

Klonierung und Charakterisierung eines
Konsensusgenoms des Hepatitis C Virus als Grundlage
der Etablierung eines Zellkultursystems

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg – Universität
Mainz

Frank Körner
geboren in Duisburg

Tag der Prüfung: 06.11.2001

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>1</i>
1 Einleitung	4
1.1 Virale Hepatitiden	4
1.2 Hepatitis A Virus (HAV)	4
1.3 Hepatitis B Virus (HBV)	4
1.4 Hepatitis C Virus (HCV)	5
1.5 Hepatitis D Virus (HDV)	6
1.6 Hepatitis E Virus (HEV)	6
1.7 Das Hepatitis C Virus	8
1.7.1 Medizinische Bedeutung	8
1.7.2 Morphologie und Genomorganisation	9
1.7.3 Eigenschaften der HCV-Proteine	11
1.7.4 Verwandte Viren	13
1.7.5 Der hypothetische Replikationszyklus des HCV	14
1.7.6 Genotypen und Varianz	16
1.8 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Patientenmaterial	19
2.2 Zellen	19
2.2.1 Säugerzellen	19
2.2.2 Insektenzellen	19
2.2.3 Bakterienstämme	19
2.2.4 Viren	19
2.3 Puffer und Lösungen	20
2.4 Kulturmedien	21
2.4.1 Bakterien	21
2.4.2 Säugerzellen	21
2.4.3 Insektenzellen	21
2.5 Antiseren	21
2.6 Oligonukleotide	22
2.7 Vektoren	22
2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren	23
2.8.1 Extraktionen	23
2.8.2 Fällungen	23
2.8.3 Kompetenzinduktion und Transformation von E. coli	23
2.8.4 Plasmid-Präparation aus Kleinkulturen	24
2.8.5 Plasmid-Präparation aus Großkulturen	24
2.8.6 Präparation von DNA aus HuH-7 Zellen	25
2.8.7 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.8.8 Southern-Transfer	25
2.8.9 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	26
2.8.10 Northern-Transfer	26
2.8.11 Präparation von DNA und RNA aus Agarosegelen	27
2.8.12 Restriktion	27
2.8.13 Ligation	27
2.8.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27

2.8.15	DNA-Sequenzierung	28
2.8.16	Präparation von Gesamt-RNA	29
2.8.17	Reverse Transkription von RNA mit anschließender Amplifikation der cDNA (RT-PCR)	29
2.8.18	„Long-distance RT-PCR“	30
2.8.19	In-vitro Transkription	31
2.8.20	Reinigung von Transkriptionsreaktionen	31
2.8.21	Transfektion eukaryontischer Zellen	32
2.9	Arbeiten mit Proteinen	33
2.9.1	In-vitro Translation	33
2.9.2	Das Vacciniavirus T7-Proteinexpressionssystem	33
2.9.3	Immunpräzipitation	33
2.9.4	Proteinexpression mit dem Baculovirus-System	33
2.9.5	Proteinquantifizierung nach Lowry	34
2.9.6	Reinigung von NS5B aus Bakulovirus infizierten Zellen	34
2.9.7	Funktionstest für die RNA-abhängige RNA-Polymerase Aktivität (RaRP) von NS5B	35
2.9.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.9.9	Western-Transfer	35
2.9.10	Immunfluoreszenz	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Das Konzept des in vitro Replikationssystems	37
3.1.1	Das Prinzip der strangspezifischen RT-PCR	39
3.1.2	Etablierung des RNA-Minusstrangnachweises	41
3.2	Klonierung des HCV-Vollängengenoms RB01	43
3.2.1	Konstruktion der Klonierungsvektoren pBT3 und pBT37	44
3.2.2	Insertion des RB01-Genoms in den Vektor pBT	46
3.3	Transfektion in vitro transkribierter Vollängen-Genome	47
3.3.1	In vitro Transkription und Aufreinigung der in vitro RNAs	47
3.3.2	Transfektion von HuH7 und BHK Zellen mit Vollängen in vitro RNAs	48
3.4	Reklonierung des HCV-Genoms	49
3.4.1	Konzept zur Reklonierung des HCV-Genoms mit "Korrekturlese"-Polymerasen	50
3.4.2	Nachweis von HCV-RNA in Patientenseren mittels RT-PCR mit "Korrekturlese"-Polymerasen	51
3.4.3	Test der Klonierungsprimer	52
3.4.4	Klonierung des Hepatitis-C Virusgenoms aus Lebergewebe des Patienten H01 mittels "Long-distance RT-PCR"	55
3.4.5	Ermittlung der isolatspezifischen Konsensussequenz und Vergleich mit der RB01 Sequenz	59
3.4.6	Strategie zur Klonierung des authentischen K1-Konsensusgenoms	64
3.4.7	Konstruktion des Klonierungsvektors pFK	65
3.4.8	Konstruktion des Konsensusgenoms	66
3.5	Expression des Konsensusgenoms	68
3.5.1	Die IRES-Aktivität des K1-Genoms ist deutlich erhöht	68
3.5.2	Expression des vollständigen Polyproteins in Zellkultur und Untersuchung der Polyproteinreifung	69
3.5.3	Das E2 Protein der K1 Sequenz besitzt eine zusätzliche funktionelle Glykosylierungsstelle	71
3.5.4	Das NS5A Protein der Konsensussequenz ist hyperphosphoryliert	73
3.6	Transfektion des in vitro transkribierten Konsensusgenoms in HuH-7 Zellen und Nachweis der Replikationskompetenz	75
3.7	Konstruktion selektionierbarer Replikons	78
3.8	Transfektion der Replikon in vitro Transkripte in HuH-7 Zellen	80
3.9	Reklonierung des Replikons aus Zelllinie 9-13	84
4	Diskussion	86
4.1	Strategien für ein HCV-Zellkultursystem	86

4.2	Der Replikationsnachweis	88
4.2.1	Strangspezifische RT-PCR	89
4.3	Die Vollängensequenz NK1 (RB01)	91
4.4	Reklonierung des HCV-Genoms	93
4.5	Selektionierbare Replikons als Alternative zur Transfektion von Vollängen- Genomen	96
4.6	Fazit und Ausblick	99
5	Anhang	101
5.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des HCV-Konsensusgenoms K1	101
5.2	Plasmidkonstrukte	111
5.3	Abkürzungen	114
6	Literatur	116
7	Lebenslauf	125
	Familienstand: ledig	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8	Veröffentlichungen	126
9	Zusammenfassung	127

1 Einleitung

1.1 Virale Hepatitiden

Virale Hepatitiden gehören weltweit zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Typische Symptome dieser auch als Gelbsucht bezeichneten Krankheit sind Übelkeit, Schmerzen am rechten Oberbauch und Ikterus. Einige Hepatitiden können als Begleiterscheinungen verschiedener Virusinfektionen auftreten (Epstein-Barr Virus, Zytomegalie Virus, Herpes Simplex Virus, hämorrhagische Fieber Viren, seltener Mumps Virus und Enteroviren). Als Verursacher primärer Virushepatitiden gelten heute 5 verschiedene Viren, deren Gemeinsamkeit ein primärer Hepatotropismus sowie eine weitestgehend auf die Leber beschränkte Erkrankung sind. Die einzelnen Erreger sind nach den Buchstaben des Alphabets von A bis E benannt was im wesentlichen der zeitlichen Reihenfolge ihrer Beschreibung entspricht. In den folgenden Absätzen werden die bisher bekannten Erreger viraler Hepatitiden vorgestellt (zur Übersicht siehe Bradley, 1993 sowie Mast und Alter, 1993).

1.2 Hepatitis A Virus (HAV)

Das Hepatitis A Virus wird auf fäkal-oralem Weg durch direkten Kontakt mit den Ausscheidungen erkrankter Personen oder durch fäkal kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel übertragen. Es wurde 1973 aus dem Stuhl eines an akuter Hepatitis erkrankten Patienten isoliert (Feinstone *et al.*, 1973) und mittels Immun-Elektronenmikroskopie nachgewiesen. HAV verursacht eine akute Hepatitis, die aber aufgrund einer effektiven Immunantwort nicht chronisch wird und eine lebenslange Immunität zur Folge hat. Das 28 nm kleine Virus ist der Familie der Picornaviren zugeordnet. Sein 7,5 kb langes Plusstrang-RNA Genom besitzt ein offenes Leseraster und codiert ein 2235 Aminosäuren langes Polyprotein, das posttranslational in reife Virusproteine gespalten wird (Lemon und Robertson, 1993).

1.3 Hepatitis B Virus (HBV)

Seit den 60'er Jahren war neben der durch HAV verursachten "infektiösen Hepatitis" ein weiterer Erreger bekannt, der parenteral übertragen und als Erreger der "Serum Hepatitis" bezeichnet wurde. Die Entdeckung des HBV begann mit der Identifikation des für die parenteral übertragene Hepatitis verantwortlichen Antigens im Blut australischer Ureinwohner. Im Blut von Patienten, die mit diesem sogenannten "Australia Antigen" infiziert waren, konnten elektronenmikroskopisch 20-22 nm große Partikel und in geringerer Zahl 42 nm große Partikel nachgewiesen werden (Dane *et al.*, 1970). Die nach ihrem Entdecker als "Dane-Partikel" bezeichneten 42

nm großen Strukturen erwiesen sich als Erreger der parenteral übertragenen Hepatitis und werden heute als Hepatitis B Virus bezeichnet (Bradley, 1993).

