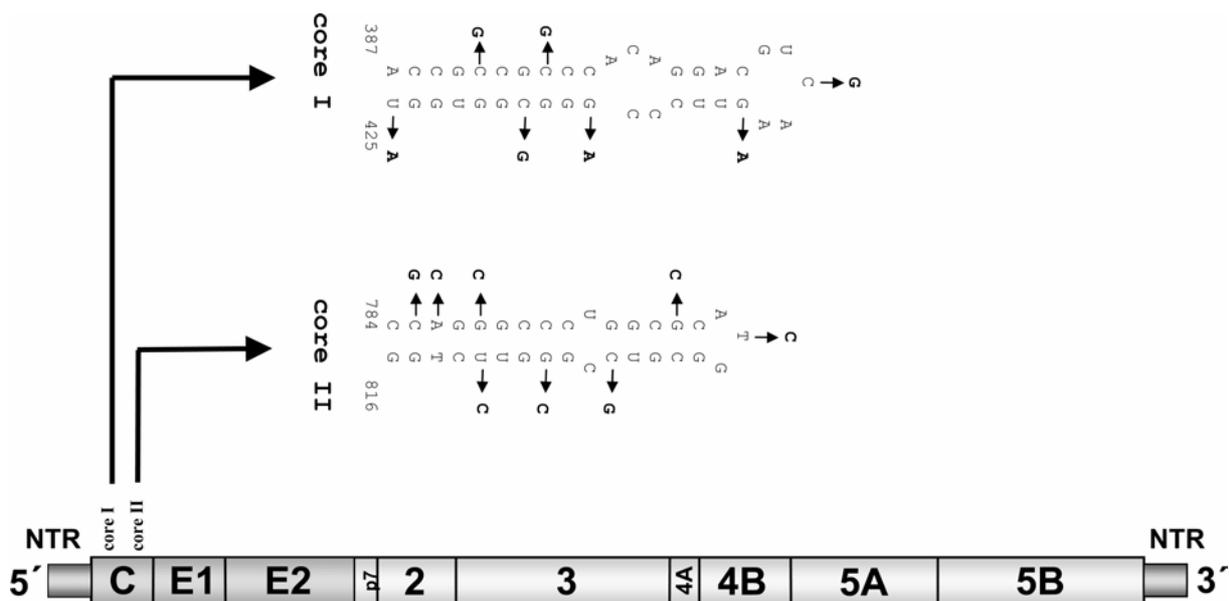


Abbildung 26: Dargestellt sind die Sekundärstrukturen der RNA-Elemente in der Core-kodierenden Region; die eingefügten stillen Mutationen sind mit Pfeilen gezeigt (oben; coreI und coreII). Unten: Relative Lage der RNA-Strukturen im HCV Genom. Die NTRs sind als Boxen angedeutet, der Bereich der Strukturproteine ist dunkel, der Bereich der Nichtstrukturproteine ist hell unterlegt.

Die RNA-Elemente wurden als coreI (Nukleotidposition 338-425) und coreII (Nukleotidposition 784-816) bezeichnet und entsprechen den vorhergesagten Stemloops SL47 und SL443 identifiziert von Tuplin und Mitarbeitern (2002). Die Tatsache, dass subgenomische HCV Replikons auch ohne die Sequenzen der Strukturproteine und damit ohne die Core-Region, in der Lage sind, in Huh-7 Zellen zu replizieren, bedeutete, dass diese RNA-Elemente für die Replikation nicht essentiell sind. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass diese RNA-Strukturen die Replikation möglicherweise beeinflussen. Um einen solchen Einfluss zu analysieren, wurde ein Replikon hergestellt, bei dem der Bereich der Core-kodierenden Region in die RNA integriert wurde. Der Aufbau der RNA entsprach weitgehend

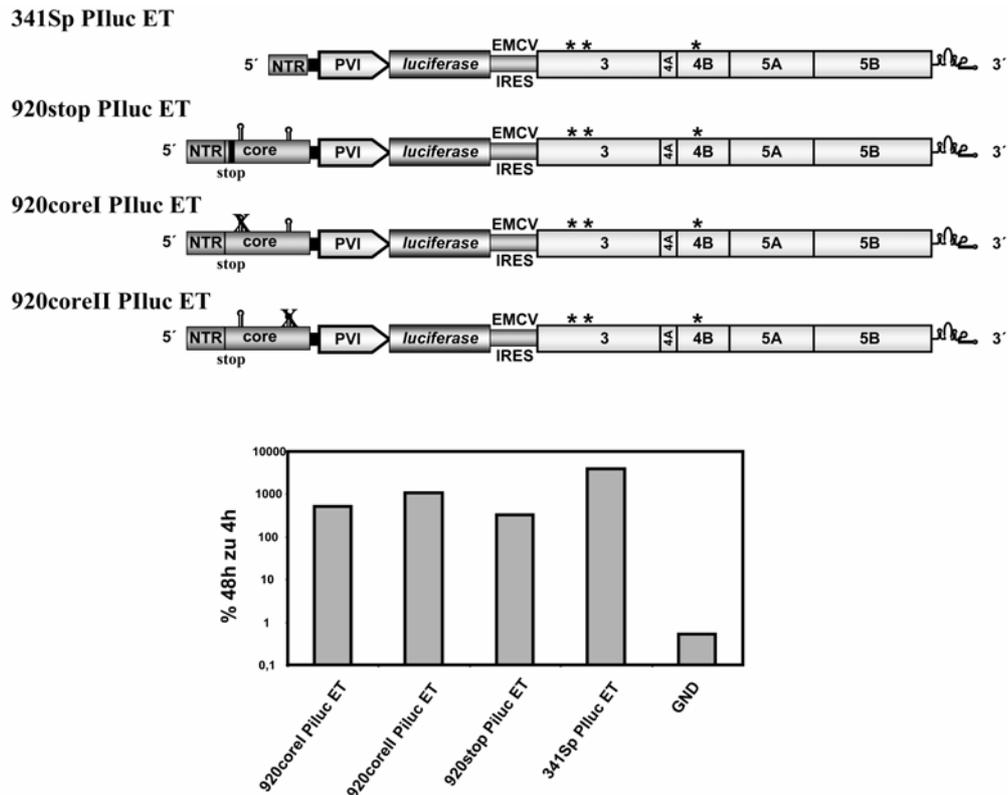


Abbildung 27: Kein Einfluss der RNA-Strukturen in der Core-kodierenden Region für die HCV-Replikation. Oben: Übersicht über die Replikon-Konstrukte, die für die Analyse der RNA-Elemente in der Core-kodierenden Region verwendet wurden. Die Namen der verschiedenen Replikons sind links angegeben. Die 5' NTR und die angrenzende Core-kodierende Region sind dunkel unterlegt, die RNA-Elemente sind schematisiert, Veränderungen der Strukturen sind mit einem „X“ angedeutet. Die Poliovirus IRES (PVI) ist als heller Pfeil, die EMCV-IRES als dünne Linie dargestellt. Die 3' NTR ist mit ihrer Struktur wiedergegeben. Die adaptiven Mutationen sind mit „*“ markiert. Unten: Einfluss der RNA-Elemente in der Core-kodierenden Region auf die transiente Replikation. Die Replikation ist als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität 48 Stunden und 4 Stunden nach der Transfektion angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI-, als Negativkontrolle die GND-RNA mitgeführt.

dem des Replikons 341-sp-PVI-ET (Kapitel 3.1 und Abb. 9A). Allerdings wurden nicht nur die ersten 341 Nukleotide des HCV Genoms mit dem 5' Ende der Poliovirus-IRES fusioniert, sondern die ersten 920 Nukleotide. Dabei umfasst die Sequenz 342-920 den für das Core-kodierenden Bereich. Von diesem Replikon ausgehend wurden drei Mutanten generiert. In dem ersten wurde die Ausbildung der Struktur des coreI-Elements durch stille Mutationen verhindert (920coreI PVI-ET; Abb. 27). In der RNA 920coreII PVI-ET (Abb. 27) betrafen die stillen Mutationen den Bereich der coreII-Struktur. Die RNA 920Stop PVI-ET (Abb. 27) diente hingegen als Kontrolle, ob die Expression des Core-Proteins in den zwei genannten RNAs eine Auswirkung auf die RNA-Replikation hatte. Diese RNA besaß unmittelbar nach dem Startkodon (Position 342) zwei eingefügte Stopkodons (Position 357 und 363), durch die die Expression des Core Proteins verhindert wurde. Weiterhin besaß sie beide RNA-Strukturen in der Core-kodierenden Sequenz. Eine weitere Referenz, die sowohl die core-

Strukturen besaß, als auch die Expression des Core-Proteins erlaubte, konnte in der hier zur Verfügung stehenden Zeit nicht mehr hergestellt werden.

Die Untersuchungen in der transienten Replikation ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei getesteten Konstrukten. Allerdings zeigten die RNAs mit dem Core-kodierenden Anteil eine leicht reduzierte Replikationseffizienz in Bezug zur Referenz-RNA (Abb. 27; 341-sp-PVI-ET).

3.3.2 Einfluss von Core-RNA-Strukturen auf die HCV-IRES vermittelte RNA-Translation

Eine weitere Untersuchung galt dem Einfluss der Elemente auf die HCV-IRES vermittelte Translation. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nur ein erster Eindruck hinsichtlich dieser Fragestellung für das coreI-Element gewonnen werden. Für die Untersuchung wurde ein Replikon hergestellt, bei dem die Sequenzregion, die das coreI-Element umfasst, an die HCV-IRES fusioniert. Als Meßsystem für die Translationsaktivität der HCV-IRES diente das Luziferase-Reportergen (Abb. 28). Als Kontrolle für das Replikon mit inaktivierter coreI-Struktur (Replikon 1-480coreIubilucEI NS3-3') wurde eine analoge RNA mit der intakten RNA-Struktur verwendet (Replikon 1-480ubilucEI NS3-3'). Erste Untersuchungen ergaben hinsichtlich der Translation 4 Stunden nach Transfektion der Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Luziferase Expression, die als Maß für die Translationsaktivität der IRES verwendet wurde (Abb. 28). Allerdings wurde in diesem Versuch nicht auf die Transfektionseffizienz normiert. Erstaunlicherweise zeigte die RNA mit inaktivierter coreI-Struktur 48 Stunden nach Transfektion eine Faktor 8-10 verminderte Luziferase-Aktivität (Abb. 28). Es konnte bislang noch nicht geklärt werden, ob dies auf eine verminderte Replikationskompetenz oder IRES-Translation dieser RNA zurückzuführen war.

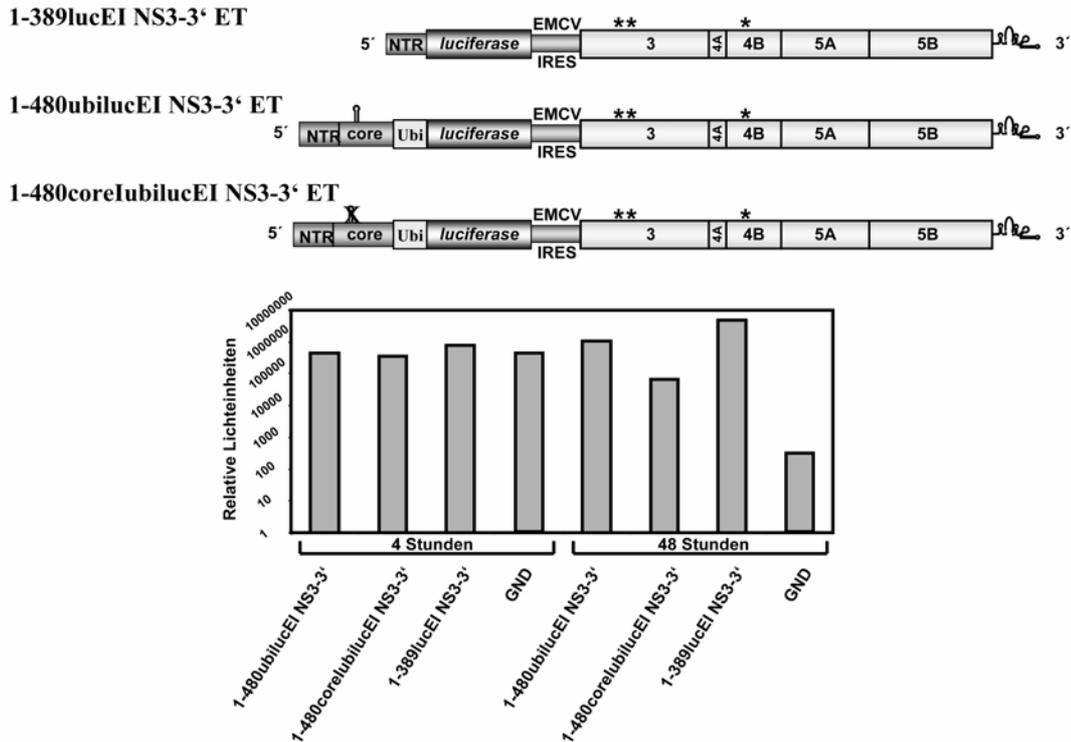


Abbildung 28: Einfluss der RNA-Elemente in der Core-kodierenden Region auf die HCV-IRES vermittelte Translation. Oben: Übersicht über die Replikon-Konstrukte, die für die Analyse des coreI-Elemente verwendet wurden. Die 5' NTR und die angrenzende Core-kodierende Region sind dunkel unterlegt, die Struktur des coreI-Elements ist schematisiert. Veränderungen der Struktur ist mit einem „X“ angedeutet. Die Poliovirus IRES (PVI) ist als heller Pfeil, die EMCV-IRES als dünne Linie dargestellt. Die 3' NTR ist mit ihrer Struktur wiedergegeben. Die adaptiven Mutationen sind mit „**“ markiert. Unten: Gezeigt sind die relativen Lichteinheiten der Luziferase Aktivität gemessen 4 und 48 Stunden nach Transfektion der angegebenen RNAs in Huh-7 Zellen. Die hier angegebenen Werte wurden nicht auf die Aktivität 4 Stunden nach der Transfektion normiert.

Die Ergebnisse eines weiteren Experiments sprachen für den Einfluss des coreI-Elements auf die IRES-vermittelte Translation. Dabei wurden die Auswirkungen der Inaktivierung des coreI-Elements im Kontext von vollständigen HCV-Genomen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Huh-7 Zellen 24 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Menge exprimierten Core-Proteins mittels ELISA (Ortho Clinical Diagnostics) nach Angaben des Herstellers gemessen. Hierbei stellte sich wiederholt heraus, dass HCV-RNAs mit inaktivierter coreI-Struktur eine um den Faktor 5-10 reduzierte Menge HCV-Core-Protein exprimieren (Daten nicht gezeigt). In Kombination mit den Ergebnissen der subgenomischen Replikons sprachen diese Befunde für einen Einfluss des coreI-Elements auf die IRES vermittelte Translation. So wurde die IRES-Aktivität in Abwesenheit der coreI-Struktur geschwächt. Ob dies auf eine Reduktion der Halbwertszeit der RNA zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden.

3.3.3 Einfluss von RNA-Strukturen in der kodierenden Region auf die HCV-Replikation

Eine weitgehende Analyse des HCV Genoms ergab noch zahlreiche weitere potentielle RNA-Strukturen. Eine davon liegt in der Mitte von NS5A (Nukleotidsequenzen 6778 – 6845, entsprechend als SL6778 bezeichnet) und zwei weitere in der 5' Hälfte von NS5B (Abb. 29; Nukleotidsequenzen 8835-8391 [= SL8835] und 8578-8659 [= SL8578]). Dabei entspricht

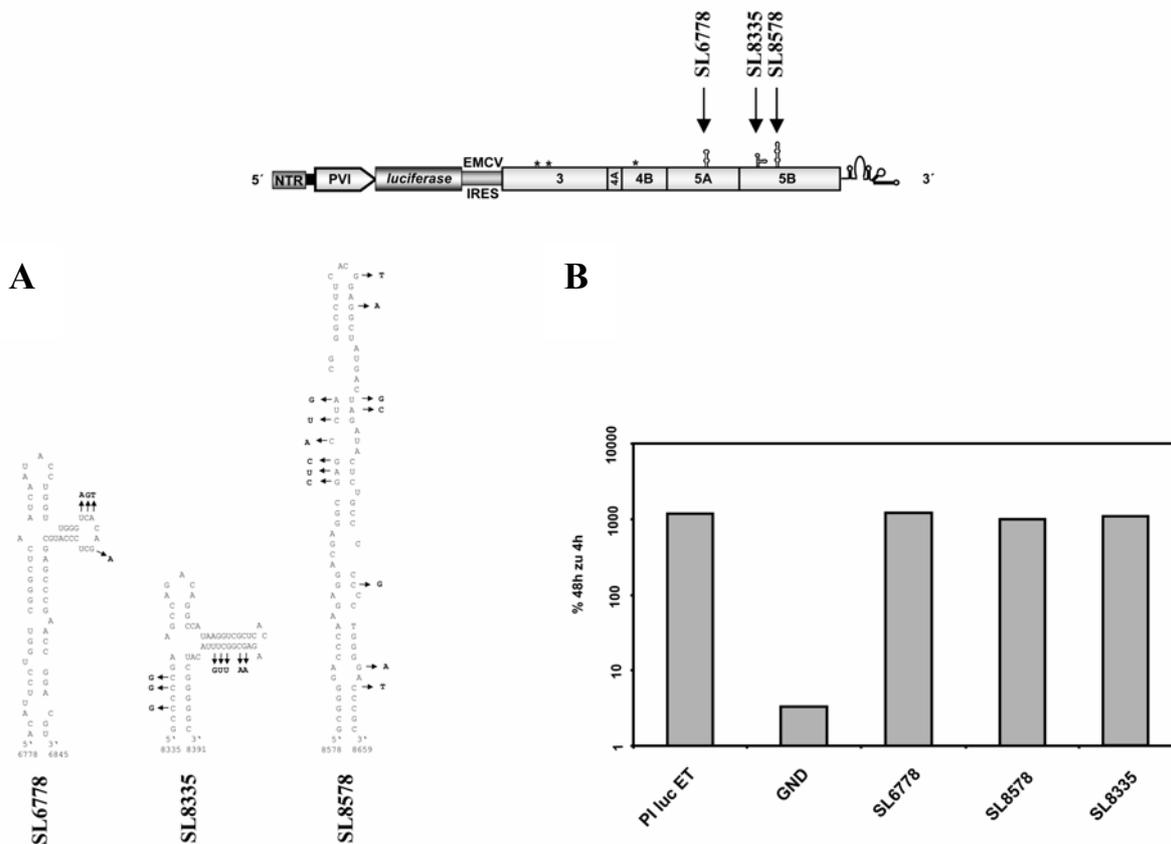


Abbildung 29: Kein Einfluss der RNA-Strukturen auf die HCV-RNA-Replikation. Oben sind die relativen Positionen der RNA Strukturen im Kontext des P1luc Replikons angedeutet. A) Schematische Darstellungen der RNA Strukturen in der HCV kodierenden Region. Eingefügte Punktmutationen sind mit einem Pfeil markiert. Die Namen der RNA-Elemente sind rechts angegeben. B) Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die Replikation ist als Verhältnis der Luziferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion in Prozent angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI-ET-(P1luc ET), als Negativkontrolle die GND-RNA mitgeführt.

das Element SL578 der RNA-Struktur SL8376, die von Tuplin und Mitarbeitern vorhergesagt wurde (Tuplin *et al.*, 2002). Das Element SL6778 fiel besonders durch die Tatsache auf, dass ein Sequenzmotiv im Bulge-Bereich invers komplementär zur Sequenz der Loopregion des SL2 in der X-Sequenz war (s. Kapitel 3.3.3.5 zur Funktion dieser Sequenz).

Das Einfügen stiller Punktmutationen zur Inaktivierung dieser Elemente führte jedoch zu keiner veränderten Replikationskompetenz im transienten Replikonsystem (Abb. 29B). Somit scheint keines dieser Elemente eine Funktion für die RNA-Replikation zu besitzen.

3.3.4 Strukturen im 3' Ende der NS5B-kodierenden Region

Für das 3' Ende der NS5B-kodierenden Region des HCV wurden mehrere konservierte RNA-Sekundärstrukturen vorhergesagt (Hofacker *et al.*, 1998; Rijnbrand *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997; Tuplin *et al.*, 2002). Da zur Ausbildung der vorhergesagten RNA-Struktur am äußeren 3' Ende der kodierenden Region auch Sequenzen aus der variablen Region der 3' NTR benötigt werden und bereits gezeigt wurde, dass die variable Region nicht essentiell für die Replikation ist (Yi & Lemon 2003, s. Kapitel 3.2.1), konzentrieren sich die hier durchgeführten Untersuchungen auf die RNA-Sekundärstrukturen im Bereich zwischen Nukleotid 9212 und 9356, d.h. ausschließlich auf die kodierende Region. Die Strukturen in diesem Bereich für die hier verwendete Nukleotidsequenz des HCV Con1-Isolats wurden mit Hilfe des Sekundärstruktur-Vorhersageprogramms „mfold“ (Zucker, 2003) bestimmt. Diese Analyse ergab drei potenzielle Sekundärstrukturen (Abb. 30), die in Anlehnung an bereits veröffentlichte Berichte über diesen Bereich (You *et al.*, 2004, Tuplin *et al.*, 2002) als NS5BSL3.1, NS5BSL3.2 und NS5BSL3.3 bezeichnet werden. Dabei entsprechen NS5BSL3.1 und NS5BSL3.3 den von Tuplin beschriebenen Elementen SL9011 und SL9118, die zuerst von Smith und Simmonds entdeckt wurden (Smith *et al.*, 1997). NS5BSL3.1 liegt im Bereich zwischen den Nukleotiden 9216 und 9259 und besteht aus einem stabilen Stem mit einem 4 Nukleotide langen Loop. NS5BSL3.2 umfasst die Nukleotide 9263 bis 9310 und bildet einen Stem, einen Loop von 12 Nukleotiden und einen Bulge von 8 Nukleotiden aus. NS5BSL3.3 enthält einen Stem mit einem 5 Nukleotide langen Loop (Position 9321 bis 9351).

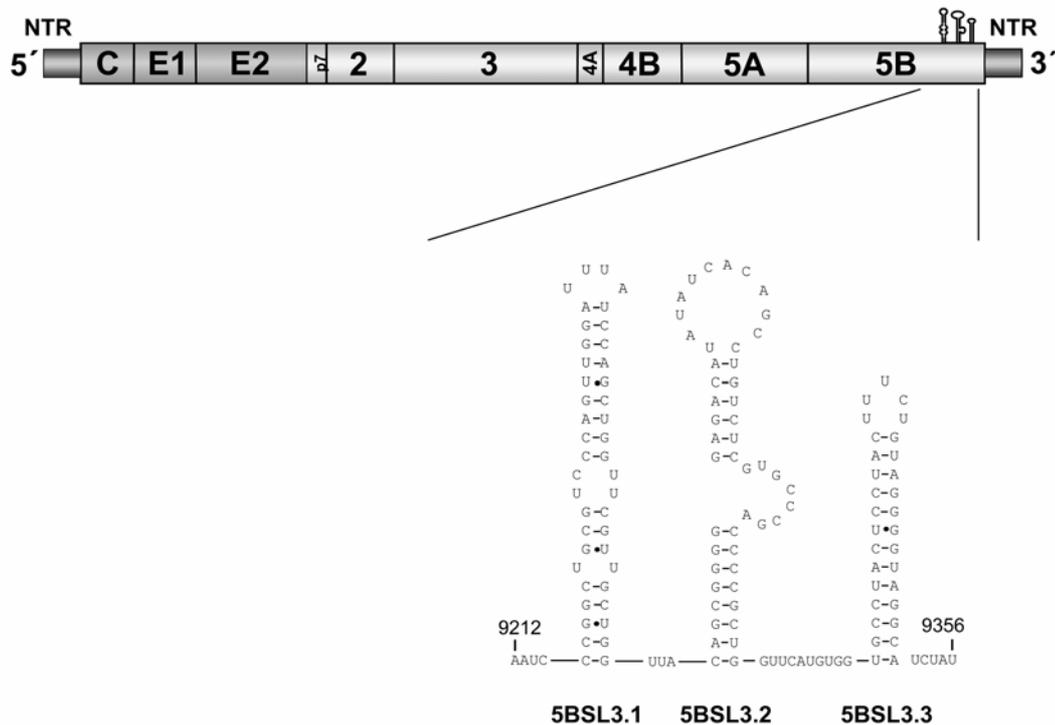


Abbildung 30: Oben: Angedeutet ist die Position der 3 RNA-Strukturen in der NS5B-kodierenden Region im Kontext des HCV-Genoms. Unten: Vorhergesagte RNA-Sekundärstrukturen für die 3 Stemloops 5BSL3.1, 5BSL3.2 und 5BSL3.3. Angegeben sind die Strukturen und Nukleotidsequenzen.

Um genetische Manipulationen innerhalb des 3' Endbereichs des HCV-Genoms zu erleichtern, mussten zuerst zwei Restriktionsschnittstellen in die variable Region der 3' NTR eingefügt werden (an Position 9391 und 9402). Es handelte sich dabei zum einen um eine Restriktionsschnittstelle für das -enzym *StuI* (Position 9402; Kapitel 3.2), zum anderen um eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XbaI* (Position 9391). Zu diesem Zweck wurden die folgenden Nukleotidaustausche eingeführt: C9393U, G9396A und A9407U. Es muss darauf hingewiesen werden, dass diese Mutationen die potenzielle Sekundärstruktur der variablen Region verändern können. Nukleotidsubstitutionen innerhalb eines Stems wurden nicht durch kompensatorische Mutationen kompensiert. Trotzdem führten die Austausche nicht zu einer Veränderung der Replikationseffizienz der HCV RNA. Somit diente dieses Replikon (341-sp-PVI-Xba/Stu) als Basis für alle nachfolgend beschriebenen Mutationen im 3' Endbereich. Diese RNA diente außerdem bei allen Replikationstests als Positivkontrolle und Referenz und sie wird im folgenden als „PI-luc wt“ oder nur als „wt“ bezeichnet.

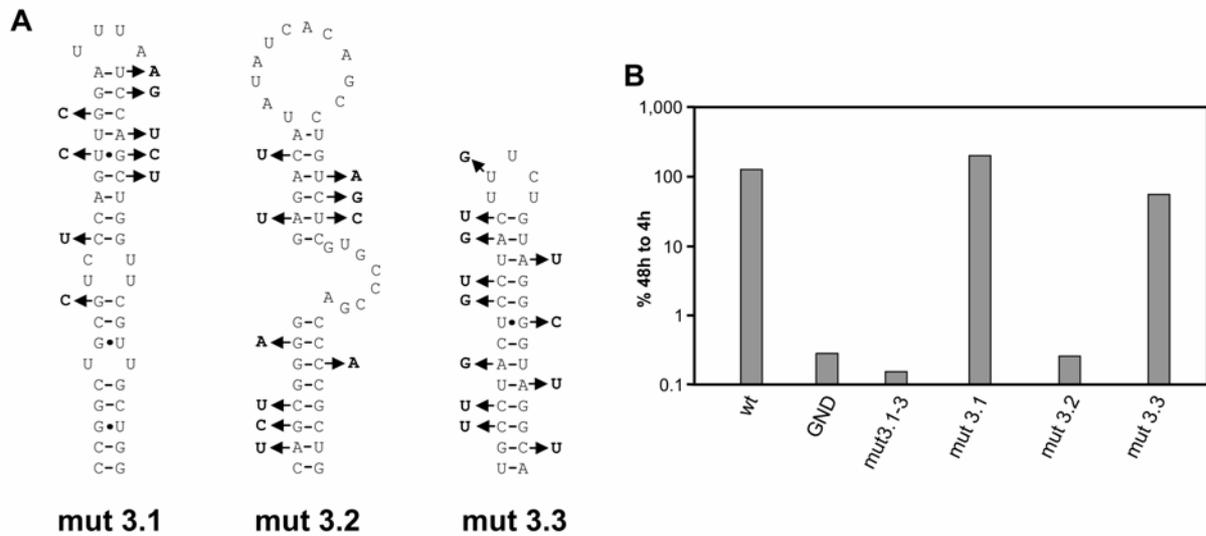


Abbildung 31: Die RNA-Struktur 5BSL3.2 ist essentiell für die RNA-Replikation. A) Zusammenfassung der in die 3 RNA-Elemente (5BSL3.1, 5BSL3.2 und 5BSL3.3) eingefügten stillen Punktmutationen. B) Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die in A gezeigten Mutationen wurden entweder in eine oder in alle Stemloopstrukturen gleichzeitig eingefügt. Die Replikation ist als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI-Xba/Stu- (wt), als Negativkontrolle die GND-RNA mitgeführt.

Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, ob die Stemloops NS5BSL3.1, -SL3.2 und -SL3.3 eine Rolle für die RNA-Replikation spielen. Hierzu wurde eine maximale Anzahl von stillen Punktmutationen eingeführt, um die Basenpaarungen und somit die Sekundärstrukturen zu zerstören. Dabei wurde besonders auf die Veränderung der Kodons geachtet, da das Einfügen von selten verwendeten Kodons zu einer Reduktion der RNA-Translation führen könnte bzw. es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einer verkürzten NS5B-Polymerase kommen würde. Dies könnte zu einem Verlust der Replikation führen, da der C-terminale Bereich des NS5B-Proteins für eine Membrananker-Region kodiert, die für die RNA-Replikation essentiell ist (Moradpour *et al.*, 2004). Weiterhin wurden mit Hilfe des Vorhersageprogramms „mfold“ die Veränderungen der Sekundärstrukturen durch die eingefügten Nukleotidsubstitutionen überprüft und bestätigt. Somit wurden in NS5BSL3.1 9, in NS5BSL3.2 10 und in NS5BSL3.3 12 Nukleotide verändert (Abb. 31A). Im ersten Versuchsansatz wurde eine RNA, in der alle 3 Stemloopsstrukturen gleichzeitig verändert wurden (PI-mut3.1-3), getestet. Wie man in Abbildung 31B sieht, verhindern diese Mutationen die RNA-Replikation.