Das zur Familie der Hepadnaviren gehörende HBV ist eine der Hauptursachen akuter und chronischer Hepatitis und assoziiert mit den Komplikationen der Leberzirrhose sowie des Leberkarzinoms. Es wird geschätzt, daß weltweit zwischen 300 und 350 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert sind. Das Risiko nach HBV-Infektion an chronischer Hepatitis zu erkranken ist umgekehrt proportional zum Alter der infizierten Person. Liegt es bei einer Infektion während der Geburt bei 90%, so sinkt es auf 5-10% bei älteren Kindern und Erwachsenen. Seit 1986 existieren gentechnisch hergestellte Impfstoffe, die auf rekombinantem Virusprotein (HBsAG) basieren und eine langanhaltende Immunität verleihen. Das HBV Genom besteht aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA und stellt mit 3,2 kb Länge eines der kleinsten Genome unter den Viren dar. Es codiert mindestens 4 verschiedene Proteine: S (Hauptprotein, das in drei verschiedenen Formen auf der Oberfläche vorkommt), C (Core-Protein), P (DNA-Polymerase/Reverse Transkriptase) und X (vermutlich ein Transaktivator). Als Replikationsintermediat dient eine RNA, die durch die virale reverse Transkriptase synthetisiert wird.

1.4 Hepatitis C Virus (HCV)

Nachdem diagnostische Nachweisverfahren für HAV und HBV etabliert waren, stellte sich Mitte der 70'er Jahre heraus, daß es neben diesen beiden Viren noch andere, unbekannte Agentien gab, die eine sogenannte "non-A non-B Hepatitis" (NANBH) verursachten (Prince *et al.*, 1974; Feinstone *et al.*, 1975). Dabei mußte es mindestens einen unbekanntem Erreger für eine enteral sowie einen für eine parenteral übertragene Hepatitis geben. Die Suche nach dem Erreger der parenteral übertragenen NANBH erwies sich viel schwieriger als erwartet, da im Blut infizierter Personen nur extrem geringe Mengen des Virus vorhanden waren. Die Identifikation des Virus gelang deshalb erst Ende der 80'er Jahre mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden. Aus einer großen Menge hochtitrigen Serums von experimentell infizierten Schimpansen wurde eine cDNA-Bank erstellt. Mit Hilfe eines "blinden" immunologischen Suchverfahrens gelang es das Genom eines bis dahin unbekanntem Virus zu klonieren (Choo *et al.*, 1989). Auf der Basis rekombinanter Virusproteine entwickelte diagnostische Tests bestätigten bald, daß das Virus die Hauptursache der transfusions-assoziierten NANBH darstellte (Kuo *et al.*, 1989). Der Hepatitis C Virus genannte Erreger war damit das erste infektiöse Agens, dessen Genom kloniert werden konnte, bevor seine elektronenmikroskopische Darstellung gelang. Für weitergehende Informationen zum HCV siehe 1.7 ff.

1.5 Hepatitis D Virus (HDV)

Im Jahre 1977 wurde ein neues mit HBV-assoziiertes Antigen im Blut chronisch HBV-infizierter Patienten nachgewiesen (Rizzetto *et al.*, 1977). Dieses Antigen konnte später einem bis dahin unbekanntem Erreger zugeordnet werden, der den Namen Hepatitis Delta Virus (HDV) erhielt. HDV ist ein Virusoid, das selbst nicht genügend genetische Information enthält, um für ein eigenes Hüllprotein zu codieren und deshalb nicht autonom replizieren kann. Es ist bei seiner Vermehrung auf ein Helfervirus, das HBV angewiesen, das die Virushüllproteine zur Verfügung stellt. Eine Infektion mit HBV ist deshalb eine unabdingbare Voraussetzung für eine produktive HDV-Infektion. Bei einer simultanen Infektion mit HBV und HDV scheint der akute Verlauf schwerer zu sein, als bei einer alleinigen HBV-Infektion. Eine chronische Hepatitis scheint dafür aber seltener aufzutreten. Chronische HBV-Träger, die zusätzlich mit HDV superinfiziert werden, erkranken mit hoher Wahrscheinlichkeit (70-80%) an einer chronischen Hepatitis. Die Übertragungswege des HDV sind denen des HBV ähnlich, allerdings kommt eine sexuelle Übertragung eher selten vor. Eine Immunität gegen HBV-Infektion vermittelt auch Schutz vor HDV-Infektion. Das Genom des HDV besteht aus einer 1,7 kb langen, zirkulären Minusstrang-RNA. Aufgrund ihrer hohen internen Komplementarität bilden 70% der RNA einen intramolekularen Doppelstrang aus.

1.6 Hepatitis E Virus (HEV)

1990 gelang es das Genom des Erregers der enteralen Form der NANBH zu klonieren (Reyes *et al.*, 1990). Mit Hilfe der Sequenz ließ sich das Virus der Familie der Calciviren zuordnen. Das vor allem durch fäkal kontaminiertes Trinkwasser übertragene Virus verursacht immer wieder lokale Epidemien in Entwicklungsländern. Besonders auffällig ist dabei die hohe Mortalitätsrate von infizierten schwangeren Frauen, die zwischen 15 und 20% liegt. Ein Impfstoff gegen das HEV steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung. Das 34 nm große nicht-umhüllte Virus besitzt ein einzelsträngiges, polyadenyliertes Plusstrang-RNA Genom einer Länge von 7,5 kb. Das Genom verfügt über drei offene Leseraster, die für mindestens 8 verschiedene Proteine codieren.

Virus	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	HGV(?)
Familie	Picorna	Hepadna	Flavi	Viroid	Calici	Flavi*
Größe [nm]	28	45	60	36	34	<100
Genomtyp	RNA+	ds/ss DNAc ¹	RNA+	RNAc- ²	RNA+	RNA+
Genomgröße	7,8 kB	3,2 kB	9,6 kB	1,7 kB	7,5 kB	9,5 kB
Virushülle	nein	ja	ja	ja	nein	ja
Übertragung	fäkal-oral	parenteral	parenteral	parenteral	fäkal-oral	parenteral
Persistenz	nein	ja	ja	ja	nein	ja
fulminante Hepatitis	selten	selten	selten	häufig	bei Schwangeren	?
chronische Hepatitis	nie	oft	sehr oft	sehr oft	nie	?
Onkogenität	nein	ja	ja	ja	nein	?
Therapie	nein	Interferon- α ; 3TC; Lamivudin	Kombination: Interferon- α + Ribavirin	Interferon- α	nein	nein
Vakzine	inaktivierte Viren	rekombinantes HBsAg	nein	nein siehe HBV	nein	nein
Diagnose	Ag/Ak/NS	Ag/Ak/NS	-/Ak/NS	Ag/Ak/NS	Ag/Ak/NS	-/Ak/NS

Tabelle 1-1: Übersicht biologischer und klinischer Eigenschaften humaner Hepatitis Viren (modifiziert nach Bradley, 1990). RNA+, Plusstrang-RNA; RNA-, Minusstrang-RNA; RNAc-, zirkuläre Minusstrang-RNA; ds/ss DNAc, zirkuläre partiell doppel- und einzelsträngige DNA.

* Endgültige Klassifikation steht noch aus.

¹ Replikationszyklus beinhaltet eine reverse Transkription; das virale Genom im Nukleokapsid ist eine DNA

² zirkuläre Minusstrang-RNA

Ag, Antigen; Ak, Antikörper; NS, Nukleinsäure; HBsAG, Membranprotein des HBV; ddI, Didesoxyinosin.

Obwohl mittlerweile 5 vollkommen verschiedene humane Hepatitisviren isoliert, charakterisiert und kloniert sind, gibt es immer noch einige Fälle von akuter und chronischer Hepatitis, die auf keinen der bekannten hepatotropen Viren zurückgeführt werden. Das erste in diesem Zusammenhang isolierte Virus wurde Hepatitis F genannt, es entpuppte sich im Nachhinein allerdings als Laborartefakt (Deka *et al.*, 1994). 1996 klonierten unabhängig voneinander mehrere Arbeitsgruppen Erreger aus afrikanischen und amerikanischen Hepatitis-Patienten. Die betreffenden Viren GBV-C (Erker *et al.*, 1996; Leary *et al.*, 1996) bzw. Hepatitis G Virus (Linnen *et al.*, 1996) erwiesen sich jedoch als unabhängige Isolate desselben Virus, das heute als GBV-C/HGV bezeichnet und der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet wird. Bis heute konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem GBV-C/HGV und einer Hepatitis nachgewiesen werden, womit die Einordnung in die Gruppe der Hepatitis-Viren fraglich bleibt. Eine Zusammenfassung der bisher bekannten Hepatitis-Viren und ihrer allgemeinen Eigenschaften zuzüglich des GBV-C/HGV ist in Tabelle 1-1 gezeigt.

1.7 Das Hepatitis C Virus

1.7.1 Medizinische Bedeutung

HCV ist die Hauptursache der parenteral übertragenen non-A non-B Hepatitis (zur Übersicht: Mast und Alter, 1993; Cuthbert, 1994 und Houghton, 1996, Bartenschlager, 1997a). Die Prävalenz unter freiwilligen Blutspendern reicht von 0,4% in den USA und Großbritannien, 2% in Japan und Taiwan bis zu über 14% in Ägypten. In den Vereinigten Staaten sind 20-40% der akuten viralen Hepatitisserkrankungen der NANBH zuzuordnen wobei das HCV für mindestens 80-90% dieser Fälle verantwortlich ist. Nur etwa ein Viertel aller HCV-Infizierten zeigt die typischen Symptome einer Gelbsucht. Unabhängig davon wird die Infektion in den meisten Fällen chronisch, wobei der Infektionsverlauf unterschiedlich schwer sein kann. Etwa 20% der chronischen Fälle entwickeln nach 5-20 Jahren eine Leberzirrhose, die bei etwa 25% der Betroffenen zum Leberversagen führt. Außerdem ist die HCV-Infektion, vor allem bei Patienten mit zirrhotischem Verlauf, mit dem hohen Risiko eines hepatozellulären Karzinoms verbunden. Die mittlere Inkubationszeit beträgt in diesem Fall etwa 25 Jahre.

Aufgrund der parenteralen Übertragung des HCV gibt es eine Reihe klassischer Risikofaktoren. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Bluttransfusionen, den Gebrauch von Blutprodukten und intravenösen Drogen und Hämodialyse. 40-50% der Infektionen können mit keinem der bekannten Risikofaktoren in Zusammenhang gebracht werden. Etwa zwei Drittel dieser "sporadischen" Fälle haben einen niedrigen sozio-ökonomischen Status, der oft mit anderen Arten von Risiken einhergeht (z.B. drogenabhängige Sexualpartner). Eine sexuelle Übertragung oder eine intrauterine Übertragung von Mutter zu Kind scheinen eher selten vorzukommen.

Chronische HCV-Infektionen können bis heute nur mit Interferon- α behandelt werden. Insgesamt reagieren nur 40% der behandelten Patienten mit einem Absinken der Alanin-Aminotransferase-Werte (ALT; ein Indikator der Leberschädigung) im Serum auf Normalwerte. Unglücklicherweise erleiden 70% der Behandelten nach Absetzen der Therapie einen Rückfall, so daß nur bei etwa 25% der Patienten eine langanhaltende Normalisierung der Serum-ALT Werte zu beobachten ist (Davis *et al.*, 1989; Marcellin *et al.*, 1991). Seit kurzer Zeit wird Interferon- α in Kombination mit dem Purin-Nukleosidanalogen "Ribavirin" in der HCV-Therapie eingesetzt. Diese Kombinationstherapie läßt die Erfolgsquote, die als dauerhafte Abwesenheit viraler RNA im Serum definiert wird, auf etwa 40% steigen (Di Bisceglie *et al.*, 1992; Kakumu *et al.*, 1993; Reichard *et al.*, 1993; Koskinas *et al.*, 1995; Lai *et al.*, 1996). Aufgrund der noch immer vergleichsweise niedrigen Erfolgsquote der aktuellen Therapieformen,

die mit schweren Nebenwirkungen einhergehen können sowie der hohen Anzahl erkrankter Personen besteht ein dringender Bedarf für die Entwicklung wirksamer antiviraler Medikamente.

1.7.2 Morphologie und Genomorganisation

Die Erforschung des HCV wurde seit jeher durch niedrige Virustiter in infektiösen Seren, die geringen Mengen an exprimiertem Virusprotein in infizierten Geweben, sowie dem Fehlen geeigneter Zellkultursysteme und Tiermodelle (Schimpansen sind zur Zeit die einzigen infizierbaren Versuchstiere) behindert. Deshalb stammt ein Großteil unseres heutigen Wissens über Virusstruktur, Genomorganisation und die Funktion viraler Proteine aus einigen wenigen experimentellen Infektionen von Schimpansen, der Sequenzanalyse klonierter cDNAs, der Analyse rekombinanter HCV-Proteine und dem Vergleich mit nahe verwandten Viren.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß der Durchmesser der umhüllten Viruspartikel 50-60 nm beträgt (Kaito *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1996). Die relative Dichte der Partikel ist 1,03-1,1 g/ml (Bradley *et al.*, 1991). Zusätzlich wurden Partikel geringerer und höherer Dichte nachgewiesen, die Komplexen mit zellulären Lipoproteinen bzw. Immunglobulinen entsprechen (Miyamoto *et al.*, 1992, Thomssen *et al.*, 1992,1993, Hijikata *et al.*, 1993a, Choo *et al.*, 1995).

Die beiden Glykoproteine E1 und E2 sind als Heterodimere in die Virushülle eingelagert (Ralston *et al.*, 1993; Dubuisson *et al.*, 1994). Innerhalb der Lipidhülle befindet sich sehr wahrscheinlich das aus vielen Kopien des Core-Proteins zusammengesetzte Nukleokapsid (Matsumoto *et al.*, 1996), welches das virale Genom umschließt. Das etwa 9600 Nukleotide lange, einzelsträngige Plusstrang-RNA Genom des HCV besitzt ein einziges offenes Leseraster, das je nach Isolat ein Polyprotein von 3010-3030 Aminosäuren codiert. 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTRs) flankieren das Leseraster. Beide NTRs besitzen ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstrukturen, die sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Funktion dieser Sequenzen spielen. Die etwa 340 Nukleotide lange 5'-NTR enthält eine "interne Ribosomen Eintrittsstelle" (IRES) die die Bindung von Ribosomen in direkter Nähe des Start-Codons des offenen Leserasters erlaubt und damit eine Cap-unabhängige Initiation der Translation des RNA-Genoms ermöglicht (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993, 1995; Rijnbrand *et al.*, 1995; Fukushi *et al.*, 1997). Der funktionelle Teil der IRES umfaßt die Nukleotide 44-354 und überlappt mit den ersten 13 codierten Basen des Core-Proteins. Der vordere etwa 45 Nukleotide lange Bereich des Genoms wird nicht für die Translation benötigt. In Analogie zu anderen Plusstrang-RNA Viren spielt dieser Bereich aber sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der RNA-Replikation. Länge und Sequenz der 3'-NTR waren lange Zeit unklar. Wurde zu Beginn

der Arbeiten noch angenommen, daß die 3'-NTR des HCV aus 40 Nukleotiden, gefolgt von einer poly-U Sequenz variabler Länge bestand (5-100 Nukleotide), ergaben neuere Untersuchungen ein anderes Bild. Zwei Arbeitsgruppen gelang es unabhängig voneinander zusätzliche Sequenzen am 3'-Ende des Genoms zu identifizieren (Tanaka *et al.*, 1995, 1996; Kolykhalov *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Untersuchungen konnte eine Gesamtlänge der 3'-NTR von etwa 230 Nukleotiden bestimmt werden. Die 3'-NTR läßt sich in mehrere Regionen einteilen. Nach dem Stop-Codon folgt ein etwa 30 Nukleotide langer Bereich, der zwischen den einzelnen Genotypen variabel sein kann, gefolgt von einem poly-U Bereich variabler Länge sowie einer "C(U)n-Repeat" Region. Es schließt sich eine hochkonservierte 98 Nukleotide lange Sequenz an, die das 3'-Ende des Genoms bildet. Es konnte gezeigt werden, daß die 3'-NTR eine wichtige Rolle bei der Replikation des Virusgenoms spielt (Janagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000).

Im aminoterminalen Bereich des Polyproteins befinden sich die Strukturproteine des Virus, carboxyterminal davon liegen die Nichtstrukturproteine. Die viralen Proteine sind innerhalb des Polyproteins wie folgt organisiert: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Hijikata *et al.*, 1991; Grakoui *et al.*, 1993a; Selby *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994a; Mizushima *et al.*, 1994). Die viralen Strukturproteine werden co- und posttranslational durch zelluläre Signal-Peptidasen vom Polyprotein abgespalten. Eine Spaltung erfolgt dabei zwischen C/E1, E1/E2, E2/p7 und p7/NS2. Dabei treten Zwischenprodukte wie das E2-p7-NS2 auf, die vergleichsweise langsam prozessiert werden. Alle Nichtstrukturproteine werden von zwei viralen Proteasen abgespalten. Die NS2-3 Protease spaltet zwischen NS2 und NS3, die NS3 Protease zwischen NS3 und NS4A, NS4A und NS4B, NS4B und NS5A sowie NS5A und NS5B.

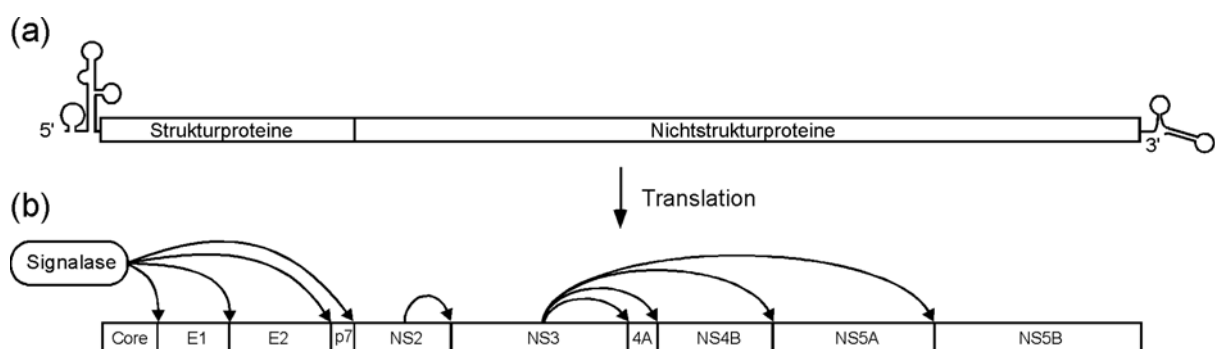


Abbildung 1-1: (a) Schematische Darstellung des HCV-Genoms mit 5' NTR, dem offenen Leseraster, das die Struktur- und Nichtstrukturproteine codiert, sowie der 3' NTR. Vorhergesagte Sekundärstrukturen innerhalb der NTRs sind angedeutet. (b) Schematische Darstellung des Polyproteins und seiner Prozessierung durch zelluläre Signalase und virale Proteasen (verändert nach Bartenschlager, 1997a).

1.7.3 Eigenschaften der HCV-Proteine

Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten Eigenschaften der einzelnen HCV-Proteine kurz zusammengefaßt (zur Übersicht: Bartenschlager und Lohmann, 2000; Major und Feinstone, 1997).