Um zu analysieren, welche der potenziellen Stemloopsstrukturen für die Replikation benötigt wird, wurden 3 Replikon RNAs generiert, in denen jeweils nur ein Stemloop verändert wurde (PI-mut3.1, PI-mut3.2, PI-mut3.3). Während die Nukleotidsubstitutionen in Stemloop

NS5BSL3.1 und -SL3.3 keinen Effekt auf die Replikation zeigten, führten die stillen Mutationen im RNA-Element NS5BSL3.2 zu einer vollständigen Hemmung der RNA-Replikation (Abb. 31B). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass NS5BSL3.2 in der 3' kodierenden Region von NS5B ein cis-aktives RNA-Element ist, das für die HCV-Vermehrung benötigt wird.

3.3.5 Funktionelle Komplementation von HCV-Replikons mit veränderten Stemloopsstrukturen NS5BSL3.1 bis 3.3

Weitere Untersuchungen des für die Replikation wichtigen RNA-Elements NS5BSL3.2 wurden dadurch erschwert, dass dieses innerhalb der kodierenden Region der NS5B-Polymerase liegt. Daraus resultiert, dass Mutationen, die die Struktur dieses Elements betreffen, in den meisten Fällen auch die Aminosäuresequenz des Proteins verändern. Damit

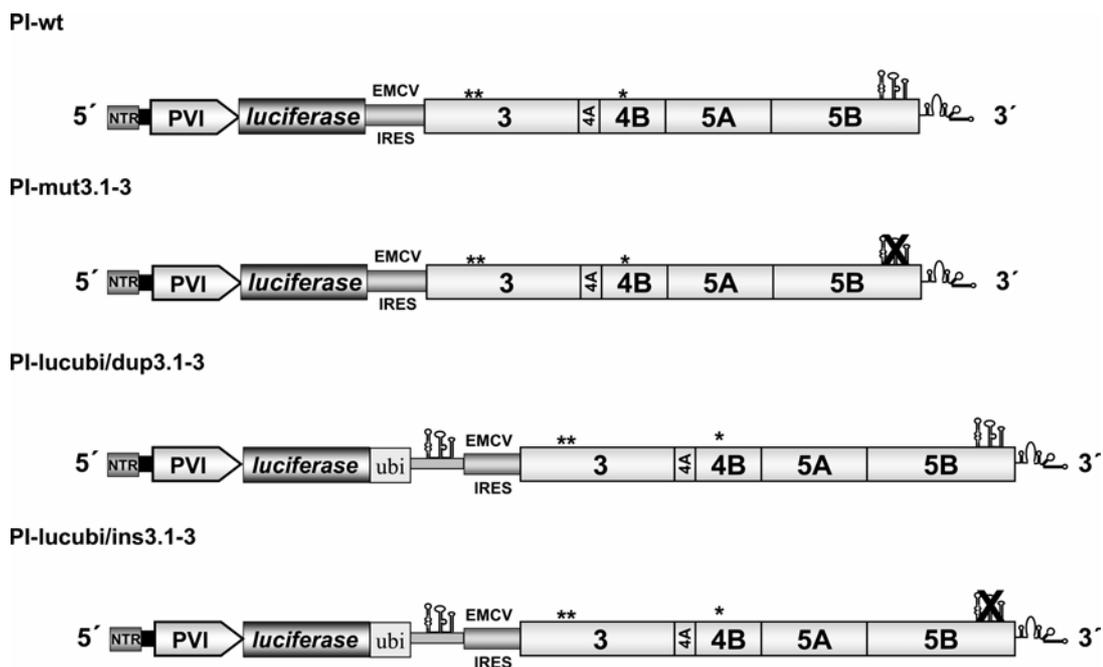


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Replikon-Konstrukte, die verwendet wurden, um die Auswirkungen der Insertion der NS5B RNA-Elemente „upstream“ der EMCV-IRES zu untersuchen. Die Namen der Replikonkonstrukte sind links angegeben (s. Text). Die RNA-Elemente sind mit ihren Sekundärstrukturen dargestellt, Veränderungen der Struktur sind durch ein „X“ gekennzeichnet. Die 3' NTR ist mit ihrer Sekundärstruktur angegeben. Die Zellkultur adaptiven Austausche sind durch „*“ angedeutet.

war es nicht möglich, zwischen Effekten auf Grund veränderter RNA-Strukturen oder Proteinsequenz zu unterscheiden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, die

Replikation einer RNA mit zerstörten Stemloopsstrukturen in NS5B durch die Insertion der intakten Stemloopelemente an anderen Stellen des HCV-Genoms zu komplementieren. Für diese Insertion wurden 3 verschiedene Positionen gewählt: die Region „upstream“ der EMCV-IRES, eine Region in der NS5A-kodierenden Sequenz, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie für die Replikation nicht benötigt wird (Blight *et al.*, 2000) und die variable Region der 3' NTR, die nicht essentiell für RNA-Replikation ist (s. Kapitel 3.2.1).

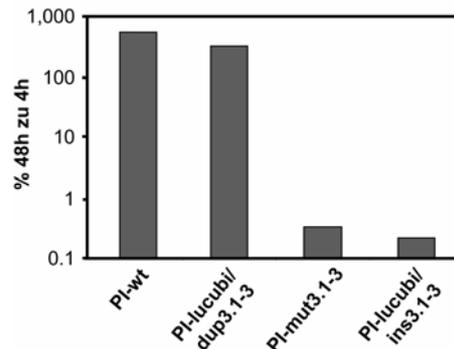


Abbildung 33: Keine Wiederherstellung der RNA-Replikation durch Insertion der NS5B RNA-Elemente „upstream“ der EMCV-IRES. Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die Replikation ist als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI-Xba/Stu- (PI-wt), als Negativkontrolle die PI-mut3.1-3-RNA mitgeführt.

Abbildung 32 zeigt schematisch den Aufbau der HCV-Replikons die für diese Versuche hergestellt wurden. Dabei dienten die Replikons PI-wt und PI-mut3.1-3 als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Das Konstrukt PI-lucubi/dup3.1-3 besitzt neben den intakten RNA-Elementen in der NS5B-kodierenden Region eine Duplikation dieser Strukturen „upstream“ der EMCV-IRES. Für die Insertion der NS5B-Elemente wurde die NS5B-Sequenz, die die Strukturen beinhaltet, über eine „Ubiquitin“-Proteaseschnittstelle im (+1)-Leseraster mit dem Luziferase-Gen des Leuchtkäfers fusioniert. Dieser Aufbau erlaubt die effiziente Synthese enzymatisch aktiver Luziferase ohne Beeinflussung durch die C-terminale Fusion (T. Pietschmann, persönliche Mitteilung). Die RNA PI-lucubi/dup3.1-3 (Abb. 32) dient somit als Kontrolle, inwieweit eine Insertion der Sequenzen an diese Stelle die Replikation beeinflusst. Die RNA PI-lucubi/ins3.1-3 entspricht weitgehend der RNA PI-lucubi/dup3.1-3, allerdings sind in diesem Kontext die RNA-Strukturen in der NS5B-Region zerstört, so dass diese RNA nur eine intakte Version dieser Elemente „upstream“ der EMCV-IRES besitzt. Aus Abbildung 33 geht hervor, dass diese Insertion ohne Verlust der Replikationskompetenz toleriert werden (vergleiche PI-wt und PI-lucubi/dup3.1-3). Allerdings führte die Insertion der NS5B-Elemente an dieser Stelle nicht zur Wiederherstellung der RNA-Replikation des

analogen Replikons mit den zerstörten Strukturen in der NS5B-kodierenden Region (PI-lucubi/ins3.1-3; Abb. 33).

In Abbildung 34 sind die HCV-Replikons schematisch dargestellt, mit denen untersucht wurde, ob die Insertion der NS5B-Elemente in die NS5A-kodierende Region eine funktionelle Komplementation erlaubt.

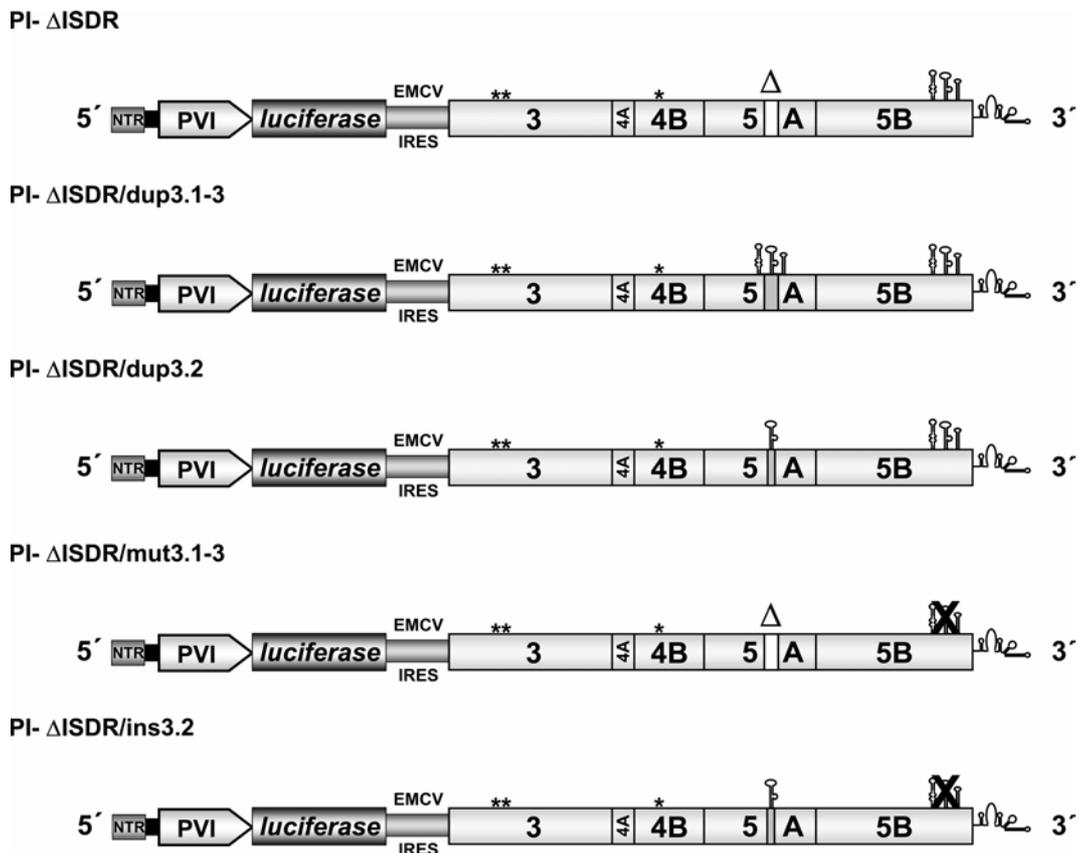


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Replikon-Konstrukte, die verwendet wurden, um die Auswirkungen der Insertion der NS5B RNA-Elemente in die NS5A-kodierende Region zu untersuchen. Die Namen der Replikonkonstrukte sind links angegeben (s. Text). Die RNA-Elemente sind mit ihren Sekundärstrukturen dargestellt, Veränderungen der Struktur sind durch ein „X“ gekennzeichnet. Die 3' NTR ist mit ihrer Sekundärstruktur angegeben. Die Zellkultur adaptiven Austausche sind durch „*“ angedeutet.

Die hier eingefügte Deletion im Zentrum der NS5A Sequenz (PI-ΔISDR; Abb. 34) umfasste die Sequenz der „Interferon-sensitivity-determining-region“ (ISDR) und sie entsprach weitgehend einer Mutation, die zur Zellkulturadaptation der HCV Con1-Wildtypsequenz führt (Blight *et al.*, 2000). Da diese adaptive Mutation inkompatibel mit dem adaptiven Austausch in NS4B ist, wurden die Deletion nur mit zwei adaptiven Austausch in NS3 (E1202G und T1280I) kombiniert. Allerdings lag die Replikationseffizienz deutlich unter dem Niveau des Replikons mit der Mutation in NS4B. Die „in-frame“ Insertion aller drei NS5B-Stemloopsstrukturen in die NS5A-Sequenz (PI-ΔISDR/dup3.1-3; Abb. 34) führte zu einem

Verlust der Replikation (Abb. 35; vergleiche PI- Δ ISDR und PI- Δ ISDR/dup3.1-3). Die Insertion des NS5B3.2 Stemloop in die NS5A-Sequenz wurde hingegen toleriert (Abb. 34 und 35; vergleiche PI- Δ ISDR und PI- Δ ISDR/dup3.2). Diese Insertion in eine analogen RNA, in der die NS5B-Elemente zerstört waren, führte allerdings zu keiner Wiederherstellung der RNA-Replikation (PI- Δ ISDR/ins3.2; Abb. 34 und 35).

Um auszuschließen, dass eine sehr ineffiziente Komplementation der Replikation aufgrund der niedrigen Replikationseffizienz der hier verwendeten Replikons nicht detektierbar war, wurden die entsprechenden Mutationen auch im Kontext selektionierbarer Replikons getestet. Allerdings wurde in keinem Ansatz G418 resistente Kolonien erhalten (Daten nicht gezeigt).

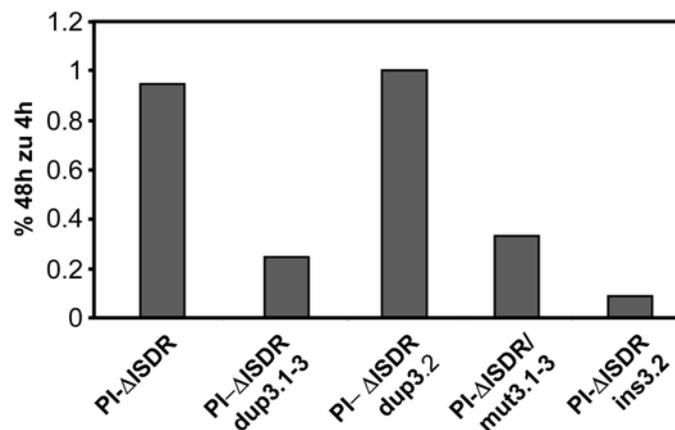


Abbildung 35: Keine Wiederherstellung der RNA-Replikation durch Insertion der NS5B-Elemente in die NS5A-kodierende Region. Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Replikationssystem. Die Replikation ist als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion angegeben. Als Positivkontrolle wurde die PI- Δ ISDR, als Negativkontrolle die PI- Δ ISDR/mut3.1-3 RNA mitgeführt. Es ist darauf hinzuweisen, dass die Untersuchungen im Kontext adaptiver Replikons mit zwei adaptiven Austausch in NS3 (E1202G und T1280I) durchgeführt wurden.

Im Gegensatz zu diesen negativen Ergebnissen führte die Insertion der NS5B-Stemloopstrukturen in die variable Region der 3' NTR zu einer Wiederherstellung der RNA-Replikation des ansonsten defekten Replikons (PI-ins3.1-3; Abb. 36 und 37; vergleiche PI-ins3.1-3 und PI-mut3.1-3). Die Insertion aller 3 Stemloopstrukturen führte zu einer Wiederherstellung der RNA-Replikation, die im Vergleich zur Wildtyp-RNA nur ca. 3-5-fach reduziert war (Abb. 37). Darüber hinaus führte auch die alleinige Insertion des Stemloops NS5BSL3.2 in die variable Region der 3' NTR zu einer Komplementation der RNA-Replikation (PI-ins3.2; Abb. 36 und 37), die allerdings 10-15-fach niedriger war als die des Ausgangsreplikons (Abb. 37; vergleiche PI-wt und PI-ins3.2). Es muss hier noch festgestellt werden, dass schon die Duplikation der NS5B Elemente in der variablen Region in einem

Replikons mit intakten RNA-Strukturen in der NS5B-kodierenden Sequenz zu einer Reduktion der Replikation führte (Abb. 36 und 37; vergleiche PI-wt und PI-dup3.1-3).

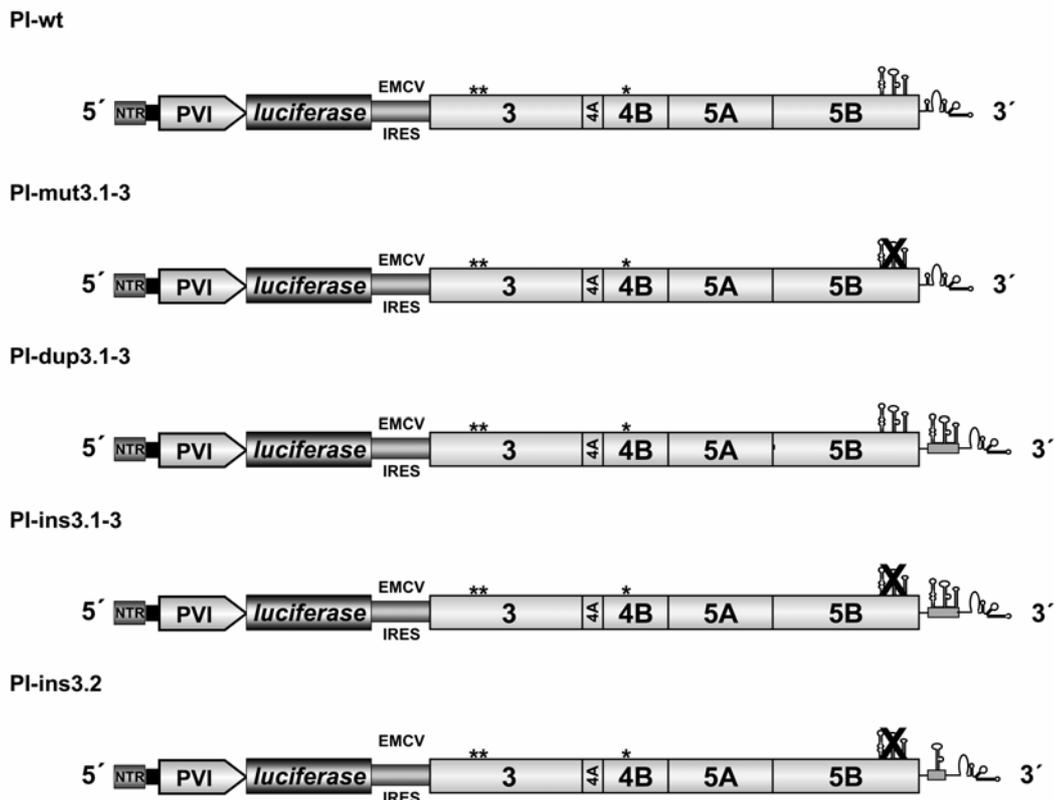


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Replikon-Konstrukte, die verwendet wurden, um die Auswirkungen der Insertion der NS5B RNA-Elemente in die variable Region der 3' NTR zu untersuchen. Die Namen der Replikonkonstrukte sind links angegeben (s. Text). Die RNA-Elemente sind mit ihren Sekundärstrukturen dargestellt, Veränderungen der Struktur sind durch ein „X“ gekennzeichnet. Die 3' NTR ist mit ihrer Sekundärstruktur angegeben. Die Zellkultur adaptiven Austausche sind durch „*“ angedeutet.

Die analogen Ergebnisse wurden auch gefunden, wenn die RNA-Replikation mittels Northern-Hybridisierung untersucht wurde (Abb. 37). Eine sehr effiziente Replikation zeigte die Wildtyp-RNA, wohingegen das Replikon, in dem alle RNA-Elemente in der NS5B-kodierenden Region zerstört waren, nicht mehr replizierte (Abb. 37; vergleiche PI-wt mit PI-mut3.1-3). In Übereinstimmung mit den Luziferase-Daten wurde die Replikation bei den RNA, bei der alle drei NS5B-Strukturen oder nur das NS5BSL3.2-Element in die 3' NTR inseriert wurden, wieder hergestellt (Abb. 37; PI-ins3.1-3 und PI-ins3.2). Diese Ergebnisse bestätigen, dass NS5BSL3.2 ein cis aktives RNA-Element ist mit einer essentiellen Funktion für die HCV RNA-Replikation. Weiterhin zeigen diese Versuche, dass dieses Element innerhalb bestimmter Grenzen positionsunabhängig im 3' Bereich des HCV Genoms wirken kann.

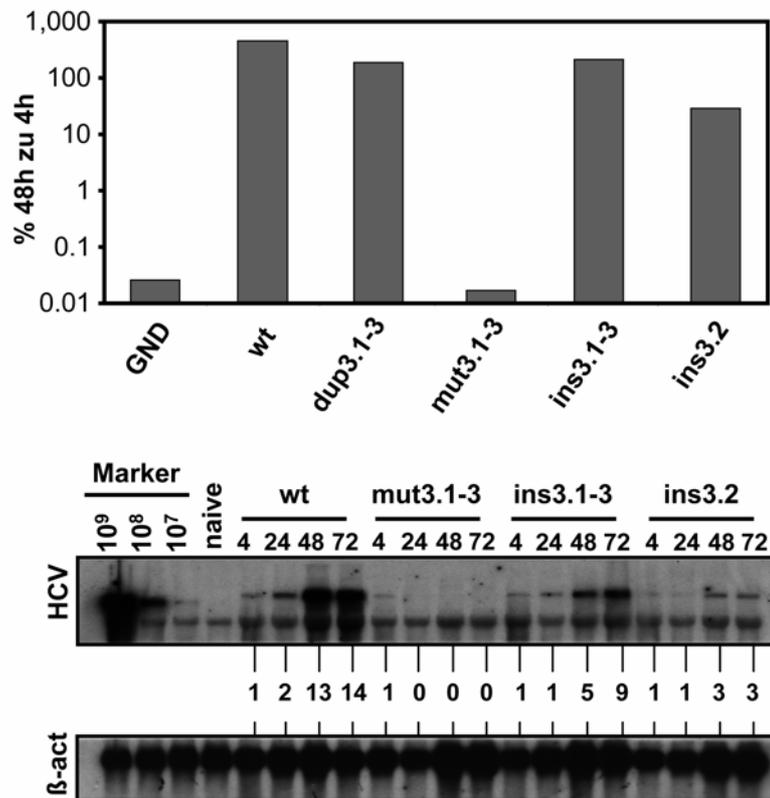


Abbildung 37: Wiederherstellung der RNA-Replikation durch Insertion der NS5B-Stemloopstrukturen in die variable Region der 3' NTR. Oben: Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Replikationssystem. Die Replikation ist als prozentuales Verhältnis der Luziferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion angegeben. Als Positivkontrolle wurde die 341-sp-PVI/Xba-Stu (wt)-, als Negativkontrolle die GND-RNA mitgeführt. Unten: Analyse der HCV RNA-Replikation mittels Northernblot. Die über den Spuren angegebenen Replikon RNAs wurden in Huh-7 Zellen transfiziert, die zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet wurden. Die HCV RNA in der Gesamt-RNA wurde mittels Northernblot detektiert und quantifiziert. Die Zahlen zwischen den Blots geben die relative Intensität des HCV Signals, normalisiert auf das β-Aktin (β-act) Signal, wieder. Die Signalstärke, die 4 Stunden nach Transfektion gemessen wurde, wurde auf 1 gesetzt. Als Größenmarker dienen in vitro transkribierte RNAs definierter Menge (Marker).

3.3.6 Charakterisierung der RNA-Motive in NS5BSL3.2, die für die RNA-Replikation notwendig sind

Die Entwicklung eines Replikons, das die Untersuchungen der NS5BSL3.2-Struktur außerhalb der NS5B-kodierenden Sequenz zulässt, erlaubte eine detaillierte Mutationsanalyse dieses Elements hinsichtlich der für Replikation benötigten Regionen. Da das Replikationsniveau des Replikons PI-ins3.1-3 deutlich über dem der PI-ins3.2 RNA lag, wurde das Replikon mit der Insertion aller 3 NS5B RNA-Stukturen (PI-ins3.1-3) als

Grundlage für die nachfolgend beschriebene Mutationanalyse verwendet. Um den Einfluss der Stemregion auf die Replikation zu untersuchen, wurden zuerst die Primärsequenzen im oberen und unteren Teil des Stems durch Vertauschen der Stemseiten verändert. Diese

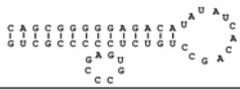
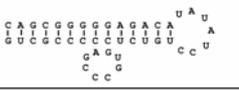
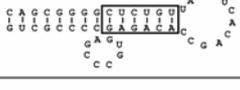
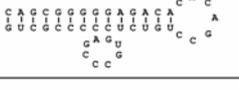
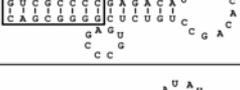
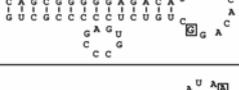
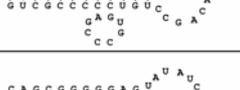
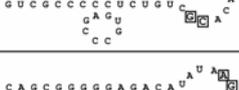
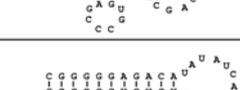
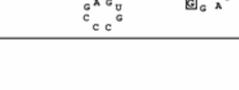
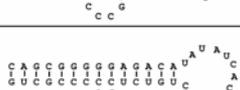
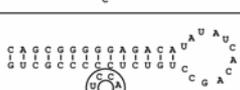
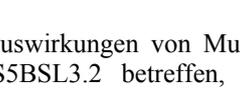
A			B		
Construct	5BSL3.2 sequence	RLU (%)	Construct	5BSL3.2 sequence	RLU (%)
Wildtyp		100	Δ loop-CACAG		2 ± 1
SL-up		65 ± 10	Δ loop-UAUUAU		2 ± 1
SL-low		60 ± 12	loop-AG		1 ± 1
Δ SLup-AG:UC		10 ± 7	loop-ACG		1 ± 1
Δ SLup-ACA:UGU		5 ± 2	loop-AGG		2 ± 1
Δ SLlow-CAG:CUG		32 ± 6			
Δ bulge-UGC		2 ± 1			
bulge-random		2 ± 1			
bulge-G→A		4 ± 2			

Abbildung 38: Auswirkungen von Mutationen, die entweder den Stem- (A) oder Loopbereich (B) der RNA-Struktur NS5BSL3.2 betreffen, auf die RNA-Replikation. A/B) Schematische Darstellung der Mutationen, die in den Stem-, Bulge- und Loopbereich des RNA Elements 5BSL3.2 eingefügt wurden und ihre Auswirkung auf die RNA-Replikation. Alle Mutationen wurden in den Stemloop 5BSL3.2 in der variablen Region im Kontext des Replikons PI-ins3.1-3 eingefügt. Die Namen der Konstrukte sind links wiedergegeben, die Mutationen sind in der Mitte gezeigt und die Ergebnisse der transienten Replikationsuntersuchungen sind rechts aufgeführt. Dabei wurde die Replikationskompetenz des Replikons PI-ins3.1-3 (Wildtyp), das als Positivkontrolle diente, auf 100% gesetzt. Der Hintergrund einer nicht mehr replikationskompetenten RNA entsprach einer RLU (%) von ≤ 2 . Die hier dargestellten Strukturen dienen der Veranschaulichung der eingefügten Mutationen und berücksichtigen nicht den möglichen Einfluss der Mutationen auf die Ausbildung der RNA-Strukturen.

Mutationen, die nach Computervorhersagen die Stemstruktur nicht verändern, zeigten einen moderaten Einfluss auf die Replikation (Abb. 38A; SL-up und SL-low). Im Gegensatz dazu bewirkten Mutationen, die die Länge des oberen (Δ SL-up-AG:CU, Δ SL-up-ACA:UGU) bzw. des unteren (Δ SL-low-CAG:CUG) Stems um zwei bzw. drei Basenpaare verkürzten, eine

deutliche Reduktion der Replikationskompetenz (Abb. 38A). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Struktur des Stems, nicht aber seine Primärsequenz für die RNA-Replikation wichtig ist.

Als nächstes wurde der Einfluss der Bulge-Region und der Loopsequenz auf die RNA-Replikation näher charakterisiert. Hierzu wurden in der Bulge-Sequenz die drei Nukleotide „UGC“ (Position 9296-98) deletiert, was zu einem Verlust der Replikationskompetenz führte (Δ bulge-UGC; Abb. 38A). Wurde die gesamte Sequenz „GUGCCCGA“ durch eine Zufallssequenz „CACGGUC“ ersetzt, resultierte dies ebenfalls in einem Verlust der RNA-Vermehrung (bulge-random; Abb. 38A). Vielmehr zeigte sogar eine einzelne Punktmutation in dieser Sequenz (Position 9297 G zu A) einen drastischen Effekt und führte zum Verlust des Replikationsvermögens (bulge-G \rightarrow A; Abb. 38A). Von gleicher Bedeutung zeigte sich die Sequenz des oberen Loops. Hier führten sowohl große Deletionen (Δ loop-CACAG und Δ loop-UAUUAU) als auch vereinzelte Punktmutationen (loop-AG, loop-ACG, loop-AGG) zu einer Hemmung der RNA-Replikation (Abb. 38B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl die Bulge- als auch die Loopregion eine entscheidende Funktion für die HCV Replikation hat.

3.3.7 Bestimmung der Sekundärstruktur von Stemloop NS5BSL3.2 und XTSL2 in der 3' NTR mit Hilfe einer NMR Analyse

Nachdem die Bedeutsamkeit des oberen Loops experimentell nachgewiesen wurde, stellte sich heraus, dass eine Sequenz von sieben Nukleotiden (Position 9211-9217: 5' UCACAGC 3') in der Loopssequenz von NS5BSL3.2 invers komplementär zu einer Sequenz im Loop des Stemloops 2 (SL2; Position 9539-9546 5' GCUGUGA 3') in der X-Sequenz der 3' NTR war (Abb. 40A). Diese Beobachtung ließ eine Interaktion zwischen beiden RNA-Elementen vermuten. Eine Voraussetzung für eine solche Interaktion ist, dass die beiden komplementären Sequenzen in NS5BSL3.2 und SL2 der X-Sequenz tatsächlich in einem einzelsträngigen RNA-Loop liegen. Für NS5BSL3.2 sprachen die oben durchgeführten genetischen Untersuchungen zwar für die in Abbildung 30 gezeigte Strukturvorhersage, aber experimentell wurde diese noch nicht bestätigt. Auch die Sekundärstruktur des SL2 der X-Sequenz wurde experimentell noch nicht eindeutig nachgewiesen. Hier zeigten Untersuchungen, dass die in Abbildung 16 (Kapitel 3.2) dargestellte Struktur nur eine von mehreren möglichen Ausbildungsformen darstellt (Blight *et al.*, 1997).