Die ersten 191 Aminosäuren des HCV-Polyproteins entsprechen dem Core-Protein, der vermuteten Hauptkomponente des Nukleokapsids. Das basische Protein ist in der Lage an RNA zu binden, was seiner vermuteten Funktion als Bestandteil des Nukleokapsids entspricht (Santolini *et al.*, 1994). Neben seiner Funktion als Strukturprotein scheint Core auch eine Rolle bei der Modulation zellulärer Prozesse sowie der Pathogenese zu spielen. So interagiert das Protein direkt mit dem Lymphotoxin- β Rezeptor oder kann hepatozelluläre Karzinome in transgenen Mäusen verursachen (Chen *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1997; Moriya *et al.*, 1998). Die beiden Glykoproteine E1 und E2 sind mit ihrer Transmembrandomäne in die Membran des Virions eingelagert. Beide Proteine werden posttranslational N-glykosyliert (an 5-6 bzw. 11 Positionen; Miyamura *et al.*, 1993) und spielen sehr wahrscheinlich bei der Anheftung des Virus an die Wirtszelle eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe transienter Expression und Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, daß E1 und E2 über nichtkovalente Bindungen Heterodimere bilden (Ralston *et al.*, 1993; Dubuisson *et al.*, 1994). Am Aminoterminus des E2-Proteins konnte ein hohes Maß an Aminosäurevariabilität beobachtet werden. Diese als HVR 1 bezeichnete hypervariable Region umfaßt die Aminosäuren 1-27 des E2 (Weiner *et al.*, 1991; Mizushima *et al.*, 1994). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die HVR 1 auf der Oberfläche des Virions präsentiert wird und ein neutralisierendes Epitop trägt. Vor kurzem wurde gezeigt, daß E2 mit der Interferon-induzierten, Doppelstrang-RNA aktivierten Proteinkinase PKR interagiert. Nach Interferon-Induktion hemmt die PKR den zellulären Translationsapparat, indem sie den Translations-Initiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert. In vitro scheint das E2 die Kinase-Aktivität der PKR und deren inhibitorischen Effekt auf die Proteinsynthese zu hemmen (Taylor *et al.*, 1999). Core, E1 und E2 sind aller Wahrscheinlichkeit nach Bestandteile des Viruspartikels und werden deshalb als Strukturproteine bezeichnet. Sie werden durch ein kleines hydrophobes Peptid von den Nichtstrukturproteinen getrennt, das nach seinem apparenten Molekulargewicht p7 genannt wird. Ein Vergleich mit den nahe verwandten Pestiviren legt den Schluß nahe, daß p7 kein Bestandteil des Virions ist (Elbers *et al.*, 1996).

Bei NS2 handelt es sich sehr wahrscheinlich um die katalytische Domäne der NS2-3 Protease, die für die autoproteolytische *cis*-Spaltung zwischen NS2 und NS3 verantwortlich ist (Grakoui *et al.*, 1993b; Hijikata *et al.*, 1993b). Das bifunktionelle NS3 besitzt zwei unterschiedliche

enzymatische Aktivitäten. In der etwa ein Drittel des Proteins umfassenden aminoterminalen Domäne des Proteins befindet sich eine Serinprotease (Bartenschlager *et al.*, 1993; Eckart *et al.*; 1993; Grakoui *et al.*, 1993b; Hijikata *et al.*, 1993a; Hirowatari *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993; Manabe *et al.*, 1994), die für die Prozessierung der Nichtstrukturproteine mit Ausnahme des NS2 verantwortlich ist (zur Übersicht: Bartenschlager *et al.*, 1999). Innerhalb der carboxyterminalen zwei Drittel des NS3 findet sich eine NTPase/RNA-Helikase Aktivität (Suzich *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995; Gwack *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1996), die sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Replikation der viralen RNA spielt. Das nur 54 Aminosäuren umfassende NS4A verstärkt als Cofaktor in *cis* und *trans* die Aktivität der NS3-Protease (Bartenschlager *et al.*, 1994; Failla *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994b; Tanji *et al.*, 1995a). Dabei ist NS4A für die Prozessierung an den NS3/4A-, NS4A/4B- und NS4B/5A- Schnittstellen zwingend notwendig. Eine Spaltung zwischen NS5A und NS5B kann auch in Abwesenheit von NS4A stattfinden, allerdings mit sehr geringer Effizienz. Die Funktionen von NS4B und NS5A sind bisher unbekannt. NS5A kann durch intensive Phosphorylierung an Serinresten modifiziert werden, wobei zumindest bei einigen Isolaten NS3, NS4A und NS4B eine Rolle spielen (Koch und Bartenschlager, 1999; Neddermann *et al.*, 1999). Es treten zwei verschiedene Formen des NS5A-Proteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 56 und 58 kDa auf. Bei der größeren Form handelt es sich um die hyperphosphorylierte Variante der kleineren Form des NS5A (Kaneko *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1995b; Asabe *et al.*, 1997). Epidemiologische Studien lassen darauf schließen, daß der Erfolg einer Interferontherapie mit der Aminosäuresequenz im Carboxyterminus des NS5A (AS 2209-2248) korreliert (Enomoto *et al.*, 1995, 1996). Vergleichbar mit den bei E2 erhaltenen Ergebnissen kann NS5A mit der PKR interagieren und die Phosphorylierung von eIF2 α inhibieren (Gale *et al.*, 1998). Das NS5B ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RaRP) und damit das entscheidende Enzym für die Replikation des viralen Genoms (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997). Zusätzlich wurde die Aktivität einer terminalen Transferase beschrieben, die aber sehr wahrscheinlich auf eine Kontamination der Enzympräparation durch ein zelluläres Protein zurückzuführen ist (Lohmann *et al.*, 1997). Die RaRP verfügt über eine hohe Prozessivität und ist in der Lage das komplette HCV-Genom *in vitro* ohne die Hilfe anderer viraler oder zellulärer Proteine zu kopieren.

Genprodukt	MW (kD) ^a	Variabilität ^b	Modifikation	Funktion
Core	p22 (p19) ^c	97,6	C-terminale Spaltung	RNA-Bindung Hauptkomponente des Kapsids
E1	Gp31-35 (p21) ^d	79,8	N-Glykosylierung	Hüllprotein
E2	Gp70 (p36) ^d	79,3 ^e	N-Glykosylierung	Hüllprotein, Interferon-Resistenz ?
p7	p7	79,4	?	?
NS2	p23	70,0	?	Bestandteil der NS2-3 Protease
NS3	p70	91,1	?	Bestandteil der NS2-3 Protease Serinprotease (N-Terminus) NTPase/Helikase (C-Terminus)
NS4A	p8	94,4	?	NS3 Protease Kofaktor Phosphorylierung von NS5A
NS4B	p27	83,9	?	?
NS5A	p58	72,7	Phosphorylierung	Interferon-Resistenz ?
NS5B	p68	88,4	Phosphorylierung	RNA-abhängige RNA-Polymerase

Tabelle 1-2: Eigenschaften der HCV-Proteine (verändert nach Bartenschlager et al., 1997a). ^a Apparentes Molekulargewicht in Kilodalton (kD); ^b Identität der Aminosäuresequenz (in Prozent) zwischen HCV Genotyp 1a (HCV-H; Inchauspe et al., 1991) und Genotyp 1b (HCV-J; Kato et al., 1990); ^c Carboxyterminal verkürzte Form; ^d Apparentes Molekulargewicht nach Deglykosylierung; ^e Sequenzvergleich ohne die hypervariable Region am Aminoterminus von E2 (Aminosäure 1 - 30 des E2 Proteins).

1.7.4 Verwandte Viren

Eine dem HCV sehr ähnliche Genomorganisation kann bei den Flaviviren mit dem Gelbfiebervirus (YFV, Yellow Fever Virus) als Prototyp und den tierpathogenen Pestiviren (z. B.: Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) beobachtet werden. Sie werden in der Familie der *Flaviviridae* zusammengefaßt, die zur Zeit aus den drei Gattungen Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus, der das HCV zugeordnet ist, besteht. Die erst vor kurzem klonierten Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C/HGV sind noch nicht klassifiziert, es ist aber wahrscheinlich, daß sie ebenfalls dieser Familie zugeordnet werden. Alle Mitglieder der Virusfamilie sind umhüllt, besitzen ein Plusstrang-RNA Genom und synthetisieren ein einziges Polyprotein, das co- und posttranslational in seine funktionellen Untereinheiten gespalten wird. Bei allen Mitgliedern der Familie sind die Strukturproteine im vorderen Teil des Polyproteins zu finden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Virusgruppen in Anzahl, Größe und Anordnung ihrer Strukturproteine. Die carboxyterminal davon gelegenen Nichtstrukturproteine zeigen hingegen viele Übereinstimmungen in Bezug auf ihre Anordnung und Funktionalität.

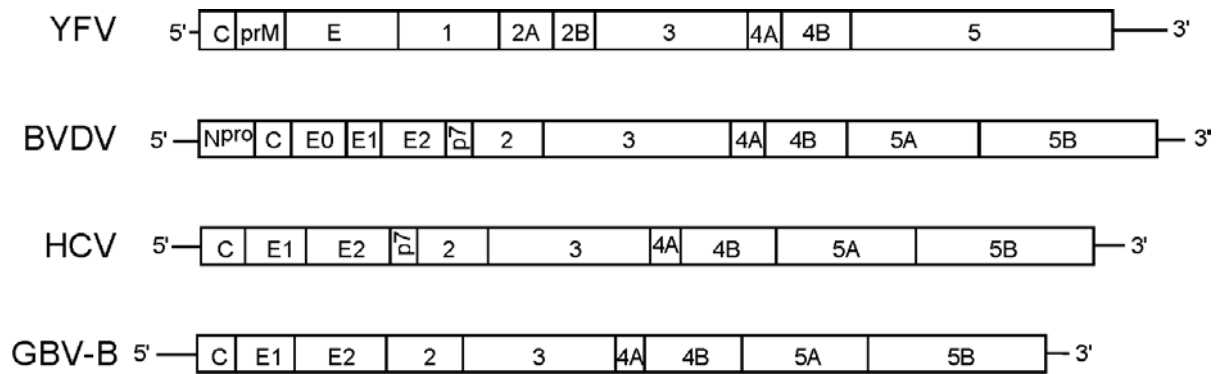


Abbildung 1-2: Vergleich der Genomorganisationen von Flaviviren, Pestiviren, HCV und GBV-B (Bartenschlager *et al.*, 1997a). Aufgeführt sind das Gelbfiebervirus (YFV, Flavivirus, Rice *et al.*, 1985), das NADL-Isolat des BVDV (Pestivirus, Collett, 1992), das Hepatitis C Virus und das GBV-B (Muerhoff *et al.*, 1995; hypothetische Genomorganisation). 5' und 3'-NTR sind als einfache Linien dargestellt, das Polyprotein wird durch ein Rechteck symbolisiert. N^{PRO}, aminoterminaler Protease.

1.7.5 Der hypothetische Replikationszyklus des HCV

Die Replikation des HCV scheint hauptsächlich in Hepatozyten stattzufinden; daneben wird sie in peripheren Blutzellen vermutet. Es gibt Hinweise auf eine latente Infektion mononukleärer Zellen, in denen die Replikation durch spezielle Stimuli aktiviert werden kann (Zignego *et al.*, 1992). Die Erforschung des HCV-Replikationszyklus ist seit jeher durch das Fehlen eines geeigneten Zellkultursystems oder Tiermodells (Ausnahme: Schimpanse) zur Vermehrung des Virus *in vitro* behindert worden. Aus diesem Grund leitet sich unsere heutige Vorstellung der HCV-Replikation im wesentlichen von der Charakterisierung rekombinanter Proteine und aus Analogien zu verwandten Viren aus der Familie der *Flaviviridae* ab. Auf der Basis dieser lückenhaften Information kann ein hypothetischer Replikationszyklus (siehe Abbildung 1-3) erstellt werden (Rice, 1996).

Das HCV bindet aller Wahrscheinlichkeit nach mit Hilfe seiner Hüllproteine an einen oder mehrere Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Als ein möglicher HCV-Rezeptor wurde CD81 identifiziert. Diese Vermutung basiert zum einen auf der starken Interaktion mit E2 und Viruspartikeln, zum anderen der Blockade dieser Interaktion durch neutralisierende Antikörper (Pileri *et al.*, 1998). Die Beobachtung, daß HCV-Partikel mit beta-Lipoproteinen und Immunglobulinen assoziiert sind läßt auf eine alternative HCV-Aufnahme durch korrespondierende Rezeptoren schließen (Agnello *et al.*, 1999). Nach der Virusaufnahme, möglicherweise durch rezeptorvermittelte Endozytose, gelangt das Nukleokapsid ins Zytoplasma der Zelle, wo das RNA-Genom freigesetzt wird. Aufgrund ihrer Plusstrang-Orientierung kann die RNA mit Hilfe der IRES direkt translatiert werden. Das entstehende Polyprotein wird co- und post-translational von zellulären und zwei viralen Proteasen gespalten. Die Translation findet am

rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, wo sich wahrscheinlich ein membranassoziierter Replikationskomplex aus viralen Nichtstrukturproteinen und dem RNA-Genom bildet. An diesem für die Replikation des RNA-Genoms verantwortlichen Komplex, sind sehr wahrscheinlich die NS3 Helikase und die NS5B Polymerase beteiligt. Das RNA-Plusstrang Genom wird in einen RNA-Minusstrang umgeschrieben, der wiederum als Matrize für neue RNA-Plusstränge dienen kann. Die neu generierten Plusstränge können entweder in Minusstränge umgeschrieben, translatiert oder in Nukleokapside eingebaut werden. Die Nukleokapside knospen in das Lumen des ERs und erhalten dabei eine Hülle, in welche die viralen Hüllproteine eingelagert sind. Über den zellulären Exozytoseweg werden die Partikel aus der Zelle ausgeschleust. Dabei werden im Zuge der Partikelreifung die Kohlenhydrat-Seitenketten der E-Proteine von mannosereichen in komplexe Glykane überführt.

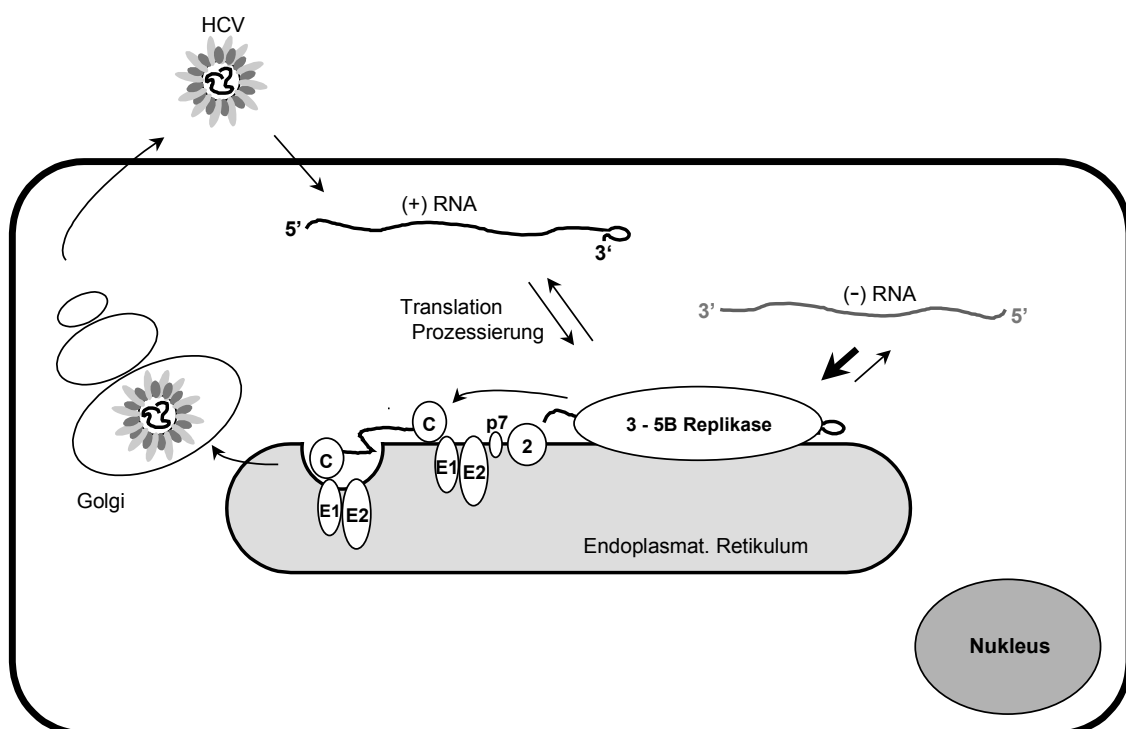


Abbildung 1-3: Der hypothetische Replikationszyklus des HCV (verändert nach Bartenschlager, 2000). Nach Infektion der Wirtszelle wird das virale Plusstrang-RNA Genom [(+) RNA] ins Zytoplasma freigesetzt und anschließend translatiert. Das virale Polyprotein wird prozessiert, wobei die viralen Proteine eng mit der ER-Membran verbunden bleiben. Der Replikase-Komplex bestehend aus NS3-5B synthetisiert Minusstrang-RNA [(-) RNA]. Die Minusstrang-RNA dient als Matrize bei der Produktion neuer RNA-Plusstränge, wobei das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des Plusstrangs verschoben ist. Die Plusstrang-RNA interagiert mit den Strukturproteinen und wird verpackt. Die Nukleokapside knospen ins Lumen des ER, werden umhüllt und über den Golgi-Apparat aus der Wirtszelle ausgeschleust.

1.7.6 Genotypen und Varianz

Während der Replikation von RNA-Viren kommt es auf Grund der Fehlinkorporation von Nukleotiden durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase zu Mutationen. Diese Mutationen sind zufällig in das Genom eingefügt und können nicht korrigiert werden, da das Enzym keine Korrekturlese-Funktion besitzt. Einige der Mutationen sind letal, da in der kodierenden Sequenz entweder ein Stopcodon entsteht oder auf Grund von Insertionen oder Deletionen ein Leserasterwechsel. Andere Mutationen sind still, da sich zwar die Nukleotid- nicht aber die Aminosäuresequenz verändert. Mutationen können aber auch einen Vorteil darstellen, wie z.B. eine effektivere Replikation oder Immunevasion ermöglichen. Einige der varianten Genome entwickeln sich weiter und führen im Fall des HCV zur Koexistenz mehrerer eng verwandter, aber dennoch verschiedener Hepatitis C-Viren in ein und demselben Patienten. Diese Form einer Viruspopulation wird als Quasispezies bezeichnet (Martell *et al.*, 1992; Gretch *et al.*, 1996). Der variabelste Bereich des HCV befindet sich in der HVR 1 des E2 Proteins. Im Rest des Genoms ist deutlich weniger Variabilität innerhalb eines einzelnen Isolats zu finden. Quasispezies unterscheiden sich von den Genotypen, die untereinander weitaus geringere Homologien aufweisen. Um vom einen Genotyp zum anderen zu wechseln wäre bei einem HCV-Isolat ein sehr hohes Maß an Sequenzmodifikationen notwendig. Ein Wechsel des Genotyps ist deshalb bei HCV-Isolaten mehr als unwahrscheinlich.