Computervorhersage die unteren 5 Basenpaarungen ausbilden. Trotzdem zeigte sich, dass die verbleibende Nukleotidsequenz eine mit den Vorhersagen übereinstimmende Struktur ausbildete. So konnten 9 Basenpaarungen detektiert werden, davon 6 G-C und 3 U-A Paarungen. Die mittels sequentiellm Nuclear Overhauser Effekt (NOE) ermittelte Korrelation der Basenpaarungen bestätigte den in Abbildung 39A gezeigten Stembereich. Auch unter verschiedenen Salz- und pH-Bedingungen konnten diese Basenpaarungen bestätigt werden, was für eine relativ hohe Stabilität der NS5BSL3.2 Struktur spricht.

Die Spektren für den SL2 in der X-Sequenz sind in Abbildung 39B gezeigt. Auch hier konnten die vier G-C Paarungen an Position G 5, -6, -20 und -24, sowie die A-U Paarung an Position U-25 bestätigt werden. Die Paarungen an den extremen Enden des Stems zeigten eine schwächere Basenpaarungsintensität. Insgesamt stimmen diese Ergebnisse mit der in Abbildung 39B gezeigten Struktur überein.

3.3.8 Evidenz für eine „kissing loop“-Interaktion zwischen NS5BSL3.2 und XTSL2 in der 3' NTR

Die hier durchgeführte Strukturanalyse bestätigte, dass die komplementären Regionen in NS5BSL3.2 und SL2 der X-Sequenz tatsächlich in einzelsträngigen RNA-Bereichen lagen. Um zu überprüfen, ob diese Komplementarität tatsächlich zu einer Interaktion zwischen den beiden Sequenzmotiven führte (Abb. 40A), wurden entweder in die Mitte des 5BSL3.2- (5' CGACACU 3' zu 5' CGUGUCU 3') oder des SL2 (5' AGUGUCG 3' zu AGACACG 3') - Motivs 3 Mutationen eingefügt (Abb. 40B). Diese wurden so gewählt, dass sie die sieben Nukleotide lange Komplementarität unterbrachen und zu einer Komplementarität zwischen den zwei äußeren Nukleotiden des Motivs reduzierten. Diese Veränderungen, die in das Replikon PI-ins3.1-3 eingeführt wurden, führten zu einem Verlust der Replikation der jeweiligen RNAs (5B3.2x und XT-x; Abb. 40B). Wurden beide Mutationen in dieselbe RNA eingeführt, stellte dies die vollständige Komplementarität wieder her, allerdings mit veränderter Primärsequenz. Demnach war die Komplementarität ausreichend die RNA-Replikation wieder herzustellen, wobei die Effizienz deutlich unter der des Wildtype-Replikons lag (Abb. 40B; vergleiche 5B3.2x + XT-x und ins3.1-3). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass es zu einer „kissing loop“ Interaktion zwischen den beiden RNA-Elementen kommt, die essentiell für die HCV Replikation ist.

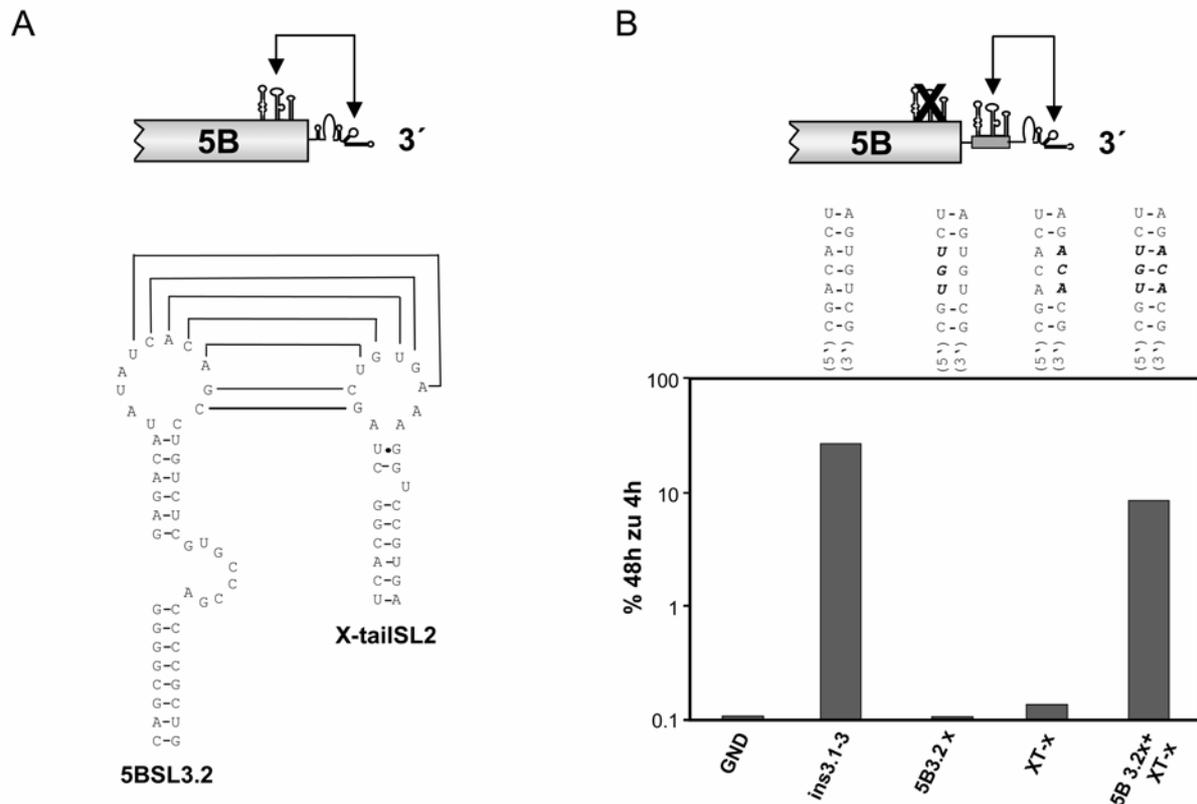


Abbildung 40: Evidenz für eine „kissing loop“-Interaktion zwischen NS5BSL3.2 und XTSL2 in der 3' NTR A) Vorhergesagte Sekundärstruktur der RNA Elemente 5BSL3.2 und SL2 in der X-Sequenz (X-tailSL2). Durch die Linien angedeutet sind die 7 Nucleotide in den Loopbereichen, die komplementär sind. Oben angedeutet sind die Positionen der Elemente im HCV Genom. B) Oben: Schematische Darstellung der 3' Region des Replikons, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. Darunter sind die 7 komplementären Nucleotide (links 5BSL3.2, rechts XT-SL2) und die eingefügten Mutationen dargestellt. Fett gedruckt sind nicht mehr komplementäre Nucleotide. Unten: Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die Replikonnamen sind unten angegeben. Als Positivkontrolle diente die RNA des Replikons PI-luc/ins3.1-3 (ins3.1-3), als Negativkontrolle die GND-RNA.

Um die Voraussetzungen für diese Interaktion näher zu charakterisieren, wurde eine Reihe von Konstrukten generiert, in denen Nucleotidbereiche des Motivs im NS5BSL3.2- oder im SL2-Element oder in beiden Elementen ausgetauscht wurden. Die Austausche in beiden Elementen wurden so gewählt, dass diese eine kontinuierliche Komplementarität von sieben Nucleotiden wieder herstellten, allerdings mit veränderter Primärsequenz (Abb. 41). Die erste Serie von Konstrukten sollte dabei Aufschluss über die Anzahl der Nucleotide geben, die komplementär sein mussten, damit es zu einer für RNA-Replikation ausreichenden Basenpaarung kam. Für diese Fragestellung wurden jeweils das erste und das letzte, das erste und die beiden letzten oder die ersten beiden und das letzte Nucleotid im NS5BSL3.2-Motiv (5B1+1, 5B1+2, 5B2+1) bzw. im XTSL2-Motiv (XT1+1, XT1+2, XT2+1) vertauscht (Abb. 41). Dies führte zu einer Reduktion der Anzahl der komplementären Nucleotide im Falle der Replikons 5B1+1 bzw. XT1+1 auf fünf und im Falle der RNAs 5B1+2, 5B2+1 bzw. XT1+2

oder XT2+1 auf vier Nukleotiden im zentralen Bereich der Motive. Jede dieser Mutationen, unabhängig ob im 5BSL3.2- oder im SL2-Element der X-Sequenz, führte zu einem Verlust der Replikation (Abb. 41). Die Konstrukte, in denen eine potenzielle Basenpaarung über eine Länge von sieben Nukleotiden durch Mutationen im NS5BSL3.2- und SL2- Motiv wieder hergestellt wurden (5BXT1+1, 5BXT1+2, 5BXT2+1), zeigten auch eine Wiederherstellung der Replikationskompetenz. Allerdings war diese signifikant vermindert im Vergleich zu der entsprechenden Positivkontrolle PI-ins3.1-3 (Abb. 41).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Komplementarität von mindestens sechs Nukleotiden Länge für die Replikation von HCV-RNAs erforderlich ist. Die Tatsache, dass alle Replikons, in denen die Primärsequenz der komplementären Region in NS5BSL3.2 und SL2 verändert wurden, deutlich schlechter replizieren als der Wildtyp lässt vermuten, dass auch die Primärsequenz eine wichtige Rolle für die Replikation spielt.

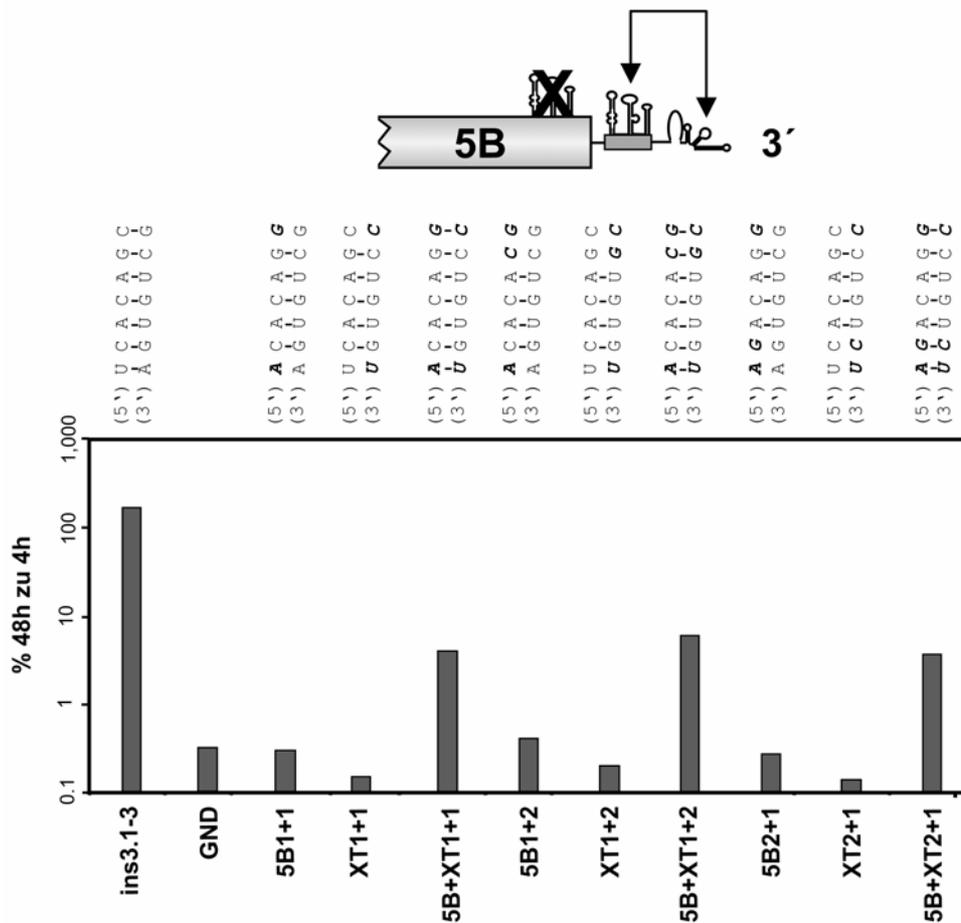


Abbildung 41: Untersuchungen hinsichtlich der Komplementaritätslänge, die für die HCV RNA-Replikation benötigt wird. Oben: Schematische Darstellung der 3' Region des Replikons mit dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Primärsequenzen der komplementären Regionen und die jeweils eingefügten Mutationen sind über den zugehörigen Ergebnissen gezeigt. Nicht komplementäre Nucleotide sind fett gedruckt. Die Namen der entsprechenden Replikons sind unter den Ergebnissen gezeigt. Als Positivkontrolle diente die RNA des Replikons PI-luc/ins3.1-3 (ins3.1-3), als Negativkontrolle die GND-RNA.

3.3.9 Bedeutungen von Primärsequenz und Komplementarität für die Interaktion zwischen den RNA Elementen NS5BSL3.2 und XTSL2

Um der Frage nachzugehen, ob die Primärsequenz oder die Möglichkeit zur Basenpaarung die Hauptvoraussetzung für RNA-Replikation ist, wurden weitere Replikons generiert. In den RNAs 5B-N oder XT-N wurden alle 7 Nukleotide entweder im NS5B3.2- oder im SL2-Motiv durch eine zufällige Sequenz ersetzt, wodurch die Komplementarität aufgehoben wurde. Dies führte zu einem Verlust der Replikation (5B-N, XT-N; Abb. 42). Wurden beide Motive durch Sequenzen ersetzt, die eine 7 Nukleotide lange Komplementarität besaßen, konnte die Replikationskompetenz wieder hergestellt werden. Dabei zeigte sich aber eine deutliche Reduktion des Replikationsniveau, das ca. 50-fach unter dem Niveau der PI-ins3.1-3 Ausgangs-RNA lag.

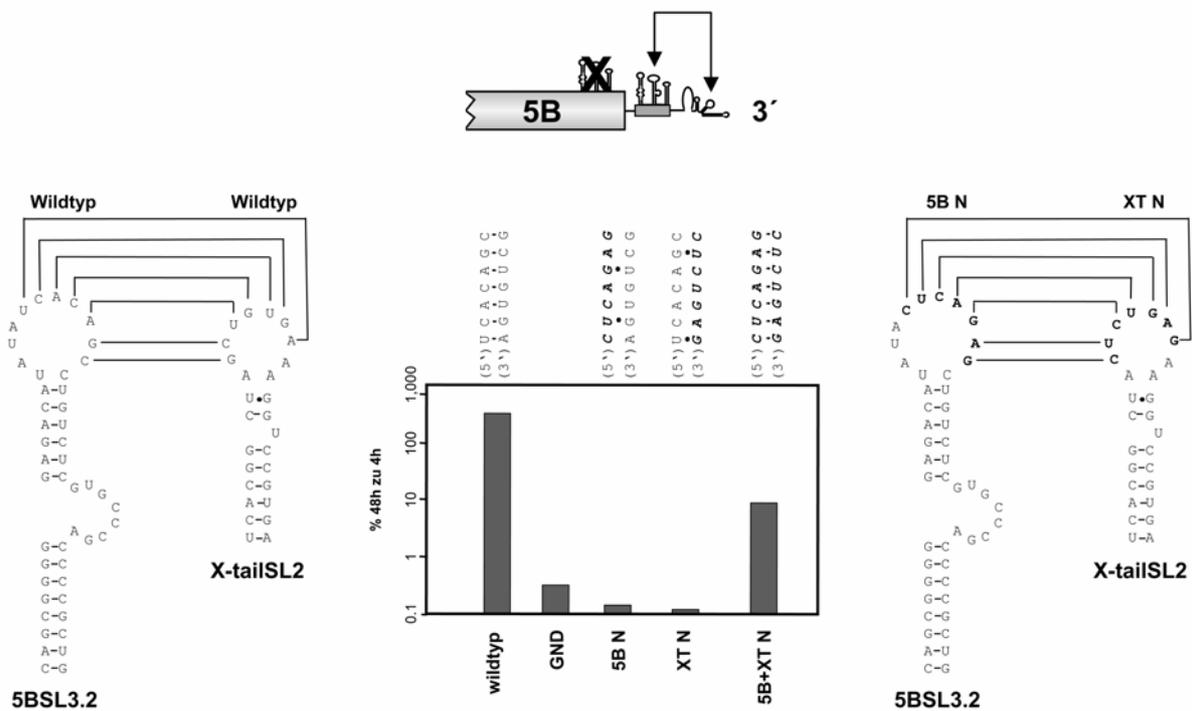


Abbildung 42: Bedeutungen von Primärsequenz und Komplementarität für die Interaktion zwischen den RNA Elementen NS5BSL3.2 und XTSL2. Links: Schematische Darstellung der beiden RNA Elemente 5BSL3.2 und XT-SL2 mit ihren Primärsequenzen (Wildtyp). Die komplementären Sequenzmotive sind durch Linien angedeutet. Rechts: Hypothetische Struktur der Elemente mit veränderten Motivsequenzen (5BN und XTN, fett gedruckt). Komplementäre Sequenzen sind durch Linien angedeutet. Mitte: Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die Nukleotidsequenzen der Mutanten sind oberhalb, die dazugehörigen Replikonnamen unterhalb des Balkendiagramms angegeben.

Die beobachteten Reduktionen der Replikationseffizienz der Replikons mit veränderter Primärsequenz der Komplementaritätsregion können verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die RNA-Stabilität vermindert sein. Um dies ausschließen zu können, wurde die

RNA-Stabilität der Konstrukte 5B-N, XT-N und 5BXT-N mit der des Ausgangskonstruktes PI-ins3.1-3 verglichen. Dazu wurde die Halbwertszeit dieser RNAs nach Transfektion in Huh-7 Zellen mittels Northern-Hybridisierung bestimmt. Um Auswirkungen der Replikation auf die Menge der RNA ausschließen zu können, wurden die Untersuchungen im Kontext einer Replikon-RNA durchgeführt, die eine inaktivierende Aminosäuremutation im GDD Motiv der NS5B Polymerase besaß. Zwei, 4, 8 und 24 Stunden nach Transfektion der RNAs in Huh-7 Zellen wurden diese geerntet und die RNA mittels Northernblot und Phosphoimager quantifiziert. Wie aus Abbildung 43 zu entnehmen ist, zeigte keine der RNAs eine veränderte Abbaukinetik. Daraus ist zu folgern, dass keine der Mutationen in NS5BSL3.2 oder SL2 der X-Sequenz zu einer Veränderung der RNA-Stabilität und dadurch zum Verlust der Replikation führte.

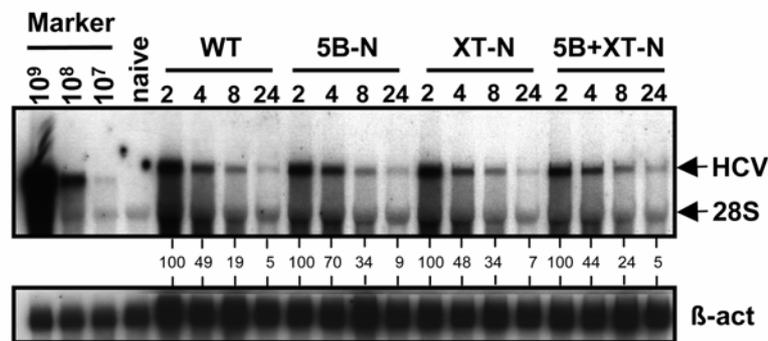


Abbildung 43: Kein Einfluss der veränderten Primärsequenzen der Komplementaritätsregionen der RNA-Elemente NS5BSL3.2 und XTSL2 auf die RNA-Stabilität. Bestimmung der RNA-Stabilität der verschiedenen Mutanten mittel Northernblot. 10µg der angegebenen Replikon-RNAs wurden in Huh-7 Zellen transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Zahlen unter den Spuren beziehen sich auf die Signalintensität nach Normierung auf β-Aktin (β-act). Der Wert 2 Stunden nach Transfektion wurde auf 100% gesetzt. Als Größenstandard dienten bekannte Mengen in vitro transkribierter RNA (Marker), als Negativkontrolle Gesamt-RNA von naiven Huh-7 Zellen. Die Positionen der HCV-, 28S- und β-Aktin RNA ist rechts angegeben.

Zum anderen könnte die Reduktion der RNA-Replikation daran liegen, dass die 3 RNA-Strukturen in die variable Region der 3' NTR verschoben wurden und es damit zu einer Verkürzung der Distanz zwischen dem NS5BSL3.2 Element und dem SL2 der X-Sequenz kam. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden in das NS5BSL3.2 Motiv des Ausgangsreplikons PI-wt 4 stille Mutationen eingefügt. Diese hoben die 7 Nukleotide lange Komplementarität zum SL2 Motiv auf, was eine Hemmung der RNA-Replikation zur Folge hatte. Diese konnte wieder hergestellt werden, wenn die entsprechenden kompensatorischen Mutationen in das Motiv von SL2 der X-Sequenz kloniert wurden. Allerdings zeigte sich in diesem Fall sogar eine 100- bis 200-fache Reduktion des Replikationsniveaus, verglichen mit der Positivkontrolle PI-wt (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigte, dass die oben

beschriebene Reduktion der Replikation nicht durch die veränderte Distanz zwischen den beiden RNA-Elementen erklärt werden kann. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit besteht in der möglichen Veränderung der Faltung der Strukturen von NS5BSL3.2 und SL2, die durch die Änderung der Primärsequenzen in den Loopbereichen verursacht wurde. Dies könnte zu einer thermodynamisch weniger günstigen Interaktion führen, was eine reduzierte Replikation zur Folge hätte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings noch keine diesbezügliche Untersuchungen durchgeführt werden. Ein erster Ansatz wäre die Analyse der Strukturen NS5BSL3.2 und SL2 mit veränderter Motivsequenz mittels NMR. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass bei allen Konstrukten mit verändertem NS5BSL3.2 und SL2 Motiv die Anzahl der resultierenden G-C und A-U Basenpaarungen identisch mit der der Wildtypsequenz war. Eine vierte Möglichkeit könnte der Verlust der Bindung viraler und zellulärer Faktoren an die mutierten RNA-Elemente sein. Dass Proteine spezifisch an diese Motive binden und eine Motivveränderung die Proteinbindung destabilisiert, was in einer verminderten Replikation resultiert, kann nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen müssen Aufschluß über diesen Sachverhalt geben. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen zumindest, dass es zu einer „kissing loop“ Interaktion zwischen den Elementen NS5BSL3.2 und SL2 der X-Sequenz kommt und diese Interaktion ist essentiell für die RNA-Replikation.

3.3.10 Untersuchungen zum Einfluss der heterologen Sequenzen auf die NS5BSL3.2-XTSL2 Interaktion

Für die bislang durchgeführten Untersuchungen wurde ein bicistronisches Replikon mit einer Poliovirus-IRES, die die Translation des Reportergens steuert, verwendet. Um einen Einfluss heterologer Sequenzen im HCV Genom auf die NS5BSL3.2 – XTSL2 Interaktion ausschließen zu können, wurden repräsentative Mutationen auch in anderen Replikonkontexten hinsichtlich der RNA-Replikation untersucht. Hierzu wurden zwei weitere Replikon-Vektoren verwendet: Ein bicistronisches Replikon, in dem das Reportergen unter der Kontrolle der HCV-IRES steht und eine monocistronische RNA, die keine heterologe regulatorische Sequenz besitzt (Abb. 44). In beiden Replikonkontexten führte die Zerstörung der 3 Stemloopstrukturen in der NS5B-kodierenden Region zum Verlust der Replikationsfähigkeit (Abb. 44; HI-mut3.1-3, mono-mut3.1-3). Nach Insertion einer intakten Version der 3 Stemloopstrukturen in die variable Region der 3' NTR konnte die Replikationskompetenz wieder hergestellt werden (Abb. 44; HI-ins3.1-3, mono-ins3.1-3).

Auch die simultane Mutation der mittleren drei Nukleotide in dem NS5BSL3.2- und SL2-Motiv, unter Beibehaltung der Komplementarität, resultierte in einer replikationsfähigen Replikon RNA. Allerdings lag die Replikationseffizienz dieser Mutante deutlich unter der der Vergleichs-RNA ins3.1-3 (Abb. 44; vergleiche HI-5B3.2x + XT-x mit HI-ins3.1-3 bzw. mono-5B3.2x + XT-x mit mono-ins3.1-3). Dies zeigt, dass die Interaktion zwischen den RNA Elementen NS5BSL3.2 und SL2 am 3' Ende der HCV RNA nicht durch heterologe Sequenzen im 5' Bereich der Replikons beeinflusst werden.

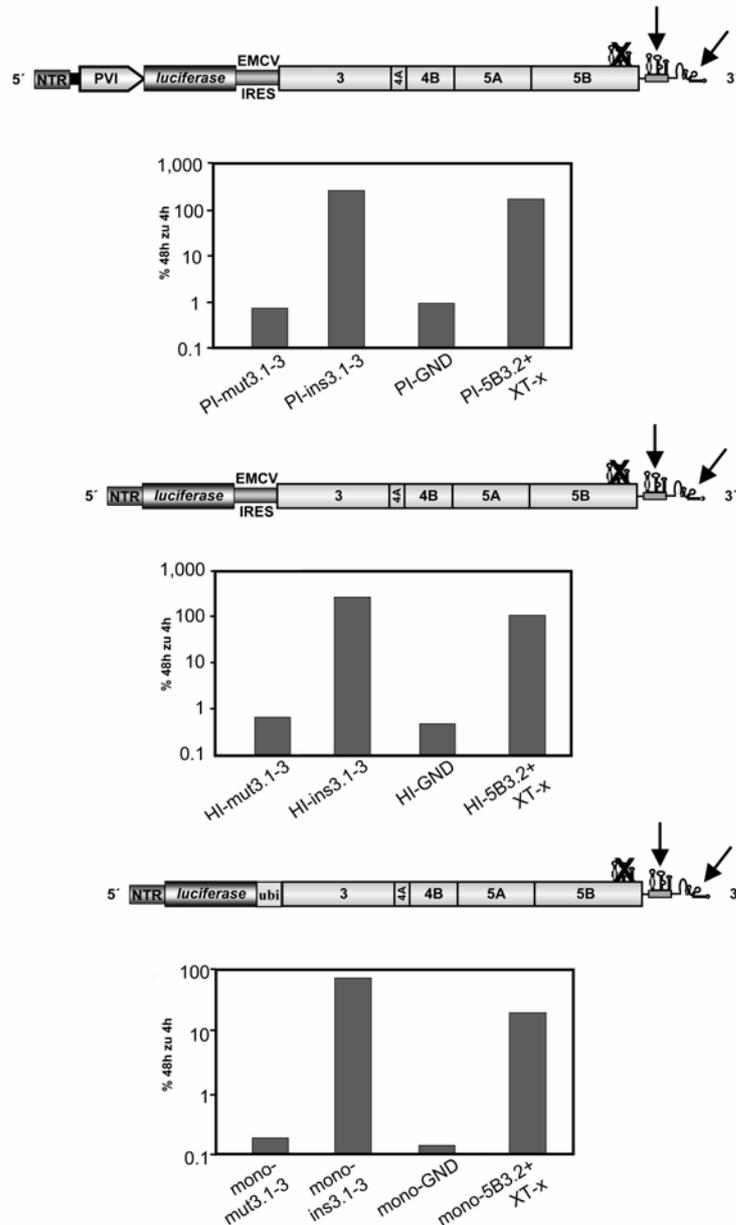


Abbildung 44: Kein Einfluss von heterologen Sequenzen auf die NS5BSL3.2-SL2 Interaktion. Links: Schematische Darstellung der verschiedenen Basis-Replikonkonstrukte. Oben: PI-ins3.1-3 (Replikon mit Poliovirus-IRES kontrollierter Luziferaseexpression), mitte: HI-ins3.1-3 (Replikon mit HCV-IRES kontrollierter Luziferaseexpression), unten mono-ins3.1-3 (Monocistronische Replikons ohne heterologe IRES). Rechts: Darstellung der Ergebnisse des transienten Replikonsystems der RNAs mut3.1-3, ins3.1-3, GND und 5B3.2x + XT-x (s. Text) in den jeweils links dazu gezeigten Replikonkontexten.