Während der letzten Jahre wurden zahlreiche Teil- und Komplettssequenzen des HCV kloniert. Die Beobachtung, daß die Sequenzen untereinander zum Teil in hohem Maße variierten, machte die Einführung einer Gliederung in verschiedene Genotypen notwendig. Die heute allgemein akzeptierte Nomenklatur unterscheidet 6 verschiedene Genotypen (1-6) auf Basis der Sequenzvariation in einem definierten Teil des NS5B. Die einzelnen Genotypen sind wiederum in einzelne Subtypen (a, b, etc.) unterteilt (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1993). Am häufigsten sind die Genotypen 1a (Erstisolat aus den USA; Choo *et al.*, 1989) und 1b (japanisches Isolat; Kato *et al.*, 1990) anzutreffen. Vor allem Typ 1b konnte in fast jedem Land gefunden werden. Andere Genotypen sind geographisch gesehen weniger weit verbreitet. Genotyp 4 ist vorwiegend im mittleren Osten zu finden, Typ 5 in Südafrika und Typ 6 in Hongkong. Der in Deutschland vorwiegend anzutreffende Genotyp 1b ist für etwa 60% aller Infektionen verantwortlich ist (Bukh *et al.*, 1993; Simmonds *et al.*, 1993; Mc Omish *et al.*, 1994). Die Höhe der Sequenzvariabilität ist nicht gleichmäßig über das Genom verteilt. Zu den hochkonservierten Bereichen zählen unter anderem die 5'-NTR sowie Teile der 3'-NTR, während bestimmte Bereiche innerhalb des Leserasters stark variieren können. Dabei sind vor

allem die beiden Hüllproteine E1 und E2 und insbesondere die hypervariable Region (HVR 1) am Aminoterminus des E2 hervorzuheben (Weiner et al., 1991; Mizushima et al., 1994). Es ist sehr wahrscheinlich, daß zumindest das E2 für die Bindung des Virus an seine Zielzelle verantwortlich sind und dabei die HVR 1 auf der Oberfläche des Viruspartikels präsentiert wird. Gegen die HVR 1 gerichtete Antikörper sind in der Lage die E2-Bindung an Zielzellen teilweise zu neutralisieren (Rosa *et al.*, 1996) und sie könnten dabei eine Selektion verschiedener Varianten des Virus verursachen (Weiner *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993, 1994).

1.8 Zielsetzung

Seit der Entdeckung des Hepatitis-C Virus vor 10 Jahren war und ist eines der vorrangigen Ziele der HCV-Forschung die Etablierung eines *in vitro* Replikationssystems. Zu Beginn der Arbeit stand trotz intensiver Suche vieler Arbeitsgruppen kein Zellkultursystem für das HCV zur Verfügung, das eine effiziente Vermehrung der Viren *in vitro* ermöglichte. Ferner existierte kein praktikables Tiermodell, denn mit Ausnahme des Schimpansen war eine reproduzierbare Übertragung des HCV auf ein Versuchstier nicht gelungen.

Das bisher verlässlichste System der Virusvermehrung bestand in der Infektion primärer Zellkulturen mit HCV-positivem Serum. Zwar ließ sich in diesen Zellen eine Virusvermehrung nachweisen, diese war jedoch sehr gering. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit primärer Hepatozyten ist dieses Zellkultursystem außerdem nicht praktikabel. Eine Infektion von Zelllinien ist auf diese Weise ebenfalls möglich und wurde schon vielfach beschrieben, allerdings war auch hier die Replikation des Virus zu gering.

In den zuvor aufgeführten ineffizienten Zellkultursystemen war der Virusnachweis sehr problematisch, denn er konnte nur mit Hilfe der hochsensitiven strangspezifischen RT-PCR durchgeführt werden. Virale Antigene ließen sich nur sehr unzuverlässig nachweisen. Aufgrund dieser gravierenden Nachteile waren die vorhandenen Zellkultursysteme für ein Studium der HCV-Replikation ungeeignet.

Ziel der Arbeit war deshalb der Aufbau eines Zellkultursystems auf der Basis der Transfektion klonierter vollständiger HCV-Genome. Zu diesem Zweck mußte zunächst ein replikationskompetentes HCV-Genom konstruiert werden. Auf Basis dieser viralen cDNA sollten dem HCV-Genom entsprechende *in vitro* Transkripte hergestellt und in Wirtszellen transfiziert werden. Um eine Replikation nachweisen zu können mußten ferner geeignete Meßsysteme aufgebaut werden. Im Erfolgsfall sollte anschließend der Beweis geführt werden, daß eine Replikation im neu

etablierten Zellkultursystem stattfindet. Zusätzlich sollte das Zellkultursystem in Bezug auf seine Effizienz und Reproduzierbarkeit untersucht werden.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel sind Materialien und Methoden beschrieben, die bei den durchgeführten Arbeiten eingesetzt wurden. Sofern nicht anders angegeben, entsprechen Protokolle und Reaktionsbedingungen den Angaben der Hersteller oder den Vorschriften des Handbuchs „Molecular Cloning - A Laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989).

Zentrifugationen ohne Angabe des Rotors wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorff 5417) bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Hochgeschwindigkeits- und Ultrazentrifugationen kamen ausschließlich Rotoren und Zentrifugen der Firma Sorvall (Bad Homburg) zum Einsatz.

2.1 Patientenmaterial

Der Patient H01 war chronisch mit dem Hepatitis C-Virus infiziert und infolge einer Lebertransplantation immunsupprimiert. Aus dem Serum des Patienten wurde das vollständige HCV-Genom RB01, aus dessen Lebergewebe das Konsensusgenom K1 kloniert. Die Proben der zirrhotischen Leber wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Seren und Leberproben wurden von Dr. L. Theilmann, Ludolf-Krehl Klinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

2.2 Zellen

2.2.1 Säugerzellen

Sämtliche verwendeten Säugerzelllinien stammen aus der „American Type Culture Collection“ (ATCC).

BHK-21	Zelllinie aus Hamsternierenfibroblasten („ B aby H amster K idney“)
HepG2	Humane Hepatoma Zelllinie
HuH7	Humane Hepatoma Zelllinie
HeLa	Humane Fibroblastenzelllinie

2.2.2 Insektenzellen

High5: Zelllinie aus Eizellhomogenaten von *Trichoplusia ni*, die bei der Expression rekombinanter Proteine eingesetzt wird.

Sf9: Die aus Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda* abgeleitete Zelllinie, wird bei der Herstellung und Amplifikation rekombinanter Bakuloviren verwendet.

2.2.3 Bakterienstämme

E. coli **TG1**: F['] traD36 lacI^q D(lacZ)M15 proA⁺B⁺ / supE D(hsdM-mcrB)5(r_k⁻m_k⁻MdrB⁻) thi D(lac-proAB)

E. coli **DH5a**: F['] /endA1 hsdR17A(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR (f80dlacD(lacZ)M15)

E. coli **Sure** (Stratagene, Heidelberg): e14⁻(McrA⁻) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan^r) uvrC [F['] proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]

2.2.4 Viren

vTF7-3: Das rekombinante Vaccinia Virus erlaubt die konstitutive Expression der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des 7.5 early/late Promotors des Vaccinia Virus (B. Moss, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

BacPAK6 (Clontech, Heidelberg): Diese Rekombinante des Bakulovirus „*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus“ enthält das lacZ-Gen. Die DNA des Virus wird nach Restriktion mit Bsu36I zur Herstellung rekombinanter Bakuloviren verwendet.

2.3 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten verwendeten Lösungen zusammengefaßt. Puffer und Lösungen, deren Gebrauch nur auf eine spezielle Methode beschränkt ist, sind im jeweiligen Protokoll angegeben.

Name	Zusammensetzung
Acrylamid-Lösung (30%)	290 g/l Acrylamid; 10 g/l Bisacrylamid
Coomassie-Färbelösung	0,6 g/l Coomassie Brillant Blau R250 (Serva) in 50% Methanol, 10% Essigsäure
CTC Arbeitslösung	CTC Stocklösung; 0,8 M NaOH; 10% SDS und Wasser zu gleichen Teilen gemischt.
CTC Stocklösung	50 ml 0,2 % Kupfersulfat / 0,2% Kaliumtartrat mit 50 ml 20% Natriumkarbonat gemischt.
DNA-Probenpuffer	1 mg/ml Bromphenolblau; 2 mg/ml Xylencyanol; 1 mM EDTA; 50% Sucrose
Entfärbelösung	10% Essigsäure; 5% Methanol
Ethidiumbromid (EtBr)	10 mg/ml (Stammlösung)
Guanidin-Lösung (RNA-Präparation)	4 M Guanidin Thiocyanat; 25 mM Natriumcitrat; 0,5% Sarkosyl; 0,1 M β -Mercaptoethanol (70 μ l auf 10 ml)
IPTG	100 mg/ml (Stammlösung)
LP I	10 mM Tris/Cl (pH 7,5); 10 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM β -ME
LP II	20 mM Tris/Cl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 0,5 % Triton X-100; 20 % Glycerol; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM β -ME
LP III	20 mM Tris/Cl (pH 7,5); 500 mM NaCl; 2 % Triton X-100; 50 % Glycerol; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM β -ME; 10 mM Imidazol
NPB	50 mM Tris/Cl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% NP40; 1% DOC; 0,1% SDS
PBS	8 mm Na ₂ HPO ₄ ; 2 mm NaH ₂ PO ₄ ; 140 mM NaCl
Phenol (TE gesättigt)	100 g Phenol; 250 ml H ₂ O; 62,5 ml 1M Tris-OH; 1,2 g Hydroxychinolin; pH 7
Protein-Probenpuffer	200 mM Tris-Cl, pH 8,8; 5 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau; 10% Sucrose
RaRP-Puffer	20 mM Tris/Cl pH 7,5; 50 mM MgCl ₂ ; 250 mM KCl; 10 mM EDTA
Sammelgel-Puffer	1 M Tris/Cl, pH 6,8; 0,8% SDS
TAE	40 mM Tris/Cl (pH 8,3); 10 mM NaAc; 2,5 mM EDTA
TE	10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1 mM EDTA
TGS	25 mM Tris/OH; 19,2 mM Glycin; 0,1% SDS
Transkriptionspuffer (optimiert, 5 \times)	400 mM Hepes (pH 7,5); 60 mM MgCl ₂ ; 10 mM Spermidin; 200 mM DTT
Transkriptionspuffer (Standard, 5 \times)	200 mM Tris/Cl (pH 7,5); 30 mM MgCl ₂ ; 10 mM Spermidin; 50 mM NaCl

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

Tabelle 2-1: Zusammenstellung der allgemein verwendeten Puffer und Lösungen. Die Stoffe sind sofern nicht anders angegeben in destilliertem Wasser gelöst.

2.4 Kulturmedien

2.4.1 Bakterien

Name	Zusammensetzung
LB-Agar	15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium
LB-Ampicillin	Flüssigkulturen: 75 µg/ml; Kulturplatten: 100 µg/ml
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl

2.4.2 Säugerzellen

Name	Zusammensetzung
DMEM	Dulbeccos Modified Minimal Essential Medium; Gibco-BRL, Eggenstein
komplettes DMEM	10% FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin; nichtessentielle Aminosäuren (nach Angaben des Herstellers, Biochrom); in DMEM
DMEM ohne FCS	DMEM ohne L-Glutamin, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin; nichtessentielle Aminosäuren (nach Angaben des Herstellers); 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin in DMEM
Ham's F12	Ham's F12 (Gibco-BRL, Eggenstein) ergänzt mit: 5 ng/ml „epidermal growth factor“ (Gibco-BRL); 1 ng/ml Glucagon (Sigma, Deisenhofen); 10 µg/ml Insulin (Sigma) 6,5 ng/ml Somatostatin (Sigma), 3,5 µM Hydrocortison (Sigma), 0,5 µg/ml Linolensäure (Sigma), 5 µg/ml Transferrin (Sigma), 30 nM selenige Säure (Sigma), 2 mM Glutamin, 120 Einheiten/ml Penicillin und 120 µg/ml Streptomycin.
Optimem	nach Angaben des Herstellers (Gibco-BRL, Eggenstein)

2.4.3 Insektenzellen

Name	Zusammensetzung
Grace	Grace's Insektenmedium (Gibco-BRL, Eggenstein)
Grace+	Grace's ergänzt mit: 10% FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin; 0,1 % Pluronic F-68 (Gibco-BRL) zugesetzt.

2.5 Antiseren

Antiserum	Spezifität (HCV-Sequenz)	Bemerkungen
αCore	2-167	polyklonales Antiserum
αE1	193-317	polyklonales Antiserum
αE2	451-623	polyklonales Antiserum
αNS2	GST-NS2-Fusion	polyklonales Antiserum; H. Müller, Heidelberg
αNS3	1007-1246	polyklonales Antiserum
αNS3/4	1616-1738	polyklonales Antiserum
αNS4	1618-1960	polyklonales Antiserum; L. Tomei, IRBM, Rom
αNS4A	MBP-1658-1711	polyklonales Antiserum

α NS5A	2101-2231	polyklonales Antiserum
α NS5B	2419-2622	polyklonales Antiserum

Tabelle 2-2: Antiseren, die bei Western-Blots oder Immunpräzipitationen eingesetzt wurden. In der Spalte „Spezifität“ sind die jeweiligen Polyproteinfragmente angegeben, gegen die die Antiseren gerichtet sind.

2.6 Oligonukleotide

Die Benennung der Oligonukleotide bezieht sich auf die Numerierung der Nukleotidsequenz des Plusstranges unseres HCV-Isolates. Die Zahlen entsprechen der Position des 5'-Endes eines Oligonukleotides im HCV-Genom. Die Bezeichnung „S“ steht dabei für „Sinn“ (dem Plusstrang entsprechend), „A“ steht für „anti-Sinn“ (dem Minusstrang entsprechend) und TAG bezeichnet eine heterologe Markierungssequenz. In der folgenden Tabelle sind nur die wichtigsten der im Ergebnisteil erwähnten Oligonukleotide aufgeführt.

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
3'rev Antisense	GCG CAC TAG TAG TAC TTG ATC TGC AGA GAG GCC AGT ATC AGC ACT CTC TGC AGT CAA GCG GCT CAC GGA CCT TTC	Klonierung des 3'-Scal Endes
A349	GTG CTC ATG GTG CAC GGT CTA CGA	strangspezifische PCR (5'-Ende)
A4919	AGC ACA GCC CGC GTC ATA GCA CTC G	HCV-Klonierung (5'-Hälfte)
A578	CCA GGG GTA CCC GGG CTG AGC CCA	strangspezifische PCR (5'-Ende)
A6103	GCT ATC AGC CGG TTC ATC CAC TGC	HCV-Klonierung (5'-Hälfte)
A6156	CGC TCT CAG GCA CAT AGT GCG TGG	HCV-Klonierung
A8700TAG1	CTA GAT CAT GTA TCT GTA CTA ACC AGG AGC ATG ATG TTA TCA ACT CCA	strangspezifische PCR mit TAG (Plusstrang-Nachweis)
A9386	TTA GCT CCC CGT TCA TCG GTT GG	HCV-Klonierung (3'-Hälfte)
A9413	CAG GAT GGC CTA TTG GCC TGG AG	HCV-Klonierung (3'-Hälfte)
S2529	CGC GTC TGT GCC TGC TTG TGG ATG	HCV-Klonierung
S4542	GAT GAG CTC GCC GCG AAG CTG TCC	HCV-Klonierung (3'-Hälfte)
S59	TGT CTT CAC GCA GAA AGC GTC TAG	strangspezifische PCR, 5'-Ende; HCV-Klonierung (5'-Hälfte)
S8467	GTA ATA CCC TCA CAT GTT ACT TGA	strangspezifische PCR (3'-Ende)
S8467TAG2	ACT GAT CAA GCA GTA TGT ACT ACG GTA ATA CCC TCA CAT GTT ACT TGA	strangspezifische PCR mit TAG (Minusstrang-Nachweis)
TAG1	CTA GAT CAT GTA TCT GTA CTA ACC	heterologer Anteil von A8700-TAG1
TAG2	ACT GAT CAA GCA GTA TGT ACT ACG	heterologer Anteil von S8467-TAG2
S-NPT	TCA AGA CCG ACC TGT CCG GTG CCC	NPT-Gen spezifische PCR
A-NPT	CTT GAG CCT GGC GAA CAG TTC GGC	NPT-Gen spezifische PCR

2.7 Vektoren

pATA18 3xstop: Dieser Vektor auf der Basis von pUC enthält das Thymidinkinase-Gen des Vaccinia Virus, in das eine Expressionskassette mit dem Vaccinia 11K-late-Promotor, eine multiple Klonierungsstelle und Stop-Kodons für alle drei Leseraster eingefügt sind. Der Vektor dient zur Generierung von Vaccinia Virus Rekombinanten.

pBlueskriptII SK⁻ (pBSK⁻): Dieser Standard-Klonierungsvektor mit T7 und T3 Promotor wird vor allem zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet (Stratagene).

pTM1: Der Multifunktionsvektor kann zur Erzeugung stabiler Vaccinia Virus Rekombinanten, zur transienten Expression nach Transfektion und zur *in vitro* Transkription verwendet

werden. Die Expression eines Fremproteins erfolgt unter Kontrolle des T7-Promotors (B. Moss, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

pBR322: Dieser Vektor niedriger Kopienzahl liefert die Basis für die Konstruktion der Klonierungsvektoren pBT3, pBT73 und pFK.

pCR2.1: Der Vektor ist speziell für die TA-Klonierungsmethode vorbereitet, bei der PCR-Produkte direkt in den linearisierten Vektor ligiert werden. Der Erfolg kann mit Hilfe einer blau-weiß Selektion überprüft werden (Invitrogen, Leek, Holland).

2.8 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.8.1 Extraktionen

Eine **Phenolextraktion** dient zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäuren. Falls notwendig wird der Ansatz mit H₂O dest. auf 400 µl aufgefüllt und ½ Volumen Phenol hinzugefügt. Der Ansatz wird kräftig gemischt und 5 Min. bei 14.000 UpM abzentrifugiert. Anschließend wird die wäßrige Oberphase in ein frisches Gefäß überführt. Standardmäßig schließt sich eine Chloroformextraktion der Nukleinsäure an.

Bei der **Chloroformextraktion** wird zum Ansatz von mindestens 400 µl ein halbes Volumen Chloroform gegeben und kurz gemischt. Eine Zentrifugation von 30 Sek bei 14.000 UpM trennt den Ansatz in zwei Phasen, von denen die obere wäßrige Phase in ein frisches Gefäß überführt wird. Üblicherweise folgt im Anschluß eine Fällung der Nukleinsäuren (2.8.2).

Sind Nukleinsäuren nur leicht verunreinigt, kann eine **Phenol-Chloroformextraktion** durchgeführt werden. Zu mindestens 400 µl Ansatz wird das gleiche Volumen einer 1:1 Mischung von Phenol- und Chloroformlösung gegeben. Der Ansatz wird gemischt und die obere Phase nach 5 Min. Zentrifugation (14.000 UpM) in ein frisches Gefäß überführt. Standardmäßig folgt darauf eine Nukleinsäurefällung (2.8.2).

2.8.2 Fällungen

Bei der **Ethanol-fällung** werden dem Ansatz zuerst 1/10 Vol. NaAc (3M NaAc, pH 6,0) und nach kurzem Schütteln 2,5 Vol. 96% EtOH hinzugefügt. Der gemischte Ansatz wird 15 Min. bei -70°C inkubiert und die präzipitierten Nukleinsäuren 15 Min. bei 14.000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 80% EtOH (-20°C) gewaschen, 5 Min bei 14.000 UpM zentrifugiert, getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O gelöst. Eine **Isopropanolfällung** wird wie eine Ethanol-fällung durchgeführt mit dem Unterschied, daß zu Beginn 0,7 Vol. Isopropanol anstelle von 2,5 Vol EtOH hinzugefügt werden.

2.8.3 Kompetenzinduktion und Transformation von E. coli

2.8.3.1 Kompetenzinduktion

5 ml Bakterien einer Übernachtskultur werden mit 500 ml frischem LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,8-1 weiterinkubiert. Alle weiteren Schritte einschließlich der Zentrifugationen werden bei 4°C durchgeführt. Nach einer Zentrifugation (6.000 UpM; GS-3; 10 Min.) wird das Pellet in 500 ml 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 500 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, 30 Min. auf Eis inkubiert und ein weiteres mal zentrifugiert (6.000 UpM; GS-3; 5 Min.). Das Pellet wird in 50 ml 0,1 M CaCl₂ mit 15% Glycerol resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgt bei -70°C.