3.3.11 Auswirkungen komplementärer Nukleotidmotive im 5' und 3' HCV-Genombereich auf die RNA-Replikation

Für die dem HCV nah verwandten Flaviviren konnte gezeigt werden, dass für die RNA-Replikation eine Zirkulation des Genoms essentiell ist. Die Zirkulation wird durch komplementäre Nukleotidmotive in der 5' und 3' NTR vermittelt (Khromykh 2001). Thurner und Kollegen (Thurner *et al.*, 2004) vermuteten für das HCV eine Interaktion einer Sequenz in der NS5B-kodierenden Region (Position 8529-8544) mit einem Motiv in der 5' NTR (Position 95-110). Die Sequenz in NS5B (5' CTGCACGATGCTCGTG 3') ist invers komplementär zum Motiv in der 5' NTR (3' GACGTGCTGTGAGTAT 5') und Thurner und Kollegen vermuteten eine Basenpaarung zwischen beiden Bereichen, die zu einer Zirkulation des Genoms führen könnte. Um zu untersuchen, ob eine solche Interaktion eine Rolle für die RNA-Replikation spielt, wurden Replikons generiert bei denen auf Grund von Nukleotidsubstitutionen in den beiden RNA-Motiven keine Basenpaarung mehr möglich war. Um ein solche für die RNA-Replikation möglicherweise wichtige Interaktion zu überprüfen, wurden im Kontext der Replikon-RNA 341-sp-PVI-ET stille Mutationen in den Bereich des NS5B-Motivs eingefügt (5' TTGTACCATGTTGGT 3'; Fett gedruckt die veränderten Nukleotide). Diese Veränderungen resultierten in dem Replikon 341-sp-PVI/mut8544 (Abb. 45). Ein weiteres Replikon besaß Mutationen im Motiv in der 5' NTR (Abb. 45, 341mut95-110-sp-PVI). Die hier eingefügten Nukleotidsubstitutionen betrafen Bereiche des Stemloops 2 und veränderten die RNA-Strukturen sowohl auf Ebene der 5' NTR des Plusstrangs, als auch der 3' NTR der Minusstrangs. In Kapitel 3.1.2 konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutationen in der RNA 341mut95-110-sp-PVI zwar die Replikation unterstützen (Abb. 12 u. 45), diese aber deutlich reduzieren. Parallel dazu wurde ein Replikon generiert, das sowohl in der 5' NTR als auch im NS5B Motiv Mutationen besaß, die so gewählt waren, dass sie die Komplementarität wieder herstellten (341mut95-110-sp-PVI/mut8554). Dabei entsprachen die Mutationen in der 5' NTR denen der RNA 341mut95-110-sp-PVI, die in NS5B denen des Replikons 341-sp-PVI/mut8544. Die Analyse im transienten Replikationssystem zeigte, dass die Veränderungen in der NS5B-Region keinen Einfluss auf die Replikation hatten (Abb. 45). Demgegenüber war die Replikation bei RNAs mit Mutationen in der 5' NTR (341mut95-110-sp-PVI und 341mut95-110-sp-PVI/mut8554; Abb. 45) deutlich reduziert. Da insbesondere die RNA mit Mutationen im NS5B-Motiv vergleichbar gut wie die Wildtyp RNA replizierte, ist zu vermuten, dass die hier untersuchte mögliche Zirkulationssequenz zumindest für die RNA-Replikation nicht von Bedeutung ist.

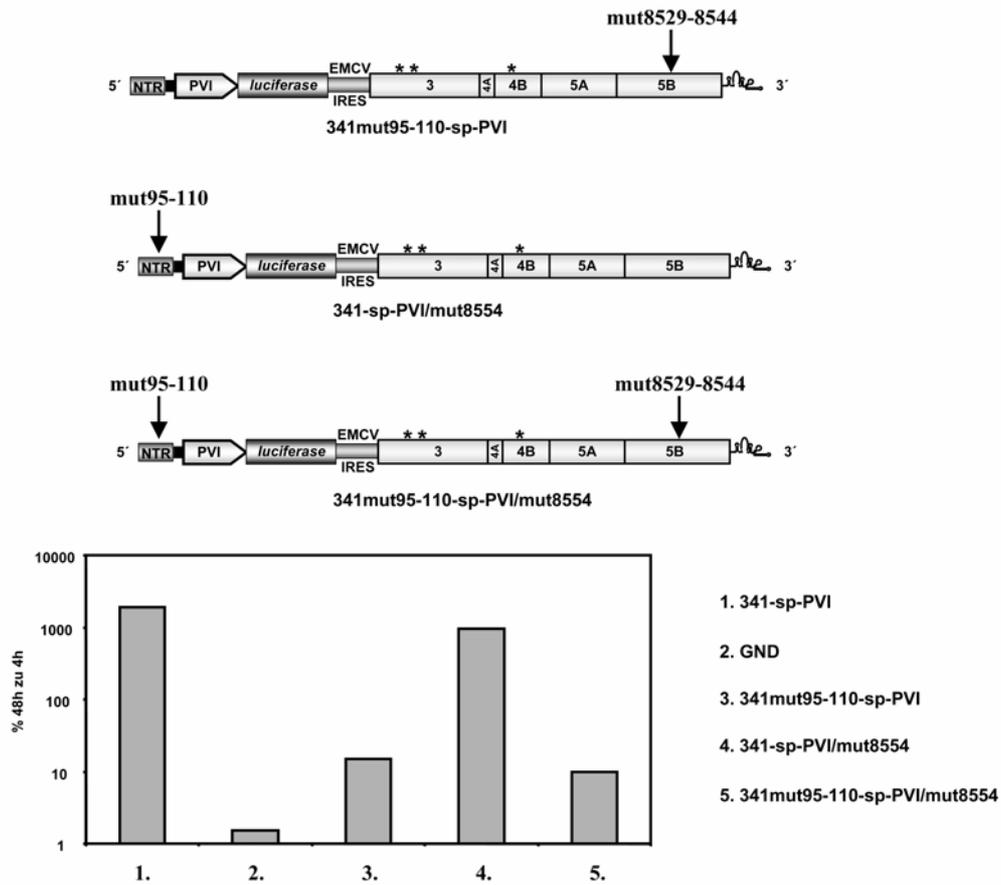


Abbildung 45: Kein Einfluss der Nukleotidsequenz an Position 8529-8529 auf die RNA-Replikation. Darstellung der Ergebnisse aus dem transienten Zellsystem. Die Replikation als Verhältnis der Luciferaseaktivität gemessen 48 Stunden und 4 Stunden nach Transfektion in Prozent angegeben. Als Positivkontrolle wurde die nt341SpPVIuc-ET-, als Negativkontrolle die GND-RNA mitgeführt.

4. Diskussion

4.1 Einfluss der HCV 5' NTR auf die RNA-Replikation

Die für die Replikation benötigten cis aktiven RNA-Elemente von Plusstrang-RNA Viren befinden sich in der Regel hauptsächlich in den NTRs. Signale in der 5' NTR spielen dabei meist eine Rolle für die Initiation der Plus- aber auch der Minusstrang-RNA Synthese.

Die HCV 5' NTR erstreckt sich von Nukleotid 1-341 und bildet 4 hochstrukturierte Domänen aus, die hinsichtlich ihrer Translationseigenschaften bereits näher charakterisiert wurden. So wird die Translation des HCV-Polyprotein durch ein IRES-Element gesteuert und ist somit cap-unabhängig (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). Die Grenzen des IRES-Elements wurden auf den Bereich der Domänen II bis IV kartiert. Inwieweit noch Sequenzen aus der Core-kodierenden Region beteiligt sind, ist unklar (Honda *et al.*, 1996, Reynolds *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 1999).

Erste Aufschlüsse über die Strukturen und Sequenzen in der 5' NTR, die für die Replikation notwendig sind, sollte die hier durchgeführte Kartierung der Replikationsdomänen erbringen. Für die Untersuchungen wurden zwei Replikon-Grundkonstruktreihen verwendet. Deletionen innerhalb der ersten 40 Nukleotide wurden im originären Replikon-Kontext durchgeführt. Dies war möglich, da gezeigt werden konnte, dass Mutationen in dieser Region die Translation des Markergens nicht oder nur moderat reduzieren. Mutationen, die innerhalb der IRES lagen und somit Einfluss auf die Translation des Markergens haben konnten, wurden in einer Konstruktreihe mit HCV-IRES-unabhängiger Translation durchgeführt. Hierzu wurden chimäre 5' NTRs hergestellt, in denen die HCV-IRES funktionell durch die IRES des Poliovirus ersetzt wurde. Da Konstrukte, in denen die Poliovirus-IRES direkt mit der HCV-IRES fusioniert wurde, nur sehr ineffizient translatiert wurden, musste ein RNA-Element mit einer Länge von 63 Nukleotiden zwischen die beiden IRES-Elemente inseriert werden, wodurch eine effiziente Translation wieder hergestellt werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zu einer Interferenz zwischen den beiden RNA-Elementen kam. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde auch bei Polioviruschimären beobachtet, bei denen die Poliovirus-IRES funktionell durch die HCV-IRES ersetzt wurde (Zhao *et al.*, 2000). Ähnliche Interferenzen zwischen IRES-Elementen wurden auch bei BVDV mit chimären 5' NTRs beobachtet (Frolov *et al.*, 1998). In diesem Fall wurde die BVDV-IRES funktionell durch die von HCV bzw. EMCV ersetzt. Auch hier kam es zu einer erniedrigten

Proteinexpression. Die molekularen Mechanismen dieser Translationsinhibitionen konnten allerdings noch nicht geklärt werden

Die internen Deletionen in den RNAs NK5.1- Δ 5-20 bzw. NK5.1- Δ 24-40 innerhalb der ersten 40 Nukleotide der HCV 5' NTR wurden in Replikons mit authentischer 5' NTR eingeführt, da diese Regionen nicht für die IRES-Funktionalität benötigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass beide Konstrukte nicht mehr replikationskompetent waren, was die essentielle Rolle der Domäne 1 der 5' NTR für die Replikation belegt. Dass der 5' terminale Bereich der HCV 5' NTR essentiell für die Replikation ist, konnte von anderen Gruppen bestätigt werden (Kim *et al.*, 2002, Luo *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse verhalten sich analog zu denen anderer Plusstrang-RNA Viren, wie zum Beispiel dem Poliovirus. Die 5' NTR des Poliovirus umfasst zwei Bereiche: eine 5' terminale „Kleeblatt“-Struktur („cloverleaf“ = Stemloop I; Abb. 46), die die Nukleotide 1-88 umfasst und ein nachfolgendes IRES-Element, das mindestens aus den Nukleotiden 134-556 besteht (Xiang *et al.*, 1997). Durch die Konstruktion chimärer 5' NTRs, die am 5' Ende die „Kleeblatt“-Struktur (Stemloop I) des Poliovirus und im 3' Bereich die IRES des HCV besaßen, konnte gezeigt werden, dass der 5' terminale Bereich der Poliovirus 5' NTR ausreichend für die Replikation dieses Virus ist (Lu *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 2001, Zhao *et al.*, 1999).

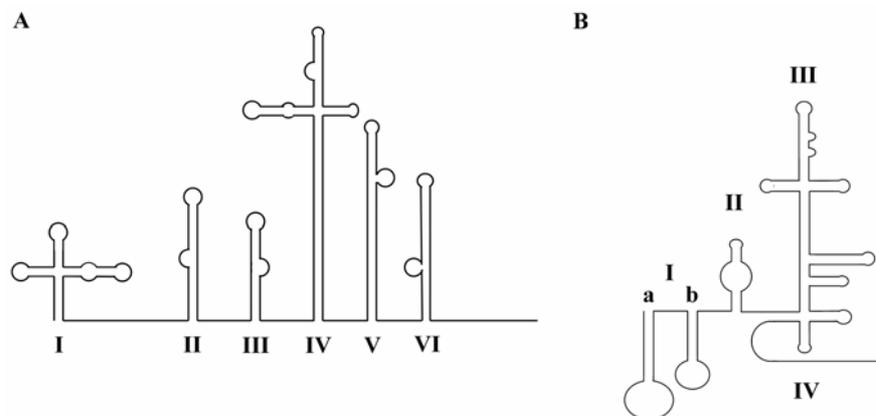


Abbildung 46: Schematische Darstellung der 5' NTRs des Poliovirus (A) und des BVDV (B). (Flint *et al.*, 2003)

Auch die 5' NTR des naheverwandten Pestivirus BVDV teilt sich strukturelle und funktionelle Eigenschaften mit der des HCV. Sie besitzt ebenfalls ein IRES-Element, das aus drei Stemloops aufgebaut ist (Stemloop II, III und IV; Abb. 46). Das AUG Startcodon befindet sich auch hier im SL IV. Abweichend zu HCV besitzt BVDV „upstream“ der IRES zwei Stemloops (1a und 1b), wohingegen HCV nur einen (SL I) ausbildet. Weder für BVDV noch für HCV wird diese Region für die Funktionalität der IRES benötigt (Chon *et al.*, 1998;

Rijnbrand *et al.*, 1997, Honda *et al.*, 1996). Durch Herstellung einer Reihe von BVDV-Viren mit chimären BVDV/HCV oder BVDV/EMCV 5'NTRs, in denen die BVDV IRES funktionell durch die des HCV oder EMCV ersetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass bereits die ersten 4 Nukleotide der BVDV-5' NTR als Replikationssignal für das BVDV ausreichend sind (Frolov *et al.*, 1998; Becher *et al.*, 2000). Allerdings werden für eine effiziente Replikation die ersten beiden Stemloops Ia und Ib benötigt (Frolov *et al.*, 1998; Yu *et al.* 2000). Somit befinden sich auch für BVDV wichtige Replikationssignale im 5' Bereich der 5' NTR.

Der Einfluss des Stemloops I und den darauffolgenden Nukleotiden 20-43 hinsichtlich der HCV-IRES-Aktivität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So gibt es Berichte, dass Stemloop I die Translation inhibiert (Yoo *et al.*, 1992, Rijnbrand 1995, Honda 1996), während andere Arbeitsgruppen berichten, dass SLI keinen Einfluss ausübt (Qi *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 1996, Zhao *et al.*, 1999) oder sogar essentiell für eine effiziente IRES-Aktivität sein soll (Fukushi *et al.*, 1994, Luo *et al.*, 2004). Unsere Ergebnisse einer 2-3-fachen Reduktion der Translation durch die Mutationen $\Delta 5-20$ bzw. $\Delta 24-40$ bestätigen die Annahme, dass dieser Bereich einen moderaten Einfluss auf die IRES Aktivität ausübt. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Berichte in der Literatur könnte mit dem jeweiligen Versuchsaufbau zu tun haben. So zeigten die beiden Mutanten in *in vitro* Translationen in verschiedenen Zellextrakten eine mit der Wildtyp-IRES vergleichbare Translationseffizienz, wohingegen in transfizierten Huh-7 Zellen eine 2-3-fache Reduktion der Translation zu beobachten war. Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse gibt es über die IRES des BVDV. Einerseits wurde gezeigt, dass die 5' terminalen Stemloops 1a und 1b nicht für die Translation benötigt werden (Chon *et al.* 1998), andererseits zeigten Versuche mit subgenomischen BVDV RNAs, dass Mutationen im Stemloop 1a neben der Replikation auch die Translation reduzierten (Yu *et al.*, 2000). Auch für das Poliovirus konnte gezeigt werden, dass die für Replikation benötigte „cloverleaf“-Struktur indirekt auch die Translation kontrolliert. So interagiert diese Struktur mit viralen und zellulären Proteinen und inhibiert bei aktiver Translation die Replikation (Barton, 2001; Gamarnik & Andino, 1998). In diesem Zusammenhang muss die Tatsache erwähnt werden, dass die HCV-Poliiovirus-5' NTR-Chimären im Kontext der gesamten HCV 5' NTR (341-sp-PVI) eine gesteigerte Replikationskompetenz aufweisen verglichen mit Replikons, die nur die HCV 5' NTR am 5' Ende besitzen (Lohmann *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus für diese Steigerung ist unbekannt, es ist jedoch zu vermuten, dass die verbesserte Replikation durch eine Entkopplung der Translation- und Replikationssignale der HCV 5' NTR zustande kommt.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der in vitro- und Zellkultur-Untersuchungen belegen, dass Analysen der Translationsaktivität von IRES Elementen in möglichst authentischem Kontext durchgeführt werden müssen. So konnte nur im Kontext des Volllänge-genoms eine RNA:RNA Interaktion zwischen den Nukleotiden 24 bis 38 und den Nukleotiden 428 bis 442 in der Core-kodierenden Region gezeigt werden, die eine Hemmung der RNA-Translation zur Folge hat. So bewirkte eine Aufhebung der Komplementarität zwischen den beiden Regionen durch Mutationen eine Verstärkung der Translation, welche andererseits durch kompensatorische Mutationen, die die Komplementarität wieder herstellten, aufgehoben wurde (Kim *et al.*, 2003). Allerdings kann die Reduktion der Translation in unserer $\Delta 24-40$ Mutante nicht durch diese Interaktion erklärt werden, da in unseren Replikons die entsprechende Core-kodierende Region deletiert ist. Inwieweit die Mutationen $\Delta 5-20$ bzw. $\Delta 24-40$ Auswirkungen auf die Strukturen des IRES-Elements haben und deshalb die IRES-Aktivität reduzierten, konnte noch nicht geklärt werden. Dass die Reduktion der Translation allerdings zum Verlust der Replikation führte ist unwahrscheinlich, da die für die Replikation benötigten Proteine NS3-5B durch die EMCV-IRES exprimiert wurden.

Um die Frage zu klären, inwieweit die Sequenzen „upstream“ der IRES ausreichend für die HCV Replikation sind – wie es für BVDV und das Poliovirus gezeigt werden konnte – musste das originäre Replikon leicht abgewandelt werden. Da Deletionen innerhalb des IRES-Elements zu einem Verlust der Translation des Markergens führen konnten, wurde die HCV-IRES funktional durch die des Poliovirus ersetzt. Die daraus resultierende chimäre 5' NTR bestand aus einem variierenden Anteil der HCV-5' NTR die am 3' Ende mit der Poliovirus-IRES fusioniert wurde. Um Interferenzen zwischen diesen RNA-Elementen zu vermeiden, wurden sie durch einen 63 Nukleotide langen RNA-Abschnitt separiert. In diesem Kontext zeigte sich, dass die ersten 40 Nukleotide der HCV 5' NTR nicht ausreichend waren, um RNA-Replikation zu unterstützen. Vielmehr waren zusätzliche Sequenzbereiche aus der IRES-Region erforderlich. Dabei stieg die Replikationseffizienz mit zunehmender Länge der HCV 5' NTR, wobei die gesamte 5' NTR für maximale RNA-Vermehrung benötigt wurde. Dies ist deutlich anders als beim BVDV. Im Kontext von Replikons mit BVDV-HCV oder –EMCV chimären 5'NTRs genügen die ersten 5 Nukleotide der BVDV 5' NTR für die RNA-Replikation. Allerdings wurden die Untersuchungen für BVDV in Volllänge-genomen durchgeführt, die für HCV in Replikons, denen die Sequenzen der Strukturgene fehlen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Fusion von HCV 5' NTR Sequenzen mit der Poliovirus-IRES die Struktur oder Funktion der Replikationssignale beeinträchtigt. In diesem Falle wären Sequenzen in der HCV-IRES als „Spacer“- und nicht als Replikationselemente

aktiv. Allerdings zeigen monocistronische Replikons, in denen die verschiedenen Anteile der HCV 5' NTR direkt mit der EMCV-IRES fusioniert wurden, dieselben Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Auch für das Poliovirus reicht generell der Bereich des „cloverleaf“ 5' der IRES-Region für die Synthese neuer RNA aus. Allerdings lassen neuere Untersuchungen vermuten, dass auch hier Signale für die Replikation und Translation überlappen (Borman *et al.*, 1997; Shiroki *et al.*, 1995).

Um einen besseren Überblick über die Bereiche zu bekommen, die sowohl für die Translation als auch Replikation der HCV RNA benötigt werden, werden diese Bereiche im folgenden näher beschrieben:

Für die in Abbildung 6 gezeigte Sekundärstruktur von SL II (nach Honda *et al.*, 1999) wurden in den letzten Jahren verschiedene alternative Faltungsmöglichkeiten berichtet (Zhao *et al.*, 2001; Odreman-Macchioli *et al.*, 2001; Luvasky *et al.*, 2003). Obwohl das IRES-Element die 40S Untereinheit auch ohne SL II bindet (Otto *et al.*, 2002) konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich wichtig für die Translationsaktivität ist (Qi *et al.*, 2003). So konnten strukturelle Veränderungen der ribosomalen Untereinheit nur in Verbindung mit SL II beobachtet werden und es wird angenommen, dass SL II bei der Positionierung der RNA eine entscheidene Rolle spielt (Spahn *et al.*, 2001). Weiterhin konnte die Bindung verschiedener Proteine an diesen Bereich nachgewiesen werden (Pestova *et al.*, 1998; Fukushi *et al.*, 2001; Odreman-Macchioli *et al.*, 2001). Eine Sequenzanalyse ergab, dass der Nukleotidbereiche 81-85 (ARCCA), 71-73 (GAA) und 92-96 (UAGUA) zwischen verschiedenen HCV Isolaten - aber auch Pestiviren - konserviert ist (Honda *et al.*, 1999).

Eine Reihe von Mutationsanalysen charakterisieren den für die IRES-Aktivität benötigten Bereich näher (Kalliampakou *et al.*, 2002; Odreman-Macchioli *et al.*, 2001). Dabei stellte sich heraus, dass der konservierte Loopbereich 81-84 nur einen moderaten Einfluss auf die IRES – Funktion ausübt, wohingegen die Nukleotide 80 und 85 essentiell zu sein scheinen. Mutationen im Bulge unmittelbar unterhalb des Loops (Nukleotide 71-73/93-98) bewirkten einen moderaten Effekt, wohingegen die Deletion der Nukleotide 93-96 zu einem Verlust der Translation führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die obere Region des SL II, besonders die konservierten Nukleotidbereiche 71-73, 81-84 und 92-96, nicht unmittelbar für die IRES Funktion benötigt werden und lassen vermuten, dass diesen Sequenzen eine Rolle für die RNA-Replikation zukommt. Diese Annahme wird auch bestärkt durch den Verlust der Replikation der RNA „ Δ 72-96“ (im Kontext des Replikons 125-sp-PVI). Weiterhin deuten auch Versuche mit HCV-CSFV chimären 5'NTRs darauf hin (Reusken *et al.*, 2003). In diesem Kontext wurde der apikale Bereich des SL II (Nukleotide 71-96) durch den analogen

Bereich der CSFV 5' NTR ersetzt, in dem sich die konservierten Sequenzen befinden. Diese Mutante, die keinen Effekt auf Translationsebene zeigte, war noch in der Lage zu replizieren, wohingegen der Austausch des gesamten SL II, der die Translation nur minimal reduzierte, zu einem Verlust der Replikation führte (Reusken *et al.*, 2003). Dass die RNA 125mut95-110-sp-PVI nicht replizierte, wohl aber die RNA 341mut95-110-sp-PVI und die Annahme, dass der obere Bereich des SL II essentielle Bereiche für die Replikation beinhaltet, könnte darin begründet sein, dass die Mutationen mut95-110 nur im Kontext des verkürzten 5' NTR Replikon (125-sp-PVI) zu Strukturveränderungen des gesamten SL II führen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass auch der mittlere Bereich des SL II zur Replikation beiträgt und im Kontext der ersten 125 Nukleotide essentiell ist, wohingegen im Kontext der gesamten 5' NTR andere Signale den Verlust dieses Bereiches kompensieren. Dies würde auch die stark verminderte Replikationseffizienz der 341mut95-110-sp-PVI-RNA erklären.

Ungeklärt ist bisher, ob die Mutationen in der 5' NTR die Synthese des Plus- oder des Minusstranges betreffen. In Analogie zu anderen Plusstrang-RNA Viren ist es wahrscheinlich, dass die Mutationen im wesentlichen den 3' Bereich des Minusstrangs betreffen, d.h. den Promotor für Plusstrangsynthese. Strukturanalysen zeigten, dass die letzten 106 Nukleotide der Minusstrang-RNA zwei stabile Stemloops am 3' Ende ausbilden (Schuster *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002; Abb. 14A). Dass dieser Bereich dem Minimal Promotor für Plusstrang-RNA Synthese entspricht, zeigen die vergleichbaren Replikationsniveaus der Konstrukte 125-sp-PVI, 119-sp-PVI und 106-sp-PVI. In diesem Kontext betrachtet zerstören die Nukleotiddeletionen 72-96 und 61-104 den zweiten Stemloop, was zu einem Verlust der Replikation führt. Die Mutationen im Nukleotidbereich 95-110 betreffen hier den unteren Bereich des zweiten Stemloops sowie die ersten 4 Nukleotide des dritten Stemloops. Auffallend ist, dass die konservierten Nukleotidbereiche 71-73, 81-84 und 92-96 (im Kontext der Strukturvorhersagen für den 3' Bereich des Minusstrangs; Abb. 14A) zum Teil in ungepaarte und somit leicht zugängliche Regionen fallen. Besonders auffallend ist, dass die Nukleotide 78-83 und 91-97 große Bulgeregionen bilden. Es sei darauf hingewiesen, dass sich die Nukleotide 80-83 im Loop des SL II der Plusstrang 5' NTR befinden und dass diese Sequenz zum einen konserviert ist, zum anderen primär keinen Einfluss auf die IRES Aktivität besitzt. Weiterhin deuten *in vitro* Untersuchungen darauf hin, dass der Nukleotidbereich 85-103 (der den „Bulge“-Bereich 91-97 auf Minusstrangebene ausbildet) wichtig für die Synthese neuer RNAs durch die NS5B-Polymerase ist (Reigadas *et al.*, 2003). Feinkartierungen müssen klären, ob diese Regionen *in vivo* Erkennungssignale für die Replikation darstellen.

Weiterhin auffallend war, dass sich die Bereiche SL IIIa und IIIb auch auf Minusstrangebene analog ausbilden (Schuster *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002). Die Loopsequenz „AGUA“ von Stemloop IIIa ist einerseits zwischen HCV Isolaten stark konserviert, andererseits auch bei den nahverwandten Pestiviren absolut invariant (Smith *et al.*, 1995). Für das Pestivirus CSFV konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Loopbereich keinen Einfluss auf die Translationseffizienz der IRES haben, wohingegen Mutationen, die die Länge des Stems oder die Größe des Loops betreffen bzw. eine Deletion der gesamte Region zu einem drastischen Verlust der IRES-Aktivität führte. Für HCV gibt es kontroverse Berichte über die Beteiligung des SL IIIa an der IRES-Aktivität. So konnte die Arbeitsgruppe von Kolupaeva keine Beteiligung an der Bindung der 40S Untereinheit nachweisen (Kolupaeva *et al.*, 2000), andere Untersuchungen konnten dies nicht bestätigen (Kieft *et al.*, 2001; Hellen & Sarnow 2001). Es bleibt zu untersuchen, inwiefern die Sequenz von IIIa in die IRES-Aktivität involviert ist oder ob die höher geordnete Struktur des SL III an dieser Position benötigt wird (Kieft *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass zumindest die Loopsequenz hoch konserviert ist und den Ergebnissen aus den CSFV Untersuchungen, die keinen Einfluss der Loopsequenz auf die Translation zeigten sowie der analogen Ausbildung der Stemloop-Strukturen am 3' Ende des Minusstranges liegt die Vermutung nahe, dass diese Region Signale für die Replikation beinhalten könnte. Die hier durchgeführten Untersuchungen diesbezüglich lieferten allerdings kein eindeutiges Ergebnis. So zeigte die RNA 341 Δ IIIa-sp-PVI, in der die gesamte IIIa Region entfernt wurde, eine 5-fache Reduktion der Replikation. Das Replikon 341 IIIa_{mut}-sp-PVI, das Mutationen in der konservierten Loopregion besaß, wies allerdings keinen Unterschied in der Replikation zum Wildtyp auf. Somit scheint zumindest das hochkonservierte „AGUA“ Motiv keine Bedeutung für die Replikation zu haben. Die Reduktion der Replikation der 341 Δ IIIa-sp-PVI-RNA könnte auf Strukturveränderungen durch die Deletion des IIIa Bereiches beruhen oder, da der Versuch nur einmal durchgeführt wurde, auf experimentellen Schwankungen. Weitere Versuche in diesem Bereich müssen hierüber Aufschluss geben. Für eine Beteiligung des IIIa Bereich an der Replikation sprechen neuste Untersuchungen an Quasispecies. Hier konnte eine Punktmutation im IIIa Stembereich (C168G) identifiziert werden (Lu *et al.*, 2000; Leeuwen *et al.*, 2004), die einen moderaten Einfluss auf die Translation, jedoch eine immense Reduktion der Replikation (50-100fach verglichen zum Wildtyp) verursachte (Leeuwen *et al.*, 2004). Interessanterweise kam es im Zellkultursystem zu Revertanten, bei denen kompensatorische Mutationen auf der gegenüberliegenden Stemseite die Struktur wieder herstellten und zu einer leicht verbesserten Replikation (verglichen zum Wildtyp) führten.

In diesem Zusammenhang ist noch interessant zu erwähnen, dass die IRES des Porcine Teschovirus Type 1 Talfan (PTV-1), einem Mitglied der Familie der *Picornaviridae*, funktionell analog zur HCV-IRES ist und sich somit von anderen IRES-Elementen seiner Familie unterscheidet (Pisarev *et al.*, 2004). Obwohl es noch keine experimentellen Daten über die Struktur der IRES gibt, lassen zum einen die funktionelle und zum anderen die hohe Sequenz Übereinstimmung von 55% zu HCV eine ähnliche Struktur vermuten. Auffallend ist, dass die Loopsequenz des SL IIIa – sofern dieser ausgebildet wird – auch das Motiv „AGUA“ besitzt.

Auch der SL IIIb wird analog am 3' Ende des Minusstrang ausgebildet und ist somit ein potentielles Replikationssignal für die Initiation der Plusstrang-RNA-Synthese. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich auf Plusstrangebene an der Bindung des eukaryontischen Initiationsfaktor 3 (eIF3) beteiligt ist (Kieft *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2001). Andere Untersuchungen ergaben, dass nicht die Loopsequenz sondern der Strukturbereich wichtig für die Bindung ist (Collier *et al.*, 2003; Buratti *et al.*, 1998). So zeigte ein IRES-Element mit invertierter Loopsequenz vollständige, eine IRES mit Deletion der Loopsequenz nur 60%ige Aktivität. Betrafen die Mutationen hingegen den darunter liegenden Bulgebereich, reduzierte sich die Translationseffizienz auf 20-30%. Die Untersuchungen mit HCV-CSFV chimären 5' NTRs lassen allerdings vermuten, dass der Loopbereich höchstens eine untergeordnete Rolle sowohl für die Translation als auch die Replikation spielt. So wurde in einem Konstrukt, der den oberen Loop umfassende Bereich des SL III der HCV-IRES (Nukleotide 187-210) durch den entsprechenden Bereich der CSFV 5' NTR (Nukleotide 199-214) ausgetauscht (Reusken *et al.*, 2003). Dabei entspricht der Loop IIIb des HCV der Sequenz „CCUUUCUUGGAUAA“, wohingegen der CSFV IIIb-Loop nur die Nukleotide „ACUA“ besitzt. Bei diesem Konstrukt betrug die Translationsaktivität nur 60-70% verglichen mit der Wildtyp-HCV-IRES. Das Replikationsniveau betrug 70% des Wildtypniveaus. Wurde der gesamte apikale Bereich des Loops III ausgetauscht (also die HCV Nukleotide 172-227 gegen die CSFV Nukleotide 183-225), resultierte dies in einer Reduktion der Translationskompetenz auf ungefähr 30% und der Replikationseffizienz auf 20%. Obwohl gerade bei letzterem Konstrukt ein Zusammenhang zwischen der reduzierten Translation und dem Verlust der Replikationskompetenz nicht ausgeschlossen werden kann, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Bereich IIIb höchstens eine untergeordnete Rolle für die Replikation spielt. Dies bestätigt auch die volle Replikationskompetenz der 341 Δ IIIb-sp-PVI-RNA, bei der die Loopsequenz deletiert ist.

Interessanterweise zeigte eine HCV-CSFV chimäre 5'NTR, in der die Bereiche der Stemloops IIIa/b/c und d (Nukleotide 134-290) gegen die analoge CSFV Sequenz (Nukleotide 144-307) ausgetauscht wurde, eine mit dem Wildtyp vergleichbare Translationsaktivität, während die Replikation auf 5% reduziert wurde. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Sequenzen im Bereich IIIc, d oder e und f sowie SL IV die Replikation unterstützen. Diese Annahme wird durch unsere Beobachtung, dass die Replikationskompetenz mit zunehmender Länge der HCV 5' NTR steigt, verstärkt. In diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache interessant, dass für das Minusstrang 3' Ende alternative Strukturen möglich sind. So können die letzten 20 Nukleotide auf Ebene des Minusstrangs neben der Faltung des bereits beschriebenen Stemloops auch mit weiter entfernten Nukleotiden (Nukleotide 235-254) Wechselwirken und eine alternative Struktur ausbilden. Es konnte allerdings bislang weder geklärt werden, ob es *in vivo* zur Ausbildung dieser Strukturen kommt, noch ob diese einen Einfluss auf die Synthese des Plusstrangs haben.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass der Sequenzbereich der ersten beiden Stemloops (SL I und SL II) als minimaler Promotorbereich für die RNA-Synthese ausreicht. Dies entspricht den beiden letzten Stemloops des 3' Ende des Minusstrangs. Effiziente Replikation benötigt jedoch die gesamte HCV 5' NTR (bzw. den entsprechenden 3' Bereich des Minusstrangs). Diese Befunde konnten auch durch andere bestätigt werden (Kim *et al.*, 2002, Luo *et al.*, 2003). Ungeklärt ist die genaue Funktion der einzelnen Bereiche. Banerjee and Dasgupta konnten allerdings zeigen, dass die NS3-Helikase, die wahrscheinlich an der Synthese neuer RNA beteiligt ist, spezifisch mit dem 3' Bereich des Minusstrangs interagiert, der dem SL I des Plusstrangs entspricht (Banerjee and Dasgupta, 2001). *In vitro* konnte auch eine Bindung von NS5B an die Nukleotidbereiche -1 bis -122 bzw. bis -239 des 3' Ende des Minusstranges gezeigt werden (Oh *et al.*, 1999). Weiterhin bewirkte eine Deletion der Nukleotide -1 bis -45 eine drastische Verminderung dieser Bindung (Reigadas *et al.*, 2001). Es ist also zu vermuten, dass die Stemloop-Elemente an einer Interaktion mit viralen, möglicherweise auch zellulären Proteinen beteiligt sind, die eine essentielle Rolle bei der Initiation der RNA-Replikation spielen.

4.2 Einfluss der HCV 3' NTR auf die RNA-Replikation und – Translation

Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen die *in vivo* Versuche im Schimpansen, in denen gezeigt wurde, dass HCV-RNAs ohne polyU/UC-Bereich oder mit fehlender X-Sequenz nicht mehr infektiös sind (Yanagi *et al.*, 1999, Kolykhalov *et al.*, 2000). Dies steht

im Widerspruch zu früheren Veröffentlichungen, in denen *in vitro* Replikation auch ohne 3' NTR beschrieben wurde (Dash *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1995). Dass speziell die 3' Bereiche viraler Genome eine entscheidende Rolle insbesondere für die Replikation spielen, zeigen die Beispiele andere Plusstrang-RNA Viren, darunter Mitglieder der Alphaviren (Strauss & Strauss, 1994), Nodaviren (Ball, 1995; Ball & Li, 1992) und Picornaviren (Wimmer *et al.*, 1993). Auch bei Mitgliedern der Familie der *Flaviviridae* konnte ein Einfluss der 3' Bereiche auf die Replikation gezeigt werden, unter anderem für das Dengue Virus (Men *et al.*, 1996), Tick-borne Encephalitis Virus (Mandl *et al.*, 1998) und für BVDV (Yu *et al.*, 1999). Auch GBV-B, ein dem HCV sehr nahe verwandtes Virus, besitzt Bereiche in der 3' NTR, die für die Infektiosität essentiell sind (Bukh *et al.*, 1999; Sbardellati *et al.*, 2001). Auch die Tatsache, dass der Aufbau der HCV 3' NTR in allen Isolaten konserviert ist und die Primärsequenz der X-Sequenz sogar hoch konserviert ist (Kohlykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996), spricht für eine essentielle Rolle im viralen Lebenszyklus.

Im folgenden werden die Funktionen der einzelnen Bereiche detailliert diskutiert:

Ergebnisse, die mit den partiellen Deletionen der variablen Region (Δ var-9401) erzielt wurden, entsprachen weitgehend denen der Deletionsmutante, die im Schimpansen getestet wurde (Yanagi *et al.*, 1999). In beiden Untersuchungssystemen zeigte sich, dass die entsprechende HCV-RNA replikationskompetent war. Das *in vivo* Model zeigte weiter, dass HCV-Genome mit Deletionen in dieser Region noch infektiös sind und somit im gesamte HCV-Lebenszyklus funktionell sind. Die Deletion der gesamten variablen Region (Δ var-9415) zeigte hinsichtlich ihrer Replikationskompetenz im Zellkultursystem keine signifikanten Unterschiede zu der Mutante mit den Teildeletion. Ob diese Mutante ebenfalls noch infektiös ist, konnte nicht untersucht werden.

Bei anderen Flaviviren wie dem Kunjin- und dem Tick-borne encephalitis Virus (Men *et al.*, 1996, Mandl *et al.*, 1998, Khromykh *et al.*, 1997) konnte gezeigt werden, dass die variablen Regionen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur minimalen Einfluss auf die Replikation ausüben. Beim HCV hingegen führen größere Deletionen (Δ var-9401, Δ var-9415) zu einer Verminderung der Replikationseffizienz, wohingegen einzelne Punktmutationen (-Stu und -Stu/Xba [s. Kapitel 3.2.1]) ohne Einfluss auf die Replikation toleriert werden. Hinsichtlich der RNA-Neusynthese werden auch Insertionen in die 3' NTR toleriert (s. Kapitel 3.3.5; PI-ins3.1-3, PI-dup3.1-3 und PI-ins3.2). Dass es zu einer drastischen Reduktion der Replikationskompetenz durch große Deletionen in der variablen Region kam, spricht für eine noch nicht näher charakterisierte Rolle dieser Region. Neue Erkenntnisse lassen vermuten,

dass eine in Leberzellen spezifisch vorkommende miRNA an diesen Bereich bindet und damit die Replikation beeinflusst (P. Sarnow, persönliche Mitteilung).

Dass die variable Region nicht essentiell für die Replikation subgenomischer HCV Replikons in Zellkultur ist, konnte auch von Yi und Lemon bestätigt werden (Yi & Lemon, 2003). Auch für das dem HCV nah verwandte GBV-B konnte gezeigt werden, dass der Bereich der 3' NTR, der der variablen Region des HCV entspricht, nicht für Infektiosität benötigt wird (Nam *et al.*, 2004).

Die Tatsache, dass der polyU/UC-Bereich zwar signifikante Unterschiede in Länge und Zusammensetzung in unterschiedlichen Isolaten aufweist, aber generell in allen HCV Genomen konserviert ist, lässt eine wichtige Rolle im Lebenszyklus des HCV vermuten. Die Untersuchungen im Schimpansen ergaben, dass ein HCV-Genom ohne polyU/UC-Bereich nicht mehr infektiös ist (Yanagi *et al.*, 1999). Die hier durchgeführten Untersuchungen im Replikonsystem ergaben, dass ein polyU-Bereich von 26 homopolymeren Uridinresten ausreichend für die RNA-Replikation ist. Versuche, diesen Bereich durch homopolymere Adenin-, Guanosin- oder Cytosinreste funktionell zu ersetzen, waren nicht erfolgreich. Untersuchungen von Revertanten, die aus Replikon-RNAs mit 6 Uridinresten hervorgingen, wiesen einen polyU-Bereich von mehr als 40 Uridinen auf. Die genaue Länge des PolyU-Bereiches in diesen Revertanten ist allerdings schwierig zu bestimmen, da sowohl Fehler während der Amplifikation mittels RT-PCR als auch bei der Sequenzierreaktion auftreten können. Im Gegensatz dazu wurden die homopolymeren Konstrukte mit 26 Uridinen mit Hilfe definierter Oligonukleotide hergestellt. Diese Ergebnisse können die Vermutung von Kolykhalov nicht bestätigen, der einen Vorteil für die Replikation von HCV RNAs mit einem polyU/UC-Bereich von 127 Nukleotiden gegenüber RNAs mit 75 Nukleotiden vermutete (Kolykhalov *et al.*, 1997).

Die Untersuchungen von Yi und Lemon (2003) konnten die hier erzielten Ergebnisse zum Teil bestätigen (Yi & Lemon, 2003). Im Gegensatz zu den hier verwendeten homopolymeren U-Bereichen ersetzten Yi und Lemon den Wildtyp polyU/UC-Bereich durch verkürzte polyU/UC-Sequenzen. Dabei zeigte sich, dass eine HCV RNA mit einem polyU/UC-Bereich, der den 3' terminalen 30 Nukleotiden der Wildtyp-Sequenz entsprach (5' (C)₂(U)₃ (C)₂(U)₂C(U)₁₂(C)₃UC(U)₃ 3'), nicht replikationskompetent war. Dabei war der längste homopolymere Uridin Bereich 12 Nukleotide lang. Das Hinzufügen eines homopolymeren polyU-Bereiches von 20 Uridinen unmittelbar vor den verkürzten polyU/UC-Bereichs (5' (U)₂₀(C)₂(U)₃ (C)₂(U)₂C(U)₁₂(C)₃UC(U)₃ 3') führte zu einer intermediären Replikationseffizienz. Wurde dieser (U)₂₀ Bereich auf (U)₃₂ verlängert wurde die Replikation

vollständig wieder hergestellt. Yi und Lemon (2003) vermuten, dass ein homopolymerer Uridin-Bereich in dieser Region effizienter ist als eine polyU/UC-Sequenz und ein homopolymerer Bereich von mindestens 20-32 Uridinen für effiziente Replikation benötigt wird. Dies steht im Einklang mit den hier erzielten Ergebnissen.

In diesem Zusammenhang muss auch auf die Bindung viraler und zellulärer Proteine eingegangen werden. Für die viralen Proteine NS3 und NS5B konnte eine bevorzugte Bindung an homopolymere Uridin-Bereiche nachgewiesen werden (Lohmann *et al.*, 1997; Kanai *et al.*, 1995; Gwack *et al.*, 1996; Pellerin *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2000). Für die NTPase Aktivität des NS3 Proteins wurde eine 25-fache Steigerung durch die Bindung an polyU-Polymere beschrieben (Morgenstern *et al.*, 1997; Preugschat *et al.*, 1996; Suzich *et al.*, 1993), die eine Länge von mindestens 12 bis 15 Nukleotiden haben müssen (Preugschat *et al.*, 1996). Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, dass für RNA-Replikation ein polyU-Bereich zwischen 6 und 26 Nukleotiden Länge benötigt wird.

Weiterhin wurden zelluläre Proteine identifiziert, die an den polyU/UC-Bereich der 3' NTR des HCV binden. Darunter das La- und das PTB Protein (Ali & Siddiqui, 1997; Gontarek *et al.*, 1999; Ali & Siddiqui, 1995; Tsuchihara *et al.*, 1997; Luo, 1999; Chung & Kaplan, 1999). Diese beiden Proteine binden auch an die 5' NTR (Ali & Siddiqui, 1995; Tsuchihara *et al.*, 1997) und es wird vermutet, dass es über diese Proteine zu einer für die Replikation notwendigen Interaktion zwischen dem 5' und dem 3' Bereich des Genoms kommt. Allerdings konnte diese Interaktion bislang noch nicht bestätigt werden. Auch eine Bindung von GAPDH an den polyU/UC-Bereich wurde berichtet (Petrik *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein, das den polyU/UC-Bereich binden soll, ist das heterogene nukleare Ribonukleoprotein C (hnRNP C; Gontarek *et al.*, 1999). Dieses Protein soll Wechselwirkungen mit anderen Proteinen modulieren und könnte als Rekrutierungsfaktor für diese Proteine dienen (Portman *et al.*, 1994). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass das hnRNP K Protein mit dem Core Protein interagieren soll (Hsieh *et al.*, 1998). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass das Core mit dem SL 2 in der X-Sequenz interagieren und dort strukturelle Veränderungen durchführt (Cristofari *et al.*, 2004). Ob diese Proteine in vivo tatsächlich binden und eine wichtige Funktion im viralen Lebenszyklus ausüben, ist noch nicht geklärt. Interessant ist, dass für das mit dem HCV nah verwandte GBV-B der polyU-Bereich nicht essentiell für die Infektiosität ist (Nam *et al.*, 2004).

Die Primärsequenz des X-Bereichs ist hoch konserviert zwischen allen HCV Isolaten (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1996). Diese 98 Nukleotide am extremen 3' Ende des HCV Genoms bilden 3 Stemloopstrukturen aus, von denen der stabile

Stemloop 3 experimentell bestätigt werden konnte (Blight & Rice, 1997). Die beiden Stemloops 1 und 2 konnten experimentell nicht eindeutig nachgewiesen werden und es wird vermutet, dass die entsprechende RNA auch andere Strukturen als die in Abbildung 16 gezeigten ausbilden kann. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die dem Stemloops 2 entsprechende Nukleotidsequenz tatsächlich diese Struktur ausbildet; zumindest außerhalb des Kontext der 3' NTR (s. Kapitel 3.3.7). Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass die hier als Wildtyp dienende Referenz nicht der eigentlichen Konsensussequenz der X-Region entspricht. So wurde am Fuß des Stemloops 3 an Position 9603 das Uridine durch ein Adenin und kompensatorisch das Adenin an Position 9562 durch ein Uridin ersetzt. Diese Mutationen waren notwendig um eine Restriktionsschnittstelle zu erzeugen, die für die Herstellung von „run-off“-Transkripten notwendig ist (s. Material und Methode). Diese Veränderung bewirkt eine nur sehr schwache Reduktion der Replikationskompetenz verglichen mit der von Replikons, die das authentische 3' Ende besitzen (M. Windisch, pers. Mitteilung).

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben gezeigt, dass alle 3 Stemloopstrukturen im Bereich der X-Sequenz für die Replikation essentiell sind. Dabei deuten die Ergebnisse, die mit den Mutationen im Stem Bereich von Stemloop 1 und 2 erzielt wurden darauf hin, dass entweder die Primärsequenz oder die Stabilität dieser Regionen von großer Bedeutung für die RNA-Replikation ist. Eine mögliche Erklärung für die funktionelle Wichtigkeit der X-Sequenz für die Replikation könnte in den beschriebenen Bindungen zellulärer und viraler Proteine an diese RNA-Region liegen. Wie schon für die variable Region beschrieben wird eine Bindung von PTB auch an die X-Sequenz vermutet. Als Bindungsstellen werden Stemloop 1 und 2 favorisiert (Chung & Kaplan, 1999; Ito & Lai, 1997; Tsuchihara *et al.*, 1997). Es wurde auch die Bindung anderer Faktoren an die 3'NTR berichtet (Gontarek *et al.*, 1999; Luo 1999, Spangberg *et al.*, 2000), wobei unklar ist, welchen Einfluss diese zellulären Proteine auf den Lebenszyklus des HCV haben. Des weiteren wird auch die Bindung von viralen Proteinen an die X-Sequenz berichtet. So konnte eine spezifische Bindung der beiden Hauptkomponenten der viralen Replikationsmaschinerie, NS3 und NS5B, an die X-Region und den polyU/UC-Bereich nachgewiesen werden (Oh *et al.*, 1999, 2000; Banerjee & Dasgupta, 2001; Cheng *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2002; Paolini *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen für die RNA-abhängige RNA-Polymerase, dass für eine Bindung an den 3' Bereich Sequenzen in der kodierenden Region von NS5B, der polyU/UC-Bereich und Bereiche der X-Sequenz benötigt werden (Oh *et al.*, 1999, 2000). In vitro Untersuchungen deuten außerdem an, dass

die Initiation der Transkription entweder im Loop (Oh *et al.*, 2000) oder im Stem des Stemloops 3 beginnen könnte (Kim *et al.*, 2002).

Stemloops 2 scheint eine wichtige Bindungsdomäne für das Core-Protein zu sein (Cristofari *et al.*, 2004). Es wurde gefunden, dass die Bindung von Core an SL2 der X-Sequenz zu einer strukturellen Veränderung und daraus resultierend zu einer Homodimerisierung dieser RNA-Region führen soll. Wie bereits oben beschrieben ist in diesem Zusammenhang auch die Bindung von hnRNP C an den polyU/UC-Bereich zu erwähnen (Gontarek *et al.*, 1999). In Analogie zu hnRNP K könnte auch hnRNP C mit dem Core Protein interagieren und dessen Wechselwirkung mit dem Stemloop 2 der X-Sequenz katalysieren.

Der sehr stabile Stemloop 3 besitzt in seinem Loopbereich eine Primärsequenz, die der Nukleotidsequenz im apikalen Bereich des 3' terminalen Stemloops von BVDV sehr ähnlich ist (5' AUAGU 3'). Es wurde gefunden, dass die Substitutionen der Nukleotide „UA“ durch „CG“ die Replikation reduzierten, Substitutionen der Nukleotide „GU“ durch „AC“ zu einem Verlust der Replikationskompetenz führten (Yu *et al.*, 1999). Die Loopsequenz des Stemloops 3 der X-Sequenz des HCV besitzt dieses Motiv in invertierter Reihenfolge (5' UGAUAC 3'; Nukleotidposition 9579 bis 9584). In Analogie zu BVDV wurde in der hier durchgeführten Kartierung der X-Sequenz hinsichtlich der für RNA-Replikation benötigten Elemente die Nukleotide „AU“ (Nukleotidposition 9581/82) durch das Nukleotidpaar „GC“ ersetzt. Dies resultierte – wie auch bei BVDV – in einer verminderten Replikationskompetenz der HCV RNA. Die Untersuchungen von Yi und Lemon (2003) zeigten jedoch, dass die Substitution des Nukleotids 9581 „A“ zu „U“ oder des Nukleotids 9582 „U“ zu „A“ die Replikation nicht beeinflussten (Yi & Lemon, 2003), während ein G-C Austausch an Position 9580 die Replikation vollständig inhibierten. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieses Sequenzmotiv bei beiden Viren eine ähnliche Funktion ausüben könnte. Weitere Mutationen - in Analogie zu denen für BVDV – müssen zur Klärung dieses Sachverhaltes analysiert werden.

Ebenfalls in Analogie zu BVDV wurden die Untersuchungen der 3' terminalen Nukleotide der 3' NTR durchgeführt. Da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die NS5B-Polymerase die RNA Synthese „de novo“ initiieren kann, wird ein ähnlicher Mechanismus auch *in vivo* vermutet (Luo *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000). *In vitro* ist die Initiation dann am effizientesten, wenn die Matrize mit einem 3' terminalen Cytosin endet. Allerdings – im Gegensatz zu BVDV und den *in vitro* Untersuchungen der HCV-NS5B-Polymerase – führte die Fusion von 3 bzw. 5 Cytosinen (NK5.1-3C bzw. -5C) an das 3' Ende des HCV Genoms zu einer Reduktion der HCV Replikation. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass ein Uridin

am 3' Ende wichtig für die HCV Minusstrangsynthese ist und dass die Mechanismen der RNA-Replikation bei BVDV und HCV von einander abzuweichen scheinen. Die Beobachtung, dass die HCV-NS5B-Polymerase im Zellkultursystem ein Uridin am 3' Ende der Matrize bevorzugt, konnte auch von anderen Gruppen bestätigt werden (Zhaohui *et al.*, 2004; Yi & Lemon, 2003). Durch Mutationsanalysen des letzten Nukleotids am 3' Ende des Minusstrangs konnte gezeigt werden, dass Revertanten bevorzugt ein Uridin an dieser Position besitzen (Zhaohui *et al.*, 2004).

In diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache interessant, dass das 3' Ende des Plus- und des Minusstranges gemeinsame Motive besitzen. So gibt es im 3' Ende des Minusstrangs eine dem Stemloop 3 der X-Sequenz vergleichbare Struktur und auch Sequenz- und Strukturbereiche des Stemloop 2 der X-Sequenz sind dort wiederzufinden (Schuster *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002). Dies spricht für ähnliche Erkennungssignale für die Initiation der Plus- und Minusstrangsynthese.

Im Gegensatz zu den Berichten von Fang und Mitarbeitern (Fang & Moyer, 2000) konnten die hier durchgeführten Untersuchungen keinen Einfluss der 3' NTR auf die RNA Stabilität belegen. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, dass insbesondere der Bereich der X-Sequenz eine elementare Rolle für die RNA-Replikation spielt und der Verlust der Replikation nicht durch eine Destabilisierung der RNA oder eine Reduktion der RNA-Translation erklärt werden kann. Dass die 3' NTR keinen Einfluss auf die RNA-Stabilität zu haben scheint, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Kong & Sarnow, 2002; Yi & Lemon 2003). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Spangberg und Mitarbeitern (Spangberg *et al.*, 1999). Sie konnten zeigen, dass das La Antigen an die 3' NTR, insbesondere den polyU/UC-Bereich bindet und zumindest in vitro (HeLa-Zellextrakt) die HCV-RNA vor einem verstärkten Abbau durch zelluläre RNasen schützt (Spangberg *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass das La Protein, das auch Histon-mRNAs vor RNase Abbau schützt (McLaren *et al.*, 1997) durch Bindung an den polyU/UC-Bereich die HCV-RNA insbesondere vor einer zellulären RNase-Familie schützt, die bevorzugt polyU-Bereiche abbaut (Sorrentino & Lionati 1997). Die Tatsache, dass zelluläre mRNAs mit polyU-Bereichen instabiler als mRNAs mit „polyA-tail“ sind (Ross 1995), spricht für diese Annahme. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten allerdings keinen Unterschied in der Stabilität zwischen RNAs mit einem polyU-Bereich von 6, 26 oder 46 Uridinen. Dies spricht gegen die Theorie von Spangberg, allerdings wurde nicht überprüft, ob 6 Uridine für eine Bindung des La-Protein und damit einen Schutz vor Abbau ausreichend sind. Des weiteren können Unterschiede in der Zusammensetzung der zellulären RNasen zwischen HeLa und Huh-7

Zellen, insbesondere das Vorhandensein der RNase-Familie, die bevorzugt polyU-Bereiche abbaut, zu den hier beobachteten Diskrepanzen führen. Dass aber die X-Sequenz einen Einfluss auf die Stabilität haben soll (Murakami *et al.*, 2001), konnte nicht bestätigt werden.

Auch bezüglich der Translationseffizienz konnten wir keinen Einfluss der 3' NTR nachweisen. In keinem der untersuchten Replikonsystemen führten die verschiedenen 3' NTR Mutationen zu signifikanten Unterschieden in der HCV-IRES-Aktivität. Auch die Berichte, dass die 3' NTR ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität der EMCV-IRES habe (Ito *et al.*, 1998) und die daraus resultierende Annahme, dass in unserem Versuchsaufbau, in dem auf Translationsprodukte der EMCV-IRES normalisiert wird, eine eventuelle Reduktion der HCV-IRES-Aktivität nicht bemerkt werde, konnte nicht bestätigt werden. So zeigte die HCV-IRES-Aktivität bei Replikon-RNAs mit und ohne intakter 3' NTR auch ohne Normalisierung einen maximal 3-fachen Unterschied. Bei mehrfacher Wiederholung des Experiments ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen der Reduktionen der HCV-IRES-Aktivitäten mit einer bestimmten RNA-Mutation. Dass die 3' NTR keinen Einfluss auf die HCV-IRES-Aktivität ausübt, konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Fang *et al.*, 2000; Yi & Lemon, 2003; Kong & Sarnow, 2002, Imbert *et al.*, 2003).

Dem widersprechend gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass der polyU/UC-Bereich und Sequenzen innerhalb der X-Sequenz die Translationseffizienz reduzieren sollen (Murakami *et al.*, 2001). Dies konnte hier nicht reproduziert werden. Andere Untersuchungen zeigten sogar, dass die 3' NTR einen positiven Effekt auf die HCV-IRES-Aktivität ausübe (Ito *et al.*, 1998, 1999; Michel *et al.*, 2001). Allerdings zeigte sich in den Versuchen von Ito und Kollegen ein Einfluss der 3' NTR nur beim Vorhandensein der Core-kodierenden Region „downstream“ der HCV 5' NTR und der Anwesenheit von PTB. Die hier gezeigten Untersuchungen wurden alle ohne die Core-kodierende Region durchgeführt und es ist nicht auszuschließen, dass die 3' NTR im Kontext des vollständigen HCV-Genoms einen Einfluss auf die HCV-IRES-Aktivität ausübt. Die Untersuchungen von Imbert und Mitarbeitern geben Hinweise darauf, dass ein eventueller Einfluss – wie von Ito beschrieben – durch die Core-kodierende Region und nicht durch das Core-Protein selbst vermittelt wird. Weder die Zugabe der Nichtstruktur- oder der Strukturproteine in trans noch die 3' NTR selbst zeigten einen Einfluss auf die Translation in dem hier verwendeten Versuchssystem (Imbert *et al.*, 2003). Allerdings fehlten den analysierten RNAs die kodierenden Sequenzen der Struktur- und Nichtstrukturproteine, so dass ein eventueller Einfluss der 3' NTR bei Vorhandensein der Core-kodierenden Region weder bestätigt noch widerlegt werden kann.

4.3 Einfluss von RNA-Strukturen in der kodierenden Region des HCV auf die Replikation

Mit Hilfe von RNA-Strukturvorhersagen konnten RNA-Strukturelemente in der Core- und 3' terminalen NS5B-kodierenden Region des Con1-Isolats bestätigt werden (Hofacker *et al.*, 1998; Rijnbrand *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 1997; Tuplin *et al.*, 2002). Die Vorhersagen für die Core-kodierende Region entsprachen dabei den bereits beschriebenen Elementen SL47 und SL 443. In der NS5B-kodierenden Sequenz wurde, neben den früher bereits identifizierten RNA-Strukturen NS5BSL3.1 und NS5BSL3.3, die den Elementen SL9011 und SL9118 entsprachen (Tuplin 2002), noch eine weitere Struktur identifiziert; die als NS5BSL3.2 bezeichnet wurde (You *et al.*, 2004).

Die RNA-Elemente in der Core-kodierenden Region scheinen zumindest in dem hier gewählten experimentellen Aufbau hinsichtlich der Replikation keinen Einfluss zu haben. So kam es zwar zu einer moderaten Reduktion des Replikationsniveaus durch die Insertion der Core-kodierenden Sequenz „upstream“ der Poliovirus-IRES, aber weder die hier getesteten RNA-Strukturen noch die Expression des Core-Proteins konnten dafür verantwortlich gemacht werden. So zeigten die RNAs mit verändertem CoreI- oder CoreII-Element keinen Unterschied in der Replikation im Vergleich mit einer RNA, die zwar die Core-kodierende Sequenz besaß, nicht aber das Protein exprimierte. Die Insertion der Sequenz „upstream“ der Poliovirus-IRES könnte die Verminderung des Replikationsniveau per se bewirken. So replizieren die kürzeren subgenomischen HCV Replikons deutlich besser als die parentalen Volllängegenome. Dies steht auch im Einklang damit, dass die Core-Sequenz keine RNA-Signale hinsichtlich der RNA-Replikation beisteuert.

Die hier durchgeführten Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Core-Elemente auf die HCV-IRES vermittelte Translation lassen eine Beteiligung des CoreI-Elements vermuten.

So zeigte eine Inaktivierung des CoreI-Elements sowohl in subgenomischen Replikons, in denen zwischen dem durch die HCV-IRES translatierten Reportergen noch ein Teil der Core-kodierenden Sequenz inseriert war, die das CoreI-Element beinhaltete, als auch im Kontext der Volllänge-HCV-RNA eine moderate Reduktion der HCV-IRES vermittelten Translation. Ob die beobachtete Reduktion durch das CoreI- vermittelt wurde und inwiefern das CoreII-Element Einfluss auf die IRES-vermittelte Translation hat, müssen weitere Untersuchungen klären. Interessanterweise befindet sich das CoreI-Element unmittelbar „upstream“ einer Sequenz, die mit einer Sequenz in der 5' NTR Basenpaarungen eingehen kann und dadurch die IRES-vermittelte Translation reduziert (Kim *et al.*, 2003).

Für die RNA-Elemente in der NS5B-kodierenden Sequenz konnte durch Einfügen stiller Nukleotidaustausche gezeigt werden, dass das neue Element NS5BSL3.2, im Gegensatz zu den beiden anderen Elementen NS5BSL3.1 und NS5BSL3.3, einen wichtigen Beitrag zur Replikation beisteuert. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden von You und Mitarbeitern, die sowohl die Existenz dieses Elements als auch die essentielle Rolle dieser Struktur für die Replikation nachweisen konnten (You *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu diesen Studien gelang uns allerdings eine effiziente Komplementation der Replikation einer RNA, die aufgrund der Inaktivierung der Strukturen in der NS5B-kodierenden Region replikationsdefizient war. Dies war möglich aufgrund der Insertion aller drei RNA-Strukturen bzw. des NS5BSL3.2-Elements in die variable Region der 3' NTR (s. unten). Dieser Ansatz erlaubt die detaillierte Analyse der individuellen Elemente der NS5BSL3.2-Struktur, da die Sequenz an dieser Stelle keine kodierende Funktion ausübt und Veränderungen ausschließlich die strukturellen Funktionen dieses RNA-Elements betrafen.

Mit Hilfe dieses Tricks konnte gezeigt werden, dass die Struktur des Stems, nicht aber die Primärsequenz für die Replikation benötigt werden. So resultierten komplette Veränderungen der Primärsequenz durch Invertierung der Stemseiten unter Beibehaltung der Struktur in einer nur leicht reduzierten Replikation. Im Gegensatz dazu zeigten Verkürzungen des oberen oder unteren Stems eine deutliche Minderung der Replikationskompetenz. Partielle Deletionen oder komplette Veränderungen der Primärsequenz in der Bulge-Region führten zu einer Hemmung der RNA-Replikation ebenso wie eine einzelne Punktmutation in diesem Bereich. Zur Zeit ist es unklar, ob die Bulge-Sequenz oder ihr Einfluss auf die Sekundärstruktur des NS5BSL3.2-Elements wichtig ist. You und Mitarbeiter konnten zeigen, dass einzelne Punktmutationen in dieser Region Auswirkungen auf die Gesamtstruktur von NS5BSL3.2 haben können (You *et al.*, 2004). Eine weitere Auffälligkeit besteht darin, dass die Sequenz der Bulge-Region in großen Teilen komplementär zur 5' Stemseite des SL2 in der X-Sequenz ist (s. unten).

Sowohl die hier gezeigten Untersuchungen der Loopsequenz als auch die von You und Mitarbeitern durchgeführten Arbeiten gaben erste Aufschlüsse über die Wichtigkeit dieser Sequenz. Diese Grundlagen führten zur Identifizierung der beiden 7 Nukleotide langen komplementären Motive in den Loopbereichen von NS5BSL2 und SL2 der X-Sequenz, deren Möglichkeit zur Basenpaarung essentiell für die RNA-Replikation ist. Es muss hier erwähnt werden, dass sich 5' des Motivs im NS5BSL3.2 Loop noch zwei ungepaarte Uridine befinden, die eine mögliche Basenpaarung mit freien Adeninen 3' des Motivs im Loop des

SL2 in der X-Sequenz eingehen und dadurch die Interaktion dieser Elemente verstärken könnten.

Die Insertion des NS5BSL3.2 Elements in die variable Region ist ausreichend für die Wiederherstellung der RNA-Replikation einer Mutante, bei der diese RNA-Strukturen auf Grund stiller Nukleotidaustausche zerstört ist. Dies bestätigt, dass NS5BSL3.2 als autonomes RNA Element fungieren kann. Die Effizienz der Replikation lag jedoch ca. 5-fach unterhalb der des Replikons, in dem die Replikationskompetenz durch Insertion aller 3 NS5B-Strukturelemente in die variable Region der 3' NTR wiederhergestellt wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Reduktion könnte ein Einfluss der flankierenden Sequenzen auf die Faltung des NS5BSL3.2-Elements sein. So könnten bei der Insertion aller 3 Strukturen die das NS5BSL3.2 Element umgebenden Sequenzen die korrekte Faltung unterstützen, indem zum Beispiel alternative Basenpaarungen mit Sequenzen aus der variablen Region verhindert werden. Eine andere Erklärung könnte der veränderte Abstand zwischen NS5BSL3.2 und SL2 in der X-Sequenz sein. Die Insertion von NS5BSL3.2 alleine könnte zu einem verringertem Abstand führen, der für die Interaktion möglicherweise nachteilig ist. Durch die zusätzliche Insertion der das NS5BSL3.2-Element flankierenden RNA-Strukturen könnte dieser Nachteil in einem gewissen Rahmen kompensiert werden. Es muss hier darauf hingewiesen werden, das mit Hilfe des Replikonsystems nur Funktionen hinsichtlich der RNA-Replikation untersucht werden konnten und somit andere Aufgaben der Strukturen in der NS5B-kodierenden Sequenz beispielsweise bei der RNA-Verpackung nicht ausgeschlossen werden können.

Es ist bemerkenswert, dass NS5BSL3.2 ein cis aktives RNA-Element ist, welches sich in der kodierenden Sequenz des HCV Genoms befindet, wohingegen alle anderen bis jetzt bekannten cis aktiven RNA-Elemente in den NTRs liegen. Prinzipiell könnte die Positionierung eines RNA-Elements in den kodierenden Bereich auch Einfluss auf die Translation des Proteins, in diesem Fall der NS5B-Polymerase, haben. Dies könnte unter anderem durch eine Beeinflussung der Ribosomenbewegung bewerkstelligt werden, die zu einer Reduktion der NS5B-Menge führt. Im Laufe dieser Arbeit wurden mögliche Auswirkungen der Elemente in der kodierenden Region von NS5B auf die Translation nicht analysiert. Zumindest erlaubt eine RNA mit veränderter NS5BSL3.2-Struktur grundsätzlich die Expression einer funktionellen NS5B-Polymerase, da die Insertion einer intakten Kopie des NS5BSL3.2 Elements in die variable Region die Replikation der NS5BSL3.2-Mutante wieder herstellen kann. Dass diese RNA Strukturen keinen Einfluss auf die Translation

auszuüben scheinen, konnte auch von You und Mitarbeitern bestätigt werden (You *et al.*, 2004).

Eine der am besten studierten Gruppen von cis-aktiven RNA Elementen ist bei Viren zu finden, bei denen die Replikation mit Hilfe eines Proteinprimers initiiert wird. Dies ist unter anderem der Fall bei Adenoviren, Hepadnaviren und Picornaviren (Junker-Niepmann *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; McKnight *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2002; Goodfellow *et al.*, 2000). In Picornaviren dient das cis-aktive RNA-Element als Vorlage für die Nukleotidylierung des Protein Primers VPg. Hierbei kann das RNA-Element positionsunabhängig fungieren. So konnte im Falle des FMDV das cis aktive Element funktionell aus seiner natürlichen Umgebung in der 5' NTR entfernt und in die 3' NTR versetzt werden, wobei diese Translokation die Replikation signifikant reduzierte (Mason *et al.*, 2002). Ein ähnlicher Befund wurde für das Poliovirus gemacht, wo die Verschiebung des cis aktiven Elements aus der kodierenden Region in die 5' NTR ebenfalls die Replikation unterstützte (Goodfellow *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu lässt sich das cis aktive Element NS5BSL3.2 des HCV nur innerhalb relativ enger Grenzen im 3' Bereich des Genoms verschieben. Weder die Insertion des Elements NS5BSL3.2 in die Mitte der NS5A-kodierenden Sequenz noch die Insertion aller drei Elemente an das 5' Ende der EMCV-IRES konnte die Replikation einer RNA mit inaktivierter Strukturen in der NS5B-kodierenden Sequenz wieder herstellen. Die Duplikation des NS5BSL3.2 Elements in diese Bereiche, also zusätzlich zu den Strukturen in der NS5B-kodierenden Sequenz, wurde jedoch toleriert. Dass die Insertion aller 3 Elemente in die NS5A-kodierende Sequenz nicht toleriert wurde, könnte an einer Verfaltung des Proteins und einem damit zusammenhängenden Verlust der Funktion liegen. Die Insertion der Sequenz des NS5BSL3.2 Elements alleine in diesen Bereich zeigte keine Auswirkung auf das NS5A Protein, zumindest hinsichtlich RNA-Replikation, da die entsprechende RNA mit dupliziertem NS5BSL3.2 Element ein Replikationsniveau ähnlich der dazu gehörenden Positivkontrolle aufwies (vergleiche Δ ISDR/dup3.1-3, Δ ISDR/dup3.2 und Δ ISDR). Somit scheint das NS5BSL3.2 Element keinen Einfluss auf die Replikation auszuüben, solange die authentische Struktur in der NS5B-kodierenden Region intakt ist. Die einzige Ausnahme davon ist die Insertion des NS5BSL3.2 Elements in die variable Region der 3' NTR. Die Duplikation des NS5BSL3.2 Elements an dieser Position des Genoms führte zu einer Reduktion des Replikationsniveaus um das 3- bis 5-fache. Daraus lässt sich folgern, dass entweder das Vorhandensein zweier Kopien in unmittelbarer räumlicher Nähe zu Interferenzen führt oder dass eine Sequenzinsertion in die variable Region per se die Replikation beeinflusst. Für die letztere Vermutung sprechen sowohl die hier durchgeführten

Untersuchungen der 3' NTR (s. Kapitel 3.2), die zeigen, dass die variable Region zwar nicht essentiell ist, aber die Replikation steigert, als auch die Beobachtungen von You und Mitarbeiter, dass die Insertion fremder Sequenzen in diesen Bereich die RNA-Replikation vermindert (You *et al.*, 2004).

Auch hinsichtlich der Position des NS5BSL3.2 Elements konnten You und Mitarbeiter ähnliche Ergebnisse erzielen. So konnte durch Insertion des Elements „upstream“ der EMCV-IRES die Replikation nicht komplementiert werden, durch Insertion in die variable Region der 3' NTR aber schon. Allerdings war die Replikation sehr stark reduziert, so dass weitere Untersuchungen der RNA-Struktur in diesem Replikon-Kontext nicht möglich waren. Der Unterschied zu der hier erfolgten sehr effizienten Komplementierung liegt hauptsächlich in der Länge der inserierten RNA Sequenz. So ist diese bei You ca. 440 Nukleotide lang und umfasst neben den Elementen NS5BSL3.1, -3.2 und -3.3 flankierende Sequenzen aus dem kodierenden und dem nicht-kodierenden Bereich. Dass in dieser Arbeit verwendete RNA-Segment hat eine Länge von nur 150 Nukleotiden und umfasst nur die 3 Stemloopsstrukturen NS5BSL3.1, -SL3.2 und -SL3.3. Im Falle der Insertion von NS5BSL3.2 ist das RNA-Fragment sogar nur 50 Nukleotide lang. Eine mögliche Erklärung wäre die Beteiligung eines weiteren, bislang nicht identifizierten RNA-Elements „upstream“ der NS5BSL3.2 RNA-Sequenz. Da bei der Insertion von You und Mitarbeitern die zusätzlichen Nukleotide hauptsächlich 5' des NS5BSL3.2 Elements lokalisiert sind, könnte dies zu einem vergrößertem Abstand und somit einer verminderten Interaktion mit einem eventuell beteiligten weiteren RNA-Element führen, das sich „upstream“ der 5' Grenze der inserierten Sequenz befinden müsste.

Mögliche Kandidaten für eine solche Interaktion könnten die RNA-Elemente SL6778, SL8578 und SL8835 darstellen. Diese besitzen zum Teil Sequenzmotive, die eine mögliche Interaktion mit dem 3' Ende eingehen können. Auch die von Thurner und Kollegen (Thurner *et al.*, 2004) vermutete Interaktion zwischen einer NS5B-Region (8544-8529) und einer Sequenz in der 5' NTR (95-110), die zu einer Zirkulation des Genoms führen würde, könnte diesbezüglich eine Rolle spielen. Allerdings zeigten die Untersuchungen keinen Einfluss dieser Elemente auf die HCV RNA-Replikation. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, bisher nicht entdeckte RNA-Elemente im Genom vorhanden sind.

Bislang sind nur sehr wenige Beispiele für die Interaktion viraler cis aktiver RNA-Elemente in der kodierenden und nicht kodierenden Region bekannt. So konnte für den Bakteriophagen Q β eine Basenpaarung zwischen 8 Nukleotiden im Loobereich des letzten Stemloops am 3' Ende und einer Sequenz, die sich ungefähr 1200 Nukleotide „upstream“ befindet,

nachgewiesen werden (Klovins *et al.*, 1999). Eine ähnliche Interaktion konnte für das Arterivirus *Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) gezeigt werden (Verheije *et al.*, 2002). Hier befindet sich im offenen Leseraster 7 der viralen RNA eine RNA-Struktur bestehend aus einem 7 Basenpaare langen Stem und einem 12 Nukleotide umfassenden Loop. Die RNA-Replikation des Virus ist abhängig von einer Interaktion 7 Nukleotide innerhalb dieses Loops mit einer komplementären Sequenz in einem Loop, der sich in einer RNA-Struktur ungefähr 300 Nukleotide „downstream“ in der 3' NTR befindet. Mutationen, die diese Komplementarität zerstören, blockieren die RNA-Replikation, die wieder hergestellt werden kann wenn auch die Möglichkeit zur Basenpaarung wieder hergestellt wird. Für PRRSV wurde spekuliert, dass diese Interaktion eine übergeordnete RNA-Struktur entstehen lässt, die durch Bindung zellulärer und viraler Komponenten den Replikase-Komplex aufbaut. In Analogie zu PRRSV wäre denkbar, dass die RNA-Strukturen in der kodierenden Region des HCV-Genoms eine analoge Funktion haben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind sehr ähnlich denen des PRRSV. So zeigen unsere Resultate, dass zumindest 6 Nukleotide komplementär sein müssen. You und Mitarbeiter beschreiben sogar einzelne Punktmutationen im NS5BSL3.2 Motiv, die zu einem Verlust der Replikation führen (You *et al.*, 2004). Basierend auf diesen Daten ist anzunehmen, dass sogar eine Komplementarität von mindestens 7 Nukleotiden für die RNA-Replikation benötigt wird. Auffallend ist, dass das Motiv 5' CACAGC 3' im Loopbereich des NS5BSL3.2 Elements unter allen HCV-Genotypen absolut invariant ist. Interessanterweise können Teile dieses Motivs auch in cis aktiven Elementen anderer, eher ferner verwandten Flaviviren gefunden werden, wie zum Beispiel dem Kunjin Virus, dem West Nile Virus oder dem Dengue Virus (Markoff *et al.*, 2003). Die letzten 95 Nukleotide am 3' Ende des Genoms dieser Viren bilden einen stabilen Stemloop, der im oberen Loopbereich das konservierte Motiv 5' CACAG 3' beinhaltet. Zumindest für das Kunjin Virus konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv essentiell für die Replikation ist (Khromykh *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass dieses Motiv zwischen sehr verschiedenen Flaviviren konserviert ist, lässt vermuten, dass hier zelluläre Proteine aus verschiedenen Geweben, die an der Ausbildung des Replikations-Komplexes involviert sind, binden können. In diesem Zusammenhang steht auch die Beobachtung, dass HCV *in vitro* nur in Leberzellen replizieren kann und somit nicht auf leberzell-spezifische Faktoren angewiesen zu sein scheint (Zhu *et al.*, 2003, N. Appel, persönliche Mitteilung).

Trotz der genetischen Beweise für die Interaktion zwischen NS5BSL3.2 und SL2 der X-Sequenz schlugen Versuche, diese Interaktion mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachzuweisen fehl. Auch die RNA-Struktur Untersuchungen von You und Mitarbeitern

zeigten, dass die Region des NS5BSL3.2-Loops für Nukleasen frei zugänglich ist, was gegen eine Beteiligung dieses Bereichs an komplexen RNA-Interaktionen spricht. Eine Erklärung könnte das Fehlen zellulärer und viraler Proteine sein, die diese Interaktion vermitteln und in unseren Versuchen ebenso wie bei You und Mitarbeitern nicht vorhanden waren. Diese Annahme wird auch durch die Analogie zu PRRSV und die hohe Konserviertheit des Nukleotidmotivs zu anderen Flaviviren unterstützt. Wie schon in der Diskussion für die 3' NTR beschrieben (s. Kapitel 3.2.5), wird die Bindung verschiedener Proteine, darunter PTB, das LA Protein und verschiedene ribosomale Proteine an den 3' Bereich des HCV-Genoms angenommen (Spangberg *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2001). PTB soll an SL1, SL2 der X-Sequenz und an den polyU/UC-Bereich binden (Tsuchihara *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1999). Es wird auch spekuliert, dass eine Klasse von nukleären Faktoren, die an das 3' Ende binden sollen (Isken *et al.*, 2003) eine Rolle im Lebenszyklus des HCV spielen.

Neben zellulären Proteinen wird auch die Bindung von viralen Proteinen an das genomische 3' Ende des HCV beschrieben und eine Rolle dieser Bindung für die NS5BSL3.2 – XTSL2 Interaktion kann nicht ausgeschlossen werden. Neben der Bindung von NS3 wurde insbesondere die Bindung der NS5B-Polymerase an das 3' Ende der HCV-RNA nachgewiesen. So konnten Oh und Mitarbeiter eine hohe Bindungsaffinität des NS5B-Proteins an den polyU-Bereich und an den SL2 der X-Sequenz nachweisen (Oh *et al.*, 1999). Die *in vitro* Untersuchungen von Yamashita und Kollegen ergaben eine sehr geringe NS5B-Polymerase-Aktivität mit einer RNA-Matrize, die nur die 98 Nukleotide der X-Sequenz umfasste, verglichen mit einer RNA, die zusätzlich zur 3' NTR auch noch Sequenzen aus der NS5B-kodierenden Region beinhaltetete (Yamashita *et al.*, 1998). Auch Cheng und Mitarbeiter berichten von einer starken Bindung des NS5B-Proteins an die Nukleotidsequenzen des HCV Genoms, die sowohl Bereiche der NS5B-kodierenden Sequenz als auch der 3' NTR umfassen (Cheng *et al.*, 1999). Interessanterweise konnte diese Bindung durch dieselbe RNA besser kompetiert werden als durch RNA, die der X-Sequenz oder der 5'NTR entsprach. Wir vermuten deshalb, dass die NS5B-Polymerase in die NS5BSL3.2 – XTSL2 Interaktion involviert ist. Diese Interaktion könnte die ersten Schritte der Minusstrang-RNA-Synthese einleiten und die Polymerase an das 3' Ende der HCV Plusstrang-RNA transferieren.

Daneben könnte ein weiteres virales Protein eine Rolle bei der RNA:RNA-Interaktion und der Replikation spielen. Bei quasi allen RNA-Viren wird das Genom im Virus Partikel von zahlreichen Molekülen des basischen Nukleokapsidproteins umhüllt. *In vitro* konnte beispielsweise für retrovirale Nukleokapsidproteine zusätzlich eine Chaperon-Aktivität auf Nukleinsäuren nachgewiesen werden, die eine wichtige Rolle während der RNA-Replikation,

RNA-Verpackung und beim Zusammenbau der Nukleokapsidstruktur übernimmt (Rein *et al.*, 1998). Weiterhin wird eine Rolle bei der reversen Transkription vermutet (Darlix *et al.*, 2000). In Analogie zu den Retroviren konnte für das HCV-Core Protein ebenfalls eine Chaperon-Aktivität gezeigt werden (Cristofari *et al.*, 2004). So gelang in vitro der Nachweis einer durch das HCV Core-Protein vermittelten Umfaltung der Struktur der X-Sequenz der 3' NTR. Daher scheint diese RNA-Struktur-Veränderung zu einer Dimerisierung der X-Sequenz zu führen, bei der eine palindrome Sequenz im SL2 der X-Sequenz (5' UCACGGCUAGCUGUGA 3', umfasst den Stembereich und Teile der Loopsequenz) mit der komplementären Sequenz einer zweiten HCV RNA basenpaart. Die genaue Bedeutung dieser Interaktion konnte noch nicht geklärt werden. Da diese Sequenz den Bereiche des SL2 Motivs umfasst, der für die Interaktion mit dem NS5BSL3.2 Motiv benötigt wird, liegt die Vermutung nahe, dass durch diese Umstrukturierung Promotorbereiche für die Initiation der Minusstrangsynthese maskiert werden und die RNA-Replikation blockiert wird. Dies könnte ein Mechanismus zur Einleitung der Virus-Verpackung darstellen.

4.4 Perspektiven

Zusammenfassend ergeben die hier durchgeführten Untersuchungen einen ersten Einblick in cis aktive RNA Elemente, die das HCV für RNA-Replikation benötigt. Insbesondere drei Genombereiche konnten identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle für die RNA-Replikation besitzen: Bereiche in der 5' NTR, der 3' NTR und der NS5B-kodierenden Region.

Im Falle der 5' NTR konnte gezeigt werden, dass die ersten 106 Nukleotide als Promotor für eine schwache RNA-Replikation ausreichen wohingegen eine effiziente RNA-Replikation den Sequenzbereich der gesamten 5' NTR erfordert (s. Kapitel 3.1). Es ist zur Zeit allerdings noch unklar, ob die zum Minimalpromotorbereich hinzugefügten Sequenzen eine Rolle für die korrekte RNA-Faltung spielen oder an der RNA-Replikation selbst beteiligt sind, z.B. als Bindungsstellen für virale oder zelluläre Faktoren. In Analogie zu den Flaviviren, für die eine durch komplementäre Nukleotidmotive in der 5' und 3' NTR vermittelte Zirkulation des Genoms essentiell für die RNA-Replikation ist (Khromykh 2001), kann eine ähnliche Funktion auch für die HCV 5' NTR angenommen werden. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass das 3' Ende des Minusstranges als Erkennungssequenz für die virale Replikationsmaschinerie für die Initiation der Plusstrangsynthese dient. Betrachtet man den minimalen Promotorbereich auf Ebene des Minusstrangs, so ergaben RNA-Strukturanalysen, dass exakt die letzten 106 Nukleotide zwei stabile Stemloop-Strukturen ausbilden (Smith 2002, Schuster 2002). Unter Berücksichtigung dieser Modelle müssen weitere Analysen die Bereiche für die RNA-Translation sowie Positiv- und Negativstrangsynthese näher charakterisieren.

Die hier durchgeführten Untersuchungen der 3' NTR zeigen, dass insbesondere der polyU/UC-Bereich sowie die X-Sequenz essentiell für die RNA-Replikation sind (s. Kapitel 3.2). Bislang konnte nur die Funktion des Loopbereiches des SL2 der X-Sequenz näher charakterisiert werden (s. Kapitel 3.3.8 und 3.3.9). Der genaue Einfluss der anderen Sequenzbereiche für die RNA-Replikation konnte nicht geklärt werden. Es ist anzunehmen, dass diese Bereiche eine wesentliche Aufgabe für die Bindung zellulärer und viraler Faktoren übernehmen (s. Kapitel 4.2). Um Verständnis für die molekularen Mechanismen der Minusstrangsynthese zu bekommen, müssen weitere Untersuchungen hinsichtlich der Bindungsdomänen sowie –partner folgen.

Einen ersten Schritt in diese Richtung stellt die in dieser Arbeit vorgestellte Interaktion zwischen den beiden RNA-Elementen NS5BSL3.2 in der NS5B-kodierenden Region und

XTSL2 in der X-Sequenz der 3' NTR dar. Ein möglicherweise in diese Interaktion involviertes Protein ist die NS5B-Polymerase.

Die Identifizierung eines neuen HCV-Genotyp-2A-Isolats (JFH), das auch ohne zellkulturadaptive Austausch sehr effizient in Huh-7 Zelle repliziert und darüber hinaus in der Lage ist, infektiöse Viruspartikel zu produzieren (T. Pietschmann *et al.*, eingereicht zur Veröffentlichung) erlaubt die Analyse von cis-aktiven RNA-Elementen in einem authentischeren Zellkultursystem. Die Verfügbarkeit eines Zellkultursystems, das den gesamten Lebenszyklus des HCV rekapituliert, erlaubt erstmals auch Untersuchungen hinsichtlich der Verpackung des viralen Genoms in Nukleokapside und der dazu benötigten RNA-Strukturen.

5. Abkürzungen

Abb.:	Abbildung
BVDV:	„Bovine Viral Diarrhea Virus“; Erreger der bovinen viralen Diarrhö
cfu:	„colony forming unit“; Koloniebildungskompetenz
CRE:	„cis-acting RNA elements“; „cis-aktive Elemente“
DMEM:	„Dulbeccos minimal essential medium“
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV:	Encephalomyocarditis Virus
EI:	Encephalomyocarditisvirus IRES
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
FKS:	Fötale Kälberserum
h:	Stunde
HBV:	Hepatitis A Virus
HBV:	Hepatitis B Virus
HCV:	Hepatitis C Virus
HDV:	Hepatitis Delta Virus
Hepes:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
hnRNP:	heterogene nukleare Ribonukleoprotein
IRES:	interne Ribosomen Eintrittsstelle
kB:	Kilobasen
kDa:	Kilodalton
Min.	Minute
MOPS:	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
NaAc:	Natriumacetat
NANBH:	Non-A Non-B Hepatitis
neo:	Neomycin-Phosphotransferase
nm:	nano- meter
NMR:	„nuclear magnetic resonance“
NOE:	Nuclear Overhauser Effekt
NOESY:	Nuclear Overhauser Effekt Spektroskopie
Nt.:	Nukleotid
NTP:	Ribonukleosidtriphosphat
NTR:	Nichttranslatierte Region
ORF:	„open reading frame“; offener Leserahmen
PBS:	„Phosphat buffered saline“; Standard-Phosphatpuffer
PCR:	„polymerase chain reaction“; Polymerase Kettenreaktion
PVI:	Polio-IRES
RaRP:	RNA-abhängige-RNA-Polymerase
RF:	Replikative Form
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	reverse Transkriptase
SDS:	„sodium-dodecyl-sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SL:	Stemloop
S.o.:	Siehe oben
Sp:	Spacer
Temed:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U:	Units
UpM:	Umdrehungen pro Minute
üN:	über Nacht
Vol.:	Volumen
Wt:	Wildtyp

6. Referenzen

- Adam J. Collier, José Gallego, Roscoe Klinck, Paul T. Cole, Stephen J. Harris, Geoffrey P. Harrison, Fareed Aboul-ela, Gabriele Varani, Stephen Walker. 2002. A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site *Nature Structural Biology* 9, 375 – 380.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Q. X. Zhang. 1999. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 12766-12771.
- Ali, N. and A. Siddiqui. 1995. Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J. Virol.* 69:6367-6375.
- Ali, N. and A. Siddiqui. 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 2249-2254.
- Ali, N., Tardif, K. D., and A. Siddiqui. 2002. Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J. Virol.* 76, 12001-12007.
- Alita J. Lyons and Hugh D. Robertson. 2003. Detection of tRNA-like Structure through RNase P Cleavage of Viral Internal Ribosome Entry Site RNAs Near the AUG Start Triplet *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 29, 26844-26850.
- Andrey V. Pisarev, Louisa S. Chard, Yoshihiro Kaku, Helen L. Johns, Ivan N. Shatsky, and Graham J. Belsham. 2004. Functional and Structural Similarities between the Internal Ribosome Entry Sites of Hepatitis C Virus and Porcine Teschovirus, a Picornavirus. *J. Virol.* 78: 4487-4497.
- Appel N, T. Pietschmann and R. Bartenschlager. 2004. Mutation analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: Potential role of differential phosphorylation for RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *Eingereicht zur Veröffentlichung.*
- Ball, L.A., and Y. Li. 1992. cis-acting requirements for the replication of flockhouse virus RNA2. *J. Virol.* 67:3544–3551.
- Ball, L.A. 1995. Requirements for the self-directed replication of flockhouse virus RNA 1. *J. Virol.* 69:720–727.
- Banerjee, R. and A. Dasgupta. 2001. Specific interaction of hepatitis C virus protease/helicase NS3 with the 3'-terminal sequences of viral RNA. *J. Virol.* 75, 1708-1721.
- Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., and C. Brechot. 1997. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 1200-1205.
- Bartenschlager, R., Ahlborn Laake, L., Mous, J., and H. Jacobsen. 1993. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 67, 3835-3844.
- Bartenschlager, R., Frese, M., T. Pietschmann. 2004. Novel insight into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* 63:17-180.
- Barton D.J, Brian J. O'Donnell¹ and James B. Flanagan. 2001. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO Journal* 20: 1439-1448.
- Becher, P., Orlich, M., and H.J. Thiel. 2000. Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus results in altered growth characteristics. *Journal of Virology* 74: 7884-7894.

- Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.J., Meyers, G. & N. Tautz. 1998. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *Journal of Virology* 72: 2364-2372.
- Blanchard, E., Brand, D., Trassard, S., Goudeau, A., and P. Roingard. 2002. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J. Virol.* 76, 4073-4079.
- Blight, K. J. and C. M. Rice. 1997. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 71:7345-7352.
- Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, and C. M. Rice. 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290:1972-1974.
- Borman, A. M., P. LeMercier, M. Girard, and K. M. Kean. 1997. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* 25:925-932.
- Bukh, J., C. L. Apgar, and M. Yanagi. 1999. Toward a surrogate model for hepatitis C virus: An infectious molecular clone of the GB virus-B hepatitis agent. *Virology* 262:470-478.
- Bukh, J., Purcell, R. H., and R. H. Miller. 1993. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8234-8238.
- Buratti, E., S Tisminetzky, M Zotti, and FE Baralle. 1998. Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *Nucl. Acids. Res.* 26: 3179-3187.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J. Virol.* 76, 3720-3730.
- Cheng, J.-U., M.-F. Chang, and S. C. Chang. 1999. Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA. *J. Virol.* 73:7044-7049.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Chon, S. K., D. R. Perez, and R. O. Donis. 1998. Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhea virus. *Virology* 251:370-382.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Chung, R. T. and L. M. Kaplan. 1999. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) selectively binds the conserved 3' terminus of hepatitis C viral RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254:351-362.
- Cristofari, G., R. Ivanyi-Nagy, C. Gabus, S. Roulant, J.-P. Lavergne, F. Penin and J.-L. Darlix. 2004. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Research*, Vol. 32: 2623-2631.
- Darlix, J.L., Cristofari, G., Rau, M., Pechoux, C., Berthoux, L. and B. Roques. 2000. Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs. *Adv. Pharmacol.*, 46: 345-372.
- Dash, S., A. B. Halim, H. Tsuji, N. Hiramatsu, and M. A. Gerber. 1997. Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *Am. J. Pathol.* 151:363-373.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and J. Dubuisson. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* 71, 697-704.

- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and C. M. Rice. 1994. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* 68, 6147-6160.
- Dubuisson, J.. 2000. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 242, 135-148.
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and K. Bienz. 2002. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76, 5974-5984.
- Fang, J. W. and R. W. Moyer. 2000. The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J. Hepatol.* 33:632-639.
- Flint S. J., Enquist, L. W. and V. R. Rancaniello. 2003. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. American Society Microbiology
- Frolov, I., M. S. McBride, and C. M. Rice. 1998. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus hepatitis C virus 5' nontranslated region chimeras. *RNA* 4:1418-1435.
- Fukushi S, Okada M, Stahl J, Kageyama T, Hoshino FB, Katayama K.. 2001. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Biol Chem.* 276(24):20824-20826.
- Fukushi, S., K. Katayama, C. Kurihara, N. Ishiyama, F. B. Hoshino, T. Ando, and A. Oya. 1994. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:425-432.
- Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Ando, T. & A. Oya. 1994. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199: 425-432.
- Gamarnik, A. V. and R. Andino. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 12, 2293-2304.
- Gontarek, R. R., L. L. Gutshall, K. M. Herold, J. Tsai, G. M. Sathe, J. Mao, C. Prescott, and A. M. Del Vecchio. 1999. hnRNP C and polypyrimidine tract-binding protein specifically interact with the pyrimidine-rich region within the 3'NTR of the HCV RNA genome. *Nucleic Acids Res.* 27:1457-1463.
- Goodfellow, I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J. W. Almond, W. Barclay, and D. J. Evans. 2000. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74:4590-4600.
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and D. Moradpour. 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 77, 5487-5492.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and C. M. Rice. 1993. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* 67, 1385-1395.
- Gwack, Y., D. W. Kim, J. H. Han, and J. Choe. 1996. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:654-659.
- Hellen CU, Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* 15(13):1593-612.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and K. Shimotohno. 1991. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 5547-5551.

- Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and K. Shimotohno. 1993. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10773-10777.
- Hofacker, I. L., M. Fekete, C. Flamm, M. A. Huynen, S. Rauscher, P. E. Stolorz, and P. F. Stadler. 1998. Automatic detection of conserved RNA structure elements in complete RNA virus genomes. *Nucleic Acids Res.* 26:3825-3836.
- Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H., and S. M. Lemon. 1999. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J. Virol.* 73, 1165-1174.
- Honda, M., Brown, E. A., and S. M. Lemon. 1996. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* 2, 955-968.
- Honda, M., L. H. Ping, R. A. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, and S. M. Lemon. 1996. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 222:31-42.
- Hope, R. G. and J. McLauchlan. 2000. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J. Gen. Virol.* 81, 1913-1925.
- Hussy, P., Langen, H., Mous, J., and H. Jacobsen. 1996. Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* 224, 93-104.
- Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M. P., and C. Schuster. 2003. Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 84, 1549-1557.
- Ishii, T., K. Shiroki, A. Iwai, and A. Nomoto. 1999. Identification of a new element for RNA replication within the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J. Gen. Virol.* 80:917-920.
- Isken, O., C. W. Grassmann, R. T. Sarisky, M. Kann, S. Zhang, F. Grosse, P. N. Kao, and S. E. Behrens. 2003. Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. *EMBO J.* 22:5655-5665.
- Ito, T. and M. C. Lai. 1997. Determination of the secondary structure of and cellular protein binding to the 3'-untranslated region of the hepatitis C virus RNA genome. *J. Virol.* 71:8698-8706.
- Ito, T. and M. C. Lai. 1999. An internal polypyrimidine-tract-binding protein-binding site in the hepatitis C virus RNA attenuates translation, which is relieved by the 3'-untranslated sequence. *Virology* 254:288-296.
- Ito, T., S. M. Tahara, and M. C. Lai. 1998. The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* 72:8789-8796.
- Junker-Niepmann, M., R. Bartenschlager, and H. Schaller. 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9:3389-3396.
- Juraj Petrik, Hayley Parker, and Graeme J. M. Alexander. 1999. Human hepatic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds to the poly(U) tract of the 3' non-coding region of hepatitis C virus genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, Dec; 80: 3109 - 3113.
- Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama, K. K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and M. Kohara. 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 75, 1755-1760.
- Kalliampakou KI, Psaridi-Linardaki L, Mavromara P. 2002. Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES. *FEBS Lett.* 511(1-3):79-84

- Kamoshita, N., K. K. Tsukiyama, M. Kohara, and A. Nomoto. 1997. Genetic analysis of internal ribosomal entry site on hepatitis C virus RNA: implication for involvement of the highly ordered structure and cell type-specific transacting factors. *Virology* 233:9-18.
- Kanai, A., K. Tanabe, and M. Kohara. 1995. Poly(U) binding activity of hepatitis C virus NS3 protein, a putative RNA helicase. *Febs Letters* 376:221-224.
- Karin Spångberg, Lisa Wiklund, and Stefan Schwartz. 2001. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J. Gen. Virol.* 82: 113 - 120.
- Khromykh, A. A. and E. G. Westaway. 1997. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J. Virol.* 71:1497-1505.
- Khromykh, A. A., N. Kondratieva, J. Y. Sgro, A. Palmenberg, and E. G. Westaway. 2003. Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome. *J. Virol.* 77:10623-10629.
- Khromykh, A., Meka, A., Guyatt, K. and E. G. Westaway. 2001. Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *J. Virol.* 75: 6719-6728
- Khromykh, A.A. & E.G. Westaway. 1997. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *Journal of Virology* 71, 1497-1505.
- Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, Doudna JA. 2002. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nat Struct Biol.* 9(5):370-4.
- Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., and J. A. Doudna. 2001. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* 7, 194-206.
- Kim, I., Lukavsky, P. J., and J. D. Puglisi. 2002. NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 9338-9339.
- Kim, M., H. Kim, S. P. Cho, and M. K. Min. 2002. Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA. *J. Virol.* 76:6944-6956.
- Kim, Y. K., Kim, C. S., Lee, S. H., and S. K. Jang. 2002. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 105-112.
- Kim, Y. K., Lee, S. H., Kim, C. S., Seol, S. K., and S. K. Jang. 2003. Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 9, 599-606.
- Klovins, J. and J. van Duin. 1999. A long-range pseudoknot in Qbeta RNA is essential for replication. *J. Mol. Biol.* 294:875-884.
- Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M., and C. M. Rice. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277, 570-574.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 2000. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J. Virol.* 74:2046-2051.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* 70:3363-3371.
- Kong, L. K., and Peter Sarnow 2002. Cytoplasmic Expression of mRNA Containing the Internal Ribosome Entry Site and 3' Noncoding Region of Hepatitis C Virus: effects of the 3' Leader on mRNA Translation and mRNA Stability. *J. Virol.* 76: 12457-12462.
- Krieger, N., Lohmann, V., and R. Bartenschlager. 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture adaptive mutations. *J. Virol.* 75, 4614-4624.

- Lemon, S. and M. Honda. 1997. Internal ribosome entry sites within the RNA genomes of hepatitis C virus and other flaviviruses. *Semin. Virol.* 8:274-288.
- Hans C. van Leeuwen, Chantal B. E. M. Reusken, Marko Roeten, Tim J. Dalebout, Jose Ignacio Riezu-Boj, Juan Ruiz, and Willy J. M. Spaan. 2004. Evolution of naturally occurring 5' non-translated region variants of hepatitis C virus genotype 1b in selectable replicons. *J Gen Virol* 85: 1859-1866.
- Liljestrom, P. & H. Garoff. 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 9: 1356-1361.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W., and C. M. Rice. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J. Virol.* 68, 5063-5073.
- Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann und R. Bartenschlager. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-3.
- Lohmann, V., F. Körner, U. Herian, and R. Bartenschlager. 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* 71:8416-8428.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., and R. Bartenschlager. 2003. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* 77, 3007-3019.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A., and R. Bartenschlager. 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J. Virol.* 75, 1437-1449.
- Lohmann, V., Overton, H., and R. Bartenschlager. 1999. Selective stimulation of hepatitis C virus and pestivirus NS5B RNA polymerase activity by GTP. *J. Biol. Chem.* 274, 10807-10815.
- Lu, H. H. and E. Wimmer. 1996. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1412-1417.
- Lukavsky, P. J., G. A. Otto, A. M. Lancaster, P. Sarnow, and J. D. Puglisi. 2000. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat. Struct. Biol.* 7:1105-1110.
- Luo, G. 1999. Cellular proteins bind to the poly(U) tract of the 3' untranslated region of hepatitis C virus RNA genome. *Virology* 256:105-118.
- Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J., and R. J. Colonno. 2000. De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J. Virol.* 74, 851-863.
- Luo, G., Xin, S., and Z. Cai. 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 77, 3312-3318.
- Luvasky, P.J., Kim, I., Otto, G.A. and Puglisi, J.D. 2003. Structure of HCV IRES domain determined by NMR. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 1033-1038.
- Mandl, C. W., H. Holzmann, T. Meixner, S. Rauscher, P. F. Stadler, S. L. Allison, and F. X. Heinz. 1998. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J. Virol.* 72:2132-2140.
- Markoff, L. 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv. Virus Res.* 59:177-228.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova, and T. M. Henry. 2002. Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 76:9686-9694.

- McKnight, K. L. and S. M. Lemon. 1998. The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA*. 4:1569-1584.
- McLaren RS, Caruccio N, and J. Ross. 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol Cell Biol*. 17(6):3028-36.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and B. Martoglio. 2002. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*. 21, 3980-3988.
- Meerovitch, K., R. Nicholson, and N. Sonenberg. 1991. In vitro mutational analysis of cis-acting RNA translational elements within the poliovirus type 2 5' untranslated region. *J. Virol*. 65:5895-5901.
- Men, R., M. Bray, D. Clark, R. M. Chanock, and C. J. Lai. 1996. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J. Virol*. 70:3930-3937.
- Merola, M., Brazzoli, M., Cocchiarella, F., Heile, J. M., Helenius, A., Weiner, A. J., Houghton, M., and S. Abrignani. 2001. Folding of hepatitis C virus E1 glycoprotein in a cell-free system. *J. Virol*. 75, 11205-11217.
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., and J. Dubuisson. 1997. Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol*. 78, 2299-2306.
- Michel Y.M., Borman A.M., Paulous S., and K.M. Kean. 2001. Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol Cell Biol*. 21(13):4097-109.
- Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., and K. Shimotohno. 1994a. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol*. 68, 6215-6222.
- Mizushima, H., Hijikata, M., Tanji, Y., Kimura, K., and K. Shimotohno. 1994b. Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2. *J. Virol*. 68, 2731-2734.
- Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., and R. Thomssen. 1999. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol*. 57, 223-229.
- Moradpour, D., Bras, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H. e., Bartenschlager, r., Penin, F., and Volker Lohmann. 2004. Membrane association of the RNA-Dependent RNA Polymerase is essential for hepatitis C virus replication. *J. Virol* 78: 13278-13284.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., and J. R. Wands. 1996. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 222, 51-63.
- Morgenstern, K. A., Landro, J. A., Hsiao, K., Lin, C., Gu, Y., Su, M. S., and Thomson, J. A. (1997). Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J. Virol*. 71, 3767-3775.
- Murakami, K., M. Abe, T. Kageyama, N. Kamoshita, and A. Nomoto. 2001. Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch. Virol*. 146:729-741.
- Nam JH, Faulk K, Engle RE, Govindarajan S, St Claire M and J. Bukh. 2004. In vivo analysis of the 3' untranslated region of GB virus B after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone: persistent infection in a transfected tamarin. *J Virol*. 78(17):9389-99.
- Odreman-Macchioli, F., Baralle, F.E., Buratti, E. 2001. Mutational analysis of the different bulge regions of Hepatitis C Virus Domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *J. Biol. Chem*. 276: 41648-41655.

- Oh, J. W., G. T. Sheu, and M. M. Lai. 2000. Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J. Biol. Chem.* 275:17710–17717.
- Oh, J. W., Ito, T., and M. C. Lai. 1999. A recombinant hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase capable of copying the full-length viral RNA. *J. Virol.* 73, 7694-7702.
- Otto, G. A., Lukavsky, P. J., Lancaster, A. M., Sarnow, P., and J. D. Puglisi. 2002. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 8, 913-923.
- Paolini, C., De Francesco, R., and P. Gallinari. 2000. Enzymatic properties of hepatitis C virus NS3-associated helicase. *J. Gen. Virol.* 81, 1335-1345.
- Paul, A. V., E. Rieder, D. W. Kim, J. H. van Boom, and E. Wimmer. 2000. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J. Virol.* 74:10359-10370.
- Pawlotsky, J. M.. 2003. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin. Liver Dis.* 7, 45-66.
- Pellerin C, Lefebvre S, Little MJ, McKercher G, Lamarre D, and G. Kukulj. 2002. Internal initiation sites of de novo RNA synthesis within the hepatitis C virus polypyrimidine tract. *Biochem Biophys Res Commun.* 295(3):682-8.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334:320-325.
- Penin, F. (2003). Structural biology of hepatitis C virus. *Clin. Liver Dis.* 7, 1-21.
- Pestova, T. V., I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. T. Jackson, and C. T. Hellen. 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* 12:67-83.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and R. Bartenschlager. 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J. Virol.* 76, 4008-4021.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and S. Abrignani. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.
- Portman, D.S. and G Dreyfuss. 1994. RNA annealing activities in HeLa nuclei. *EMBO J.* 13: 213-221.
- Preugschat, F., D. R. Averett, B. E. Clarke, and D. T. Porter. 1996. A steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of the NTPase activity associated with the hepatitis C virus NS3 helicase domain. *J. Biol. Chem.* 271:24449-24457.
- Qi Z., Kalkeri G., Hanible J., Prabhu R., Bastian F., Garry R.F.. 2003. Stem-loop structures II-IV of the 5' untranslated sequences are required for the expression of the full-length hepatitis C virus genome. *Arch Virol* 148: 449-67.
- Ralston, R., Thudium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hall, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M., and Q. L. Choo. 1993. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 67, 6753-6761.
- Reigadas, S., Ventura, M., Sarih-Cottin, L., Castroviejo, M., Litvak, S., and T. Astier-Gin. 2001. HCV RNA-dependent RNA polymerase replicates in vitro the 3' terminal region of the minus-strand viral RNA more efficiently than the 3' terminal region of the plus RNA. *Eur. J. Biochem.* 268, 5857-5867.
- Rein, A., Henderson, L.E. and J.G. Levin. 1998. Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem. Sci.* 23: 297-301.

- Reusken B. E. M. Chantal, Tim J. Dalebout, Peter Eerlight, Peter J Bredenbeek and Willy J. M. Spaan. 2003. Analysis of hepatitis C virus/ classical swine fever virus chimeric 5'NTRs: Sequences within the hepatitis C virus IRES are required for viral RNA replication. (*J. Gen Virol.* 84 :1761-1769.
- Reynolds, J. E., A. Kaminski, A. R. Carroll, B. E. Clarke, D. J. Rowlands, and R. J. Jackson. 1996. Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *RNA.* 2:867-878.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J., and R. J. Jackson. 1995. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* 14, 6010-6020.
- Rieder, E., A. V. Paul, D. W. Kim, J. H. van Boom, and E. Wimmer. 2000. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol.* 74:10371-10380.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P. J., Haasnoot, P. C., Kieft, J. S., Spaan, W. J., and S. M. Lemon. 2001. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 7, 585-597.
- Rijnbrand, R., P. Bredenbeek, T. vanderStraaten, L. Whetter, G. Inchauspe, S. Lemon, and W. Spaan. 1995. Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett.* 365:115-119.
- Rijnbrand, R., T. vanderStraaten, P. A. vanRijn, W. M. Spaan, and P. J. Bredenbeek. 1997. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* 71:451-457.
- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin i T, Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., and A. Weiner. 1998. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch. Virol.* 143, 2493-2503.
- Ross J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* 59(3):423-50.
- Santolini, E., Migliaccio, G., and M. N. La. 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 68, 3631-3641.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., and N. LaMonica. 1995. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* 69, 7461-7471.
- Sbardellati, A., E. Scarselli, E. Verschoor, A. De Tomassi, D. Lazzaro, and C. Traboni. 2001. Generation of infectious and transmissible virions from a GB virus B full-length consensus clone in tamarins. *J. Gen. Virol.* 82:2437-2448.
- Sbardellati, A., E. Scarselli, L. Tomei, A. S. Kekulé, and C. Traboni. 1999. Identification of a novel sequence at the 3' end of the GB virus B genome. *J. Virol.* 73:10546-10550
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and A. Vitelli. 2002. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017-5025.
- Schuster, C., Isel, C., Imbert, I., Ehresmann, C., Marquet, R., and M. P. Kieny. 2002. Secondary structure of the 3' terminus of hepatitis C virus minus-strand RNA. *J. Virol.* 76, 8058-8068.
- Selby, M. J., Choo, Q. L., Berger, K., Kuo, G., Glazer, E., Eckart, M., Lee, C., Chien, D., Kuo, C., and M. Houghton. 1993. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J. Gen. Virol.* 74, 1103-1113.

- Shiroki, K., T. Ishii, T. Aoki, M. Kobashi, S. Ohka, and A. Nomoto. 1995. A new cis-acting element for RNA replication within the 5' noncoding region of poliovirus type 1 RNA. *J. Virol.* 69:6825-6832.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and S. Murakami. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 277, 11149-11155.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., and M. S. Urdea. 1993. 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.* 74, 2391-2399.
- Simons, J. N., T. J. Pilot-Matias, T. P. Leary, G. J. Dawson, S. M. Desai, G. G. Schlauder, A. S. Muerhoff, J. C. Erker, S. L. Buijk, M. L. Chalmers, C. L. Van Sant, and I. K. Mushahwar. 1995. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3401– 3405.
- Smith, D.B., J Mellor, LM Jarvis, F Davidson, J Kolberg, M Urdea, PL Yap, and P Simmonds. 1995. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J. Gen. Virol.* 76: 1749 - 1761.
- Smith, D. B. and P. Simmonds. 1997. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: Constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J. Molec. Evol.* 45:238-246.
- Smith, R. M., Walton, C. M., Wu, C. H., and G. Y. Wu. 2002. Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J. Virol.* 76, 9563-9574.
- Sorrentino S and M. Libonati. 1997. Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett.* 404(1):1-5.
- Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and J. Frank. 2001. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
- Spangberg K, Goobar-Larsson L, Wahren-Herlenius M, S. Schwartz. 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the U-rich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. *J Hum Virol.* 2(5):296-307.
- Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz. 2000. HuR, a protein implicated in oncogene and growth factor mRNA decay, binds to the 3' ends of hepatitis C virus RNA of both polarities. *Virology* 274:378-390.
- Strauss, J.H. and E.G. Strauss. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491–562.
- Suzich, J. A., Tamura, J. K., Palmer, H. F., Warren, P., Grakoui, A., Rice, C. M., Feinstone, S. M., and M. S. Collett. 1993. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J. Virol.* 67, 6152-6158.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, and K. Shimotohno. 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:744-749.
- Tanaka, T., N. Kato, M. J. Cho, K. Sugiyama, and K. Shimotohno. 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* 70:3307-3312
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G., and A. Uy. 1992. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* 181, 293-300.
- Turner, C., Witwer, C., Hofacker I.L. and Peter F. Stadler. 2004. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J. of General Virology* 85: 1113-1124.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., and La N. Monica. 1993. NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J. Virol.* 67, 4017-4026.

- Tsuchihara, K., T. Tanaka, M. Hijikata, S. Kuge, H. Toyoda, A. Nomoto, N. Yamamoto, and K. Shimotohno. 1997. Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J. Virol.* 71:6720-6726.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & A. Nomoto. 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* 66: 1476-1483.
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y. M., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and M. C. Lai. 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology* 263, 30-41.
- Tuplin, A., J. Wood, D. J. Evans, A. H. Patel, and P. Simmonds. 2002. Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA.* 8:824-841.
- van Leeuwen HC, Reusken CB, Roeten M, Dalebout TJ, Riezu-Boij JI, Ruiz J, Spaan WJ. 2004. Evolution of naturally occurring 5' non-translated region variants of hepatitis C virus genotype 1b in selectable replicons. *J Gen Virol.* 85:1859-66.
- Varaklioti, A., N. Vassilaki, U. Georgopoulou und P. Mavromara. 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277:17713-21.
- Verheije, M. H., R. C. Olsthoorn, M. V. Kroese, P. J. Rottier, and J. J. Meulenberg. 2002. Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication. *J. Virol.* 76:1521-1526.
- Victoria G. Kolupaeva, Tatyana V. Pestova, and Christopher U. T. Hellen. 2000. An Enzymatic Footprinting Analysis of the Interaction of 40S Ribosomal Subunits with the Internal Ribosomal Entry Site of Hepatitis C Virus. *J. Virol.* 74: 6242-6250.
- Walewski, J. L., T. R. Keller, D. D. Stump und A. D. Branch. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 7:710-21.
- Wang, C., Sarnow, P. & A. Siddiqui. 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology* 67: 3338-3344.
- Wang, G. H. and C. Seeger. 1993. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J. Virol.* 67:6507-6512.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C., and P. L. Darke. 2001. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 13931-13935.
- Wei Dong Zhao, Frederick C. Lahser, and Eckard Wimmer. 2000. Genetic Analysis of a Poliovirus/Hepatitis C Virus (HCV) Chimera: Interaction between the Poliovirus Cloverleaf and a Sequence in the HCV 5' Nontranslated Region Results in a Replication Phenotype. *J. Virol.* 74: 6223-6226.
- Weidong Zhong, Annette S. Uss, Eric Ferrari, Johnson Y. N. Lau, and Zhi Hong. 2000. De Novo Initiation of RNA Synthesis by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. *J. Virol.* 74: 2017-2022.
- Weidong Zhong, Eric Ferrari, Charles A. Lesburg, David Maag, Saikat Kumar B. Ghosh, Craig E. Cameron, Johnson Y. N. Lau, and Zhi Hong. 2000. Template/Primer Requirements and Single Nucleotide Incorporation by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. *J. Virol.* 74: 9134-9143.
- Wimmer, E., C. U. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* 27:353-436.
- Wood, J., R. M. Frederickson, S. Fields, and A. H. Patel. 2001. Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins. *J. Virol.* 75:1348-1358.
- Xiang, W, A. Paul, and E. Wimmer. 1997. RNA signals in entero- and rhinovirus genome replication. *Sem. Virol.* 8:256-273.

- Xu, Z., J. Choi, T. S. Yen, W. Lu, A. Strohecker, S. Govindarajan, D. Chien, M. J. Selby und J. Ou. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* 20:3840-8.
- Yamada, N., K. Tanihara, A. Takada, T. Yorihuzi, M. Tsutsumi, H. Shimomura, T. Tsuji, and T. Date. 1996. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223:255-261.
- Yamashita, T., S. Kaneko, Y. Shirota, W. Qin, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 1998. RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 273:15479-15486.
- Yanagi, M., C. M. St, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and J. Bukh. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2291-2295.
- Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama, K. K., Funahashi, S. I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J. R., and M. Kohara. 1998. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 72, 6048-6055.
- Yi, M. and S. M. Lemon. 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 77:3557-3568.
- Yi, M. and S. M. Lemon. 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* 9, 331-345.
- Yoo, B. J., Selby, M. J., Choe, J., Suh, B. S., Choi, S. H., Joh, J. S., Nuovo, G. J., Lee, H. S., Houghton, M., and J. H. Han. 1995. 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.* 69, 32-38.
- Yoo, B. J., Spaete, R. R., Geballe, A. P., Selby, M., Houghton, M., and J. H. Han. 1992. 5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translational control elements within the 5' untranslated region. *Virology* 191, 889-899.
- You, S., D. D. Stump, A. D. Branch, and C. M. Rice. 2004. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 78:1352-1366.
- Yu, H., C. W. Grassmann, and S. E. Behrens. 1999. Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* 73:3638-3648.
- Yu, H., O. Isken, C. W. Grassmann, and S. E. Behrens. 2000. A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J. Virol.* 74:5825-5835.
- Zhao, W. D. and E. Wimmer. 2001. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* 75:3719-3730.
- Zhao, W. D., E. Wimmer, and F. C. Lahser. 1999. Poliovirus/Hepatitis C virus (internal ribosomal entry site-core) chimeric viruses: improved growth properties through modification of a proteolytic cleavage site and requirement for core RNA sequences but not for core-related polypeptides. *J. Virol.* 73:1546-1554.
- Zhaohui Cai, T. Jake Liang, and Guangxiang Luo. 2004. Effects of Mutations of the Initiation Nucleotides on Hepatitis C Virus RNA Replication in the Cell. *J. Virol.* 78: 3633-3643.
- Zhong, W., A. S. Uss, E. Ferrari, J. Y. Lau, and Z. Hong. 2000. De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J. Virol.* 74:2017-2022.
- Zhu, Q., J. T. Guo, and C. Seeger. 2003. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J. Virol.* 77:9204-9210.

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415.

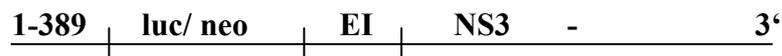
7. Anhang

Die Konstrukte pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1, pFK1-389LucEI3420-9605/NK5.1, pFK1-389neoEI3420-9605/T, pFK1-389LucEI3420-9605/T, pFK1-389neoEI3420-9605/ET und pFK1-389LucEI3420-9605/ET bilden den Ausgangspunkt für den Großteil der neugebildeten Konstrukte.

Klonierungsrestriktionen sind nach dem Standardprotokoll 2.2.4, Ligationen nach dem Standardprotokoll 2.2.10 (3er Ligation: Ligationsreaktion mit zwei gleichzeitig in einen Vektor inserierten DNA-Fragmenten), PCR-Produkte nach dem Standard-Protokoll 2.2.13 erzeugt worden. Die verwendeten Primer und die Matrize sind jeweils angegeben. Das Prinzip von überlappenden PCR-Reaktionen ist unter 2.2.14 erläutert.

Die Namen der Konstrukte, die in eine Transkription eingesetzt wurden sind fett dargestellt. Die in den pBSK-Vektor eingefügten Mutationen entsprechen denen der entsprechenden pFK-Reihe.

7.1 Konstrukte mit Mutationen in der 5' NTR



pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Δ24-40 (Abb. 7): Amplifikation der 5'NTR mit Deletion Δ24-40 über PCR (S Δ24-40 HindIII; A neo 3'Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x HindIII/ AscI (Insert1); pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x AscI/ XhoI (Insert2); Ligation Insert 1+2 in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x HindIII/ XhoI

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Δ24-40(Abb. 7): Amplifikation der 5'NTR mit Deletion Δ24-40 über PCR (S Δ24-40 HindIII; A neo 3'Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x HindIII/ AscI (Insert1); pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x AscI/ XhoI (Insert2); Ligation Insert 1+2 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x HindIII/ XhoI

pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Δ5-20(Abb. 7): Amplifikation der 5'NTR mit Deletion Δ5-20 über PCR (S Δ5-20HindIII; A neo 3'Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x HindIII/ AscI (Insert1); pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x AscI/ XhoI (Insert2); Ligation Insert 1+2 in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x HindIII/ XhoI

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Δ5-20(Abb. 7): Amplifikation der 5'NTR mit Deletion Δ5-20 über PCR (S Δ5-20HindIII; A neo 3'Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x HindIII/ AscI (Insert1); pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x AscI/ XhoI (Insert2); Ligation Insert 1+2 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x HindIII/ XhoI



pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1: Ligation PmeI-SfiI-Fragment (2,4kb) aus pFK1-389neoPIneoEI3420-9605/Wt (Insert1) und Sfi-Sfi-Fragment (4,8kb) aus pFK1-

389neoEI3420-9605/NK5.1 in pFK-SbfI/T7/nt1/EcoRI/6699-9605 x PmeI/ SfiI (4,2kb-Fragment)

pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1: Ligation PmeI-SfiI-Fragment (2,4kb) aus pFK1-389neoPIIucEI3420-9605/Wt (Insert1) und Sfi-Sfi-Fragment (4,8kb) aus pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 in pFK-SbfI/T7/nt1/EcoRI/6699-9605 x PmeI/ SfiI (4,2kb-Fragment)

pFK-5PIneoEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt5SbfPme + A T7nt5SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-5PIIucEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt5SbfPme + A T7nt5SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-12PIneoEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt12SbfPme + A T7nt12SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-12PIIucEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt12SbfPme + A T7nt12SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-24PIneoEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt24SbfPme + A T7nt24SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-24PIIucEI3420-9605/NK5.1: Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S T7nt24SbfPme + A T7nt24SbfPme x SbfI/ PmeI in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-43PIneoEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt43 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 23-43Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-43PIIucEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt43 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 23-43Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-125PIneoEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt125 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 102-125Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-125PIIucEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt125 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 102-125Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-296PIneoEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt296 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 271-296Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-296PIIucEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt296 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 271-296Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

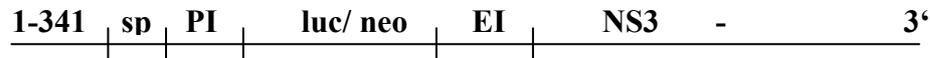
pFK-341PIneoEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt341 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 310-341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-341PIIucEI3420-9605/NK5.1: Amplifikation der nt341 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 310-341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-1PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-341PIneoEI3420-9605/NK5.1/Δ5B: Ligation des SfiI-SpeI-Fragments (1,2kb) aus pFK1-389neoEI3420-9605/Δ5B in pFK-341PIneoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI

pFK-341PIIucEI3420-9605/NK5.1/Δ5B: Ligation des SfiI-SpeI-Fragments (1,2kb) aus pFK1-389neoEI3420-9605/Δ5B in pFK-341PIIucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI

Die in die 341Piluc/neoEI3420-9605/NK5.1-Reihe eingefügten Mutationen entsprechen denen der Serie 341-sp-PVI-luc/neoEI3420-9605 (s.unten).



pFK-1-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-1PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-5-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-5PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-12-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-12PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-24-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-24PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-43-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-43PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-84-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der nt84 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 84Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-125-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-125PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-Δ72-96-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der Δ72-96 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A Δ72-96 Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-Δ61-104-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der Δ61-104 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A Δ61-104 Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-296-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-296PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S 60er-Spacer PmeSitent xx/ A 60erSpacer nt xx Pme x PmeI in pFK-341PIlucEI3420-9605/NK5.1 x PmeI

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1/Δ5B(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-341PIlucEI3420-9605/NK5.1/Δ5B x PmeI/ HindIII

pFK-1-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-1-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-5-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-5-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/

NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-12-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-12-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-24-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-24-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-43-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-43-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-84-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der nt84 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 84Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-125-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 in pFK-125PIneoEI3420-9605/NK5.1 x PmeI/ HindIII

pFK-Δ72-96-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der Δ72-96 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A Δ72-96 Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-Δ61-104-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Amplifikation der Δ61-104 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A Δ61-104 Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1 x SbfI/ PmeI

pFK-296-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-296-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1(Abb. 9): Vektor: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI-Fragment (10kb-Fragment); Insert 1: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605 x PmeI/ NotI → 2,5kb-Fragment x ApaI → 0,7kb-Fragment; Insert 2: SK-PI-neo x ApaI/ NotI; Ligation Vektor+ Insert1 +Insert2

pFK-106-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt106 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 106Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-119-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt119 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 119Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-125mut95-110-lucEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt125mut95-110 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 125mut95-110Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-320-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt320 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 320Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 9): Vektor: pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI-Fragment (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb); Insert: pFK1-389LucEI3420-9605/ET x SfiI/SpeI-Fragment (Sfi-Spe-Fragment: 1,1kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET/Δ5B(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET in pFK-341PIlucEI3420-9605/ET/Δ5B x PmeI/ HindIII

pFK-341mut95-110-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt341mut95-1105'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341mut95-110; S 341mut95-110; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341IIIa_mut-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt341IIIa_mut 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341IIIa_mut; S 341IIIa_mut; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341ΔIIIa-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt341ΔIIIa 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341ΔIIIa; S 341ΔIIIa; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341ΔIIIb-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt341ΔIIIb 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341ΔIIIb; S 341ΔIIIb; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-374-PVI-lucEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt374 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 374Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-106-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt106 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 106Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-119-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt119 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 119Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-125mut95-110-neoEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt125mut95-110 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 125mut95-110Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-320-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt320 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 320Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 9): Vektor: pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI-Fragment (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb); Insert: pFK1-389NeoEI3420-9605/ET x SfiI/SpeI-Fragment (Sfi-Spe-Fragment: 1,1kb)

pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET/Δ5B(Abb. 9): Ligation des PmeI-HindIII-Fragments (2,4kb) aus pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET in pFK-341PIneoEI3420-9605/ET/Δ5B x PmeI/ HindIII

pFK-341mut95-110-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 12): Amplifikation der nt341mut95-1105'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341mut95-110; S 341mut95-110; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341IIIa_mut-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt341IIIa_mut 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341IIIa_mut; S 341IIIa_mut; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341ΔIIIa-PVI-neoEI3420-9605/ET(Abb. 14): Amplifikation der nt341ΔIIIa 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341ΔIIIa; S 341ΔIIIa; A 341Pme;

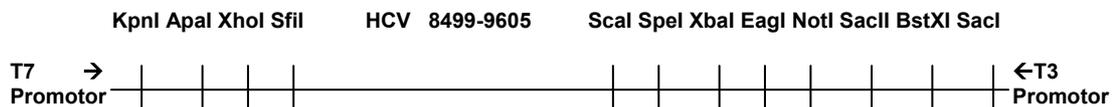
pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-341 Δ III B-PVI-neoEI3420-9605/ET (Abb. 14): Amplifikation der nt341 Δ III B 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 341 Δ III B; S 341 Δ III B; A 341Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

pFK-374-PVI-neoEI3420-9605/ET (Abb. 12): Amplifikation der nt374 5'-NTR-Mutation über PCR (S T7(nt1)Sbf; A 374Pme; pFK1.389neoEI3420-9601/NK5.1) x SbfI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SbfI/ PmeI

7.2 Konstrukte mit Mutationen in der 3' NTR

pBSK



pBSK-8499-9605HCV-Stu/Bam: Klonierungszwischenkonstrukt; Mutagenese PCR zur Amplifikation 8499-9605 mit StuI/ BamHI-Schnittstelle (S 8492Xho/Sfi + A 9392Stu auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-1]; S 9392Stu + A 9508Bam auf auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-2]; S 9508Bam + A 9605 Sca/ Spe auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-3]; S 9392Stu + A9605 Sca/ Spe auf PCR 2+3 [PCR-4]); Ligation PCR-1 x XhoI/ StuI und PCR-4 x StuI/ SpeI in pBSK(-) x XhoI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-Stu: Klonierungszwischenkonstrukt; Amplifikation des HCV-Bereichs 9392-9605 durch PCR (S 9392Stu + A 9605 Sca/ Spe auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1); Ligation des PCR-Produkts x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu/Bam x StuI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-Bam: Klonierungszwischenkonstrukt; Amplifikation des HCV-Bereichs 8499-9508 durch PCR (S 8492 Xho/Sfi + A 9508 Bam auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1; Ligation PCR-Produkt x XhoI/ BamHI in pBSK-8499-9605HCV-Stu/Bam x XhoI/ BamHI

pBSK-8499-9605HCV-46U: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-46U-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV-26U: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-26U-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV-6U: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-6U-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV-1U: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-1U-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV- Δ 9401: Klonierungszwischenkonstrukt; PCR zur Herstellung und Amplifikation der 9401 Deletion (S Xho/Sfi8492 + A del9401 auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1); Ligation der PCR x XhoI/ StuI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x XhoI/ StuI

pBSK-8499-9605HCV-Δ9415: Klonierungszwischenkonstrukt; PCR zur Herstellung und Amplifikation der 9415 Deletion (S Xho/Sfi8492 + A del9415 auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1); Ligation der PCR x XhoI/ StuI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x XhoI/ StuI

pBSK-8499-9605HCV-26A: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-26A-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV-26G: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-26G-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK-8499-9605HCV-26C: Klonierungszwischenkonstrukt; Anealing der Oligonukleotide S 9402StuI-26C-NheI+ A 9535NheI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK8499-9605/Δ3'X: Anealing der Oligonukleotide S- Δ3'X + A- Δ3'X und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

pBSK8499-9605/ΔSL1: Anealing der Oligonukleotide S-SL1 + A-SL1 und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ NheI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ NheI

pBSK8499-9605/ΔSL2: Anealing der Oligonukleotide S-SL2 + A-SL2 und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

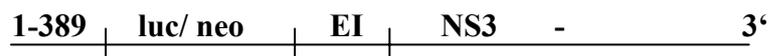
pBSK8499-9605/ΔSL3: Anealing der Oligonukleotide S-SL3 + A-SL3 und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-SL1↔SL2: Mutagenese PCR zur Amplifikation SL1↔SL2 (S-Stu + A SL1↔SL2 auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-1]; S SL1↔SL2 + A9605 Sca/Spe auf auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-2]; S-Stu + A 9605 Sca/Spe auf PCR 1 + 2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-SL1m: Mutagenese PCR zur Amplifikation SL1m (S-Stu + A SL1m auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-1]; S SL1m + A9605 Sca/Spe auf auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-2]; S-Stu + A 9605 Sca/Spe auf PCR 1 + 2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-SL2': Mutagenese PCR zur Amplifikation SL2' (S-Stu + A SL2' auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-1]; S SL2' + A9605 Sca/Spe auf auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-2]; S-Stu + A 9605 Sca/Spe auf PCR 1 + 2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI

pBSK-8499-9605HCV-SL3m: Mutagenese PCR zur Amplifikation SL3m (S-Stu + A SL3m auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-1]; S SL3m + A9605 Sca/Spe auf auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 [PCR-2]; S-Stu + A 9605 Sca/Spe auf PCR 1 + 2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu x StuI/ SpeI



pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Stu/Bam (Abb. 16): Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu/Bam in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Stu/Bam(Abb. 16):** Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu/Bam in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Stu(Abb. 16):** Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Stu(Abb. 16):** Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Bam(Abb. 16):** Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Bam in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Bam(Abb. 16):** Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Bam in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-46U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-46U in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-46U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-46U in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-26U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26U in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-26U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26U in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-6U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-6U in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-6U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-6U in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-1U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-1U in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-1U(Abb. 18):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-1U in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Δ9401(var) (Abb. 17):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9401 in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Δ9401(var) (Abb. 17):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9401 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-26A(Abb. 19):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26A in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-26A(Abb. 19):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26A in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-26G(Abb. 19): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26G in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-26G(Abb. 19): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26G in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-26C(Abb. 19): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26C in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-26C(Abb. 19): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-26C in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1-Δ9415(var) (Abb. 17): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9415 in pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Δ9415(var) (Abb. 17): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9415 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-Δ3'X(Abb. 20): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK8499-9605/Δ3'X in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

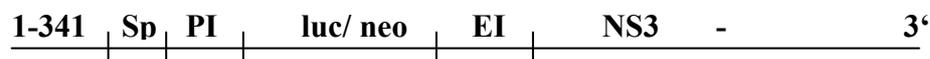
pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-ΔSL1(Abb. 20): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK8499-9605/ΔSL1 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-ΔSL2(Abb. 20): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK8499-9605/ΔSL2 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-ΔSL3(Abb. 20): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK8499-9605/ΔSL3 in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-3C(Abb. 23): Anealing der Oligonukleotide S-3'C-SbfI-up + A-3'C-SbfI-up und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x ScaI in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x ScaI

pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1-5C(Abb. 23): Anealing der Oligonukleotide S-5'C-SbfI-up + A-5'C-SbfI-up und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase (Insert); Ligation des Inserts x ScaI in pFK1-389lucEI3420-9605/NK5.1 x ScaI



pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-Stu: Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET-Stu: Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Stu in pFK-341-sp-PVI-neoEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/ET-SL1↔SL2(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL1↔SL2 in pFK1-389lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL1↔SL2(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL1↔SL2 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/ET-SL1m(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL1m in pFK1-389lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL1m(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL1m in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/ET-SL2'(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL2' in pFK1-389lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL2'(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL2' in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK1-389lucEI3420-9605/ET-SL3m(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL3m in pFK1-389lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL3m(Abb. 21): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL3m in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

1-389 | Renilla-luc | EI | Firefly-luc 8499 - 3'

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-Stu: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Stu in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-ΔSL1: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ΔSL1 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-ΔSL2: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ΔSL2 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-ΔSL3: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ΔSL3 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-Δ3'X: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δ3'X in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-Δ9401(var): Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9401(var) in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-Δ9415(var): Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δ9415(var) in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

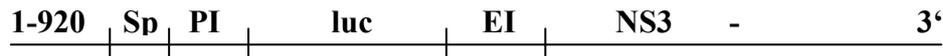
pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-U6: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-U6 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-U26: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-U26 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3'-U46: Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-U46 in pFK-HI-Renilla-luc-EI-firefly-luc-8499-3' x SfiI/ SpeI (8kb)

Die Mutationen dieser Reihe entsprechen denen der pFK1-389luc/neoEI3420-9605-Serie.

7.3 Konstrukte mit Mutationen in der kodierenden Region



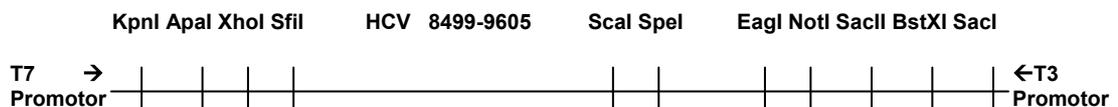
pFK-920-PVI lucEI3420-9605/ET(Abb. 27): Amplifikation der ersten 920nt über PCR (S Age; A 920Pme; pFK1-9605Con1) x AgeI/ PmeI ligiert in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x AgeI/ PmeI

pFK-920coreI-PVI lucEI3420-9605/ET(Abb. 26/27): Amplifikation der coreI Mutation über PCR (S Age und A coreI auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S coreI und A 920Pme auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S Age und A 920Pme auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x AgeI/ PmeI (0,8kb) in pFK-920-PVI lucEI3420-9605/ET x AgeI/ PmeI (11,5kb)

pFK-920coreII-PVI lucEI3420-9605/ET(Abb. 26/27): Amplifikation der coreII Mutation über PCR (S Age und A coreII auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S coreII und A 920Pme auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S Age und A 920Pme auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x AgeI/ PmeI (0,8kb) in pFK-920-PVI lucEI3420-9605/ET x AgeI/ PmeI (11,5kb)

pFK-920stop-PVI lucEI3420-9605/ET(Abb. 26/27): Amplifikation der 920stop Mutation über PCR (S Age und A 920stop auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S 920stop und A 920Pme auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S Age und A 920Pme auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x AgeI/ PmeI (0,8kb) in pFK-920-PVI lucEI3420-9605/ET x AgeI/ PmeI (11,5kb)

pBSK



pBSK-8499-9605HCV-Stu*: Klonierungszwischenkonstrukt; pBSK-8499-9605HCV-Stu x XbaI und Auffüllung mit Kleenow-Polymerase; Ligation

pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu: Klonierungszwischenkonstrukt; Amplifikation des HCV-Bereichs 9392-9605 durch PCR (S 9392Xba/Stu + A 9605 Sca/ Spe auf pFK1-389neoEI3420-9605/NK5.1); Ligation des PCR-Produkts x StuI/ SpeI in pBSK-8499-9605HCV-Stu* x StuI/ SpeI (4,2kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-mut3.1 : Amplifikation der mut3.1 Mutation über PCR (S S8996NcoI und A mut3.1 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S mut3.1 und A A9383Xba/Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S S8996NcoI und A9383Xba/Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NheI/ StuI (0,5kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu x NheI/StuI (4kb-Fragment)

- pBSK-8499-9605HCV-mut3.2* : Amplifikation der mut3.2 Mutation über PCR (S S8996NcoI und A mut3.2 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S mut3.2 und A A9383Xba/StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S S8996NcoI und A9383Xba/StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NheI/ StuI (0,5kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/StuI x NheI/StuI (4kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-mut3.3* : Amplifikation der mut3.3 Mutation über PCR (S S8996NcoI und A mut3.3 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S mut3.3 und A A9383Xba/StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S S8996NcoI und A9383Xba/StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NheI/ StuI (0,5kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/StuI x NheI/StuI (4kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-2* : Amplifikation der mut3.1-2 Mutation über PCR (S S8996NcoI und A mut3.2 auf pBSK-8499-9605HCV-mut3.1 [PCR-1]; S mut3.2 und A A9383Xba/StuI auf pBSK-8499-9605HCV-mut3.1 [PCR-2]; S S8996NcoI und A9383Xba/StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NheI/ StuI (0,5kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/StuI x NheI/StuI (4kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3* : Amplifikation der mut3.1-3 Mutation über PCR (S S8996NcoI und A mut3.3 auf pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-2 [PCR-1]; S mut3.3 und A A9383Xba/StuI auf pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-2 [PCR-2]; S S8996NcoI und A9383Xba/StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NheI/ StuI (0,5kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/StuI x NheI/StuI (4kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-dup3.1-3* : Amplifikation der dup3.1-3 Mutation über PCR (S3.1Xba und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1); Ligation PCR x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/StuI x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3* : Amplifikation der ins3.1-3 Mutation über PCR (S3.1Xba und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1); Ligation PCR x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-ins3.2* : Ligation der hybridisierten Oligonukleotide S3.2Xba/StuI und A3.2Xba/StuI x XbaI/ StuI mit *pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3* x XbaI/ StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-SL-up*: Amplifikation der SL-up Mutation über PCR (S3.1Xba und ASL-up auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SSL-up und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-SL-low*: Amplifikation der SL-low Mutation über PCR (S3.1Xba und ASL-low auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SSL-low und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV- Δ SL-up-AG:CU*: Amplifikation der Δ SL-up-AG:CU Mutation über PCR (S3.1Xba und A Δ SL-up-AG:CU auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S Δ SL-up-AG:CU und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV- Δ SL-up-ACA:UGU*: Amplifikation der Δ SL-up-ACA:UGU Mutation über PCR (S3.1Xba und A Δ SL-up-ACA:UGU auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S Δ SL-up-ACA:UGU und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV-SL-low-CAG:CUG*: Amplifikation der Δ SL-low-CAG:CUG Mutation über PCR (S3.1Xba und A Δ SL-low-CAG:CUG auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S Δ SL-low-CAG:CUG und A3.3StuI auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3StuI auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)
- pBSK-8499-9605HCV- Δ bulge-UGC*: Amplifikation der Δ bulge-UGC Mutation über PCR (S3.1Xba und A Δ bulge-UGC auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S Δ bulge-UGC und A3.3StuI auf

pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-Δloop-CACAG: Amplifikation der Δloop-CACAG Mutation über PCR (S3.1Xba und AΔloop-CACAG auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SΔloop-CACAG und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-Δloop-UAUUAU: Amplifikation der Δloop-UAUUAU Mutation über PCR (S3.1Xba und AΔloop-UAUUAU auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SΔloop-UAUUAU und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-loop-AG: Amplifikation der loop-AG Mutation über PCR (S3.1Xba und Aloop-AG auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; Sloop-AG und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-loop-ACG: Amplifikation der loop-ACG Mutation über PCR (S3.1Xba und Aloop-ACG auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; Sloop-ACG und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-loop-AGG: Amplifikation der loop-AGG Mutation über PCR (S3.1Xba und Aloop-AGG auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; Sloop-AGG und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-5B3.2x: Amplifikation der 5B3.2x Mutation über PCR (S3.1Xba und A5B3.2x auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S5B3.2x und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-XT-x: Amplifikation der XT-x Mutation über PCR (SXba/Stu und AXT-x auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SXT-x und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; SXba/Stu und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 x StuI/ SpeI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-5B1+1: Amplifikation der 5B1+1 Mutation über PCR (S3.1Xba und A5B1+1 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S5B1+1 und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-5B1+2: Amplifikation der 5B1+2 Mutation über PCR (S3.1Xba und A5B1+2 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S5B1+2 und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-5B2+1: Amplifikation der 5B2+1 Mutation über PCR (S3.1Xba und A5B2+1 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S5B2+1 und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-XT1+1: Amplifikation der XT1+1 Mutation über PCR (SXba/Stu und AXT1+1 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SXT1+1 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; SXba/Stu und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 x StuI/ SpeI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-XT1+2: Amplifikation der XT1+2 Mutation über PCR (SXba/Stu und AXT1+2 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SXT1+2 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1

[PCR-2]; SXba/Stu und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 x StuI/ SpeI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-XT2+1: Amplifikation der XT2+1 Mutation über PCR (SXba/Stu und AXT2+1 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SXT2+1 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; SXba/Stu und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 x StuI/ SpeI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-5BN: Amplifikation der 5BN Mutation über PCR (S3.1Xba und A5BN auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S5BN und A3.3Stu auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S3.1Xba und A3.3Stu auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XbaI/ StuI (0,15kb) in pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 x XbaI/ StuI (4,5kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-XTN: Amplifikation der XTN Mutation über PCR (SXba/Stu und AXTN auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; SXTN und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; SXba/Stu und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x StuI/ SpeI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 x StuI/ SpeI (4,5kb-Fragment)

pUCNS3-5B/Δ-ISDR: Klonierungszwischenkonstrukt; besitzt die kodierende Sequenz von NS3 bis NS5A mit einem Austausch der Nukleotide an Position 6964 bis 7104 durch eine „Linkersequenz“ mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsschnitstellen XbaI und PmeI.

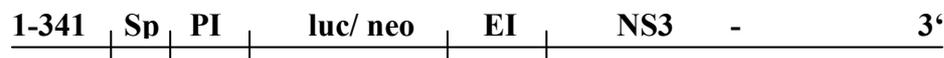
pUC NS3-5B/Δ-ISDR+3.2: Anealing der Oligonukleotide SL3.2Xba und SL3.2Pme (Insert); Ligation des Inserts x XbaI/ PmeI in pUCNS3-5B/Δ-ISDR x XbaI/ PmeI (6kb-Fragment)

pUC NS3-5B/Δ-ISDR+3.1-3: Amplifikation der +3.1-3 Mutation über PCR (S3.1Xba; A3.3Pme; pFK1-9605Con1) x XbaI/ PmeI ligiert in pUCNS3-5B/Δ-ISDR x XbaI/ PmeI (6kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-SL8835: Amplifikation der SL8835 Mutation über PCR (S 8492Xho/Sfi und A SL8835 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S SL8835 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S 8492Xho/Sfi und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x NsiI/ NcoI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu x NsiI/ NcoI (4,2kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-SL8578: Amplifikation der SL8578 Mutation über PCR (S 8492Xho/Sfi und A SL8578 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S SL8578 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S 8492Xho/Sfi und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x SfiI/ NsiI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu x SfiI/ NsiI (4,2kb-Fragment)

pBSK-8499-9605HCV-8544: Amplifikation der 8544 Mutation über PCR (S 8492Xho/Sfi und A 8544 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S 8544 und A9605Sca/Spe auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S 8492Xho/Sfi und A9605Sca/Spe auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x SfiI/ NsiI (0,2kb) in pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu x SfiI/ NsiI (4,2kb-Fragment)



pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-Xba/Stu(Abb. 31=wt): Ligation des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-Xba/Stu in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-PI-mut3.1 (**pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-mut3.1**; Abb. 31): Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

- pFK-PI-mut3.2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.2; Abb. 31):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.2 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-mut3.3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.3; Abb. 31):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.3 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-mut3.1-2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-2; Abb. 31):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-2 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-mut3.1-3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3; Abb. 31):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-dup3.1-3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-dup3.1-3; Abb. 36):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-dup3.1-3 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-ins3.1-3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-ins3.1-3; Abb. 36):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-ins3.2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-ins3.2; Abb. 36):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ins3.2 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-SL-up (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-SL-up; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-SL-up in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-SL-low (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-SL-low; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-SL-low in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-ΔSL-up-AG:CU (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-ΔSL-up-AG:CU; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ΔSL-up-AG:CU in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-ΔSL-up-ACA:UGU (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-ΔSL-up-ACA:UGU; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ΔSL-up-ACA:UGU in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-SL-low-CAG:CUG (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-SL-low-CAG:CUG; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-SL-low-CAG:CUG in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-PI-Δbulge-UGC (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-Δbulge-UGC; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δbulge-UGC in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-Δloop-CACAG (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-Δloop-CACAG; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δloop-CACAG in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-Δloop-UAUUAU (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-Δloop-UAUUAU; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-Δloop-UAUUAU in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-loop-AG (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-loop-AG; Abb. 38):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-loop-AG in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

- pFK-PI-loop-ACG (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-loop-ACG; Abb. 38):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-loop-ACG in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-loop-AGG (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-loop-AGG; Abb. 38):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-loop-AGG in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5B3.2x (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5B3.2x; Abb. 40):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B3.2x in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-XT-x (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-XT-x; Abb. 40):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-XT-x in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5B3.2x+XT-x (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5B3.2-x+XT-x; Abb. 40):** Ligation SfiI- StuI-Fragment (1KB-Fragment ; Insert 1) aus pBSK-8499-9605HCV-5B3.2x und StuI/ SpeI-Fragment aus pBSK-8499-9605HCV-XT-x (0,2kb-Fragment ; Insert 2) in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5B1+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5B1+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B1+1 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5B1+2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5B1+2; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B1+2 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5B2+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5B2+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B2+1 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-XT1+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-XT1+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-XT1+1 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-XT1+2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-XT1+2; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-XT1+2 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-XT2+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-XT2+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-XT2+1 in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5BXT1+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5BXT1+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- StuI-Fragment (1KB-Fragment ; Insert 1) aus pBSK-8499-9605HCV-5B1+1 und StuI/ SpeI-Fragment aus pBSK-8499-9605HCV-XT1+1 (0,2kb-Fragment ; Insert 2) in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5BXT1+2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5BXT1+2; Abb. 41):** Ligation SfiI- StuI-Fragment (1KB-Fragment ; Insert 1) aus pBSK-8499-9605HCV-5B1+2 und StuI/ SpeI-Fragment aus pBSK-8499-9605HCV-XT1+2 (0,2kb-Fragment ; Insert 2) in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5BXT2+1 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5BXT2+1; Abb. 41):** Ligation SfiI- StuI-Fragment (1KB-Fragment ; Insert 1) aus pBSK-8499-9605HCV-5B2+1 und StuI/ SpeI-Fragment aus pBSK-8499-9605HCV-XT2+1 (0,2kb-Fragment ; Insert 2) in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

- pFK-PI-5B-N (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5BN; Abb. 42):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5BN in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-XT-N (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-XTN; Abb. 42):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-XTN in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-5BXT-N (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-5BXTN; Abb. 42):** Ligation SfiI-StuI-Fragment (1KB-Fragment ; Insert 1) aus pBSK-8499-9605HCV-5BN und StuI/ SpeI-Fragment aus pBSK-8499-9605HCV-XTN (0,2kb-Fragment ; Insert 2) in pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-mut3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-lucubi/dup3.1-3 (pFK-341-sp-PVI-lucUbiMyc-shiftEI3420-9605/ET; Abb. 32):** Replikon mit einer Duplikation der NS5BSL3.1-3 (Nukleotide 9128 bis 9383; mit einer Deletion des Nukleotids an Position 9192) “upstream” der EMCV-IRES
- pFK-PI-lucubi/ins3.1-3 (pFK-341-sp-PVI-lucUbiMyc-shiftEI3420-9605/ET-ins3.1-3; Abb. 32):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 in pFK-PI-lucubi/dup3.1-3 x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)
- pFK-PI-ΔISDR (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T-ΔISDR; Abb. 34):** Ligation EcoRI/ XhoI-Fragment aus pUCNS3-5B/Δ-ISDR und NotI/ XhoI-Fragment sowie EcoRI/ NotI – Fragment aus pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T.
- pFK-PI-ΔISDR/dup3.2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T-ΔISDR/dup3.2; Abb. 34):** Ligation EcoRI/ XhoI-Fragment aus pUCNS3-5B/Δ-ISDR+3.2 und NotI/ XhoI-Fragment sowie EcoRI/ NotI – Fragment aus pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T.
- pFK-PI-ΔISDR/dup3.1-3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T-ΔISDR/dup3.1-3; Abb. 34):** Ligation EcoRI/ XhoI-Fragment aus pUCNS3-5B/Δ-ISDR+3.1-3 und NotI/ XhoI-Fragment sowie EcoRI/ NotI – Fragment aus pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T.
- pFK-PI-ΔISDR/mut3.1-3 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/T-ΔISDR/mut3.1-3; Abb. 34):** Ligation SfiI/ SpeI-Fragmen aus pFK-PI-mut3.1-3 in pFK-PI-ΔISDR x SfiI/ SpeI
- pFK-PI-ΔISDR/ins3.2 (pFK-341-sp-PVIucEI3420-9605/ET-ΔISDR/ins3.2; Abb. 34):** Ligation SfiI/ SpeI-Fragmen aus pFK-PI-mut3.1-3 in pFK-PI-ΔISDR/dup3.2 x SfiI/ SpeI
- pFK-HI-mut3.1-3 (pFK1-389LucEI3420-9605/ET-mut3.1-3; Abb. 44):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 in pFK1-389LucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-HI-ins3.1-3 (pFK1-389LucEI3420-9605/ET-ins3.1-3; Abb. 44):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 in pFK1-389LucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-HI-5B3.2x + XT-x (pFK1-389LucEI3420-9605/ET-5B3.2x + XT-x; Abb. 44):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B3.2x + XT-x in pFK1-389LucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-mono-mut3.1-3 (pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET-mut3.1-3; Abb. 44):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-mut3.1-3 in pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-mono-ins3.1-3 (pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET-ins3.1-3; Abb. 44):** Ligation SfiI-SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-ins3.1-3 in pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-mono-5B3.2x + XT-x (pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET-5B3.2x + XT-x; Abb. 44):** Ligation SfiI- SpeI-Fragment (1,1KB) aus pBSK-8499-9605HCV-5B3.2x + XT-x in pFK1-389Luc-ubi-3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 5,1kb)
- pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL8835(Abb. 29):** Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL8835 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL8578(Abb. 29): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-SL8578 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-SL6778(Abb. 29): Amplifikation der SL6778 Mutation über PCR (S 6800 und A SL6778 auf pFK1-9605Con1 [PCR-1]; S SL6778 und A 7700 auf pFK1-9605Con1 [PCR-2]; S 6800 und A 7700 auf PCR-1 + -2 [PCR-3]); Ligation PCR-3 x XhoI/ BclI (0,5kb-Fragment) in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x XhoI/ BclI (12kb-Fragment)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-8544(Abb. 29): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-8544 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-mut8544(Abb. 29): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pBSK-8499-9605HCV-8544 in pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

pFK-341mut95-110-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-mut8544(Abb. 29): Ligation des des SfiI-SpeI-Fragments aus pFK-341-sp-PVI-lucEI3420-9605/ET-mut8544 in pFK-341mut95-110-PVI-lucEI3420-9605/ET x SfiI/ SpeI (Sfi-Sfi-Fragment 4,9kb; Spe-Sfi-Fragment 6kb)

8. Publikationen

Friebe, P., V. Lohmann, N. Krieger, and R. Bartenschlager. 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* 75:12047-12057.

Friebe, P. und R. Bartenschlager. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76:5326-38.

Moradpour, D., Bras, V., Bieck, E., Friebe, P., Gosert, R., Blum, H., Bartenschlager, R., Penin, F., and Volker Lohmann. 2004. Membrane association of the RNA-Dependent RNA Polymerase is essential for hepatitis C virus replication. *J. Virol* 78: 13278-13284.

Friebe, P., Boudet J., Simorre J.-P., and R. Bartenschlager. 2004. A kissing loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. In press.