2.8.3.2 Transformation von *E. coli*

100 µl der kompetenten Bakterien werden mit Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgen ein Hitzeschock der Bakterien von 90 Sekunden bei 42°C und eine Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wird die Bakteriensuspension 20 Min. bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert (6.000 UpM; 2 Min.), der Überstand bis auf 100µl abgenommen und das resuspendierte Pellet auf LB-Agarplattem (inklusive Antibiotikum) ausgestrichen. In der Regel können Bakterienkolonien 8-12 Stunden nach Transformation isoliert werden. Mit dieser Methode lassen sich etwa 10^4 bis 10^5 transformierte Bakterien pro µg Plasmid-DNA erreichen. Stehen nur geringe Mengen an Plasmid-DNA zur Verfügung, so ist Elektroporation die Methode der Wahl, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Das hier vorgestellte Protokoll ist für einen „Gene Pulser“ der Firma Biorad (München) ausgelegt und lehnt sich an die Methode von Dower *et al.* (1988) an. 400 ml LB .Medium werden mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9 bei 37°C inkubiert. Sämtliche weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt. Nach einer Zentrifugation (6.000 UpM; GS-3; 10 Min.) wird das Pellet erst in 400 ml doppelt destilliertem Wasser gewaschen, dann in 200 ml und zuletzt in 8 ml 10% Glycerol. Anschließend werden die Zellen 10 Min. bei 7.000 UpM zentrifugiert und in 1 ml 10% Glycerol resuspendiert. Die Bakterien werden in 100 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Für die Elektroporation werden je 40 µl der kompetenten Bakterien mit 1µl eines 1:10 verdünnten Ligationsansatzes eine Minute auf Eis inkubiert, in eine Elektroporationsküvette (0,1 cm Spaltbreite; Biorad) überführt und bei einer Kapazität von 25 µF bei 2,3-2,5 kV Spannung und 200 Ω Regelwiderstand elektroporiert. Die Pulsdauer sollte zwischen 2-5 ms liegen. Unmittelbar nach dem Puls wird 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden zentrifugiert (6.000 UpM; 2 Min.) und auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausgestrichen. In der Regel werden mit dieser Methode mehr als 10^6 transformierte Bakterien pro µg Plasmid erzielt.

2.8.4 Plasmid-Präparation aus Kleinkulturen

Das Bakterienpellet einer 1,5 ml Übernachtskultur wird in 100 µl Lösung A resuspendiert, mit 200 µl Lösung B vorsichtig gemischt und nach 5 Min. bei Raumtemperatur mit 150 µl Lösung C versetzt. Nach 5-10 Min. auf Eis werden hochmolekulare DNA und Proteine durch 10 Min. Zentrifugation bei 13.000 UpM pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert und 5 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die Oberphase wird in ein neues Gefäß überführt, mit 1 Vol. Isopropanol gemischt und 15 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das resultierende DNA Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE gelöst. Kontaminierende RNA kann durch 5 Min. Inkubation mit 40 µg/ml RNaseA bei 37°C hydrolysiert werden.

Zur Präparation von Plasmid DNA für Sequenzierungsreaktionen wurden „Plasmid-Spin-Kits“ der Firmen Qiagen (Hilden, Deutschland) und Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.8.5 Plasmid-Präparation aus Großkulturen

Für die Cäsiumchlorid- Dichtegradienten Plasmidpräparation werden Bakterien aus 250-400 ml Übernachtskultur 10 min. bei 6000 UpM und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5C Plus; SLA 1500) pelletiert. Nachdem das Bakterienpellet in 5 ml Puffer A (25 mM Tris/Cl, pH 8,0; 10mM EDTA; 55 mM Glucose) resuspendiert sind, erfolgt die Zellyse nach vorsichtiger Zugabe von 14 ml Puffer B (0,2 M NaOH; 1% SDS) auf Eis. Nach maximal 5 Min. werden 10,5 ml Puffer C (3 M Kaliumacetat, pH 5,0) zum Lysat hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 Min. auf Eis inkubiert. In einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt (14.000 UpM.; SS 34; 4°C) werden Zellmembranen und chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt, die darin enthaltenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 1,25 Vol. Isopropanol

30 Min. bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wird 10 Min. lang abzentrifugiert (10.000 UpM; SLA 1500; 4°C) und anschließend in 10 ml TE gelöst. Die Lösung wird zuerst mit 5 ml Phenol und danach mit 5 ml Chloroform extrahiert, 5 Min. zentrifugiert (10.000 UpM.; SS 34; 4°C), die obere wäßrige Phase in ein neues Gefäß überführt und dann nach Zugabe von 1/Vol. 3M NaAc und 1,25 Vol. Isopropanol bei -20°C inkubiert. Präzipitierte Nukleinsäuren werden 5 Min. lang abzentrifugiert (10.000 UpM.; SS 34; 4°C) und das Pellet in 3 ml TE gelöst.

Anschließend wird die Plasmid-DNA über einen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten weiter gereinigt. Dabei werden je 4,4 g CsCl in Ultrazentrifugenröhrchen (Sorvall; 6 ml) eingewogen und mit der gelösten Nukleinsäure sowie 400 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) gemischt. Die Zentrifugenröhrchen werden mit TE genau austariert, verschlossen und mindestens 15 h bei 50.000 UpM zentrifugiert (Sorvall Combi Plus; TV 1665; 20°C). Während der Zentrifugation erfolgt im CsCl-Gradienten eine Trennung von Plasmid-DNA, chromosomaler DNA und Proteinen. Mit einer Spritze wird die Plasmid-DNA Bande unter UV-Licht abgesaugt und das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit CsCl/H₂O gesättigtem Isopropanol entfernt. Die Plasmid-DNA Lösung wird zweimal für eine Stunde gegen Wasser und über Nacht bei 4°C gegen TE dialysiert. Werden Derivate des Vektors pBR322 gereinigt, sollte bis zu 1 l Bakterienkultur eingesetzt werden, um eine akzeptable Ausbeute zu erhalten. Bei solch großen Mengen an Bakterienkultur ist es notwendig die Volumina der Puffer von P1 bis P3 entsprechend zu erhöhen.

Alternativ zu CsCl-Dichtegradienten können Großpräparationen aus 250 ml Bakterienkultur in geringerer Zeit mit Affinitätsäulen der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt werden. Alle gereinigten Plasmide werden mit Agarose-Gelelektrophorese (2.8.7) auf RNA-Kontaminationen untersucht. Die Ausbeute der Präparation wurde durch OD-Messung bei 260 und 280 nm bestimmt.

2.8.6 Präparation von DNA aus HuH-7 Zellen

Genomische DNA wird mit Hilfe von Affinitätsäulen der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben der Hersteller aufgereinigt. Nach einem einstündigem Verdau mit RNase A und anschließender Phenol-Chloroform Extraktion kann die DNA-Präparation in eine PCR (2.8.14) eingesetzt werden.

2.8.7 Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird eine dem optimalen Auftrennungsbereich entsprechende Agarosekonzentration zwischen 0,7 und 2,5% verwendet. Die jeweilige Menge Agarose (AGS, Heidelberg) wird kurz in TAE-Puffer aufgeköcht, auf etwa 50°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid gemischt (1 µg/ml Endkonz.), und in eine vorbereitete Elektrophoreseapparatur gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, wird es mit TAE überschichtet und die Proben in die Probentaschen gefüllt. Die Probe wurde zuvor 1/10 mit DNA Probenpuffer verdünnt. Die Elektrophorese wird mit 5-10 V/cm Gellänge durchgeführt. Das Versuchsergebnis wird im UV-Licht bei 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einem Videosystem (Polaroid) dokumentiert. Zur Größenbestimmung werden DNA-Größenmarker (pUC 19 DNA/MspI; λ DNA/Eco130I/MluI) der Firma MBI Fermentas verwendet. Präparative Gele enthalten während der Elektrophorese kein Ethidiumbromid. Die DNA wird erst danach mit EtBr-Lösung (1µg/ml) angefärbt und anschließend das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaex-Gelelutions-Kits (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.8.8 Southern-Transfer

Der alkalische DNA-Transfer auf eine ungeladene Nylonmembran (Pall, Dreieich) wurde mit 0,4 M NaOH mit einem Vakuum-Transfergerät der Firma Keutz (Gießen) nach Angaben der

Hersteller durchgeführt. Nach dem Transfer wird die Membran 15 Min. bei 120°C getrocknet und anschließend 1 h in Hybridisierungslösung in einem Hybridisierungs-ofen bei 58°C präinkubiert. Die Membran wird unter gleichen Bedingungen über Nacht mit einer spezifischen Sonde hybridisiert, danach zweimal mit 2fach SSC / 0,1% SDS und zweimal mit 0,1fach SSC / 0,1% SDS bei 58°C gewaschen. Werden ³²P markierte Oligonukleotid-Sonden verwendet, erfolgt die Detektion durch Autoradiographie, bei Verwendung Digoxigenin markierter, PCR generierter Sonden erfolgt die Detektion mit dem „DIG Luminescent Detection Kit“ (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Digoxigenin markierten Sonden wurden mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ der Firma Boehringer Mannheim nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

2.8.9 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarosemenge gewünschter Konzentration, bezogen auf ein Endvolumen von 100 ml, wird in einem Volumen von 72 ml Wasser durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt, mit 10 ml 10× MOPS-Puffer und 18 ml 12,3 M Formaldehyd gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben werden mit Wasser auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt und mit 5 µl 10× MOPS-Puffer, 9 µl 12,3 M Formaldehyd sowie 25 µl Formamid gemischt. Nach 15 Min. Inkubation bei 55°C werden die Ansätze auf Raumtemperatur abgekühlt und nach Zusatz von 1,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) weitere 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, mit 10 µl Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird in 1× MOPS-Puffer bei 5 V/cm Gel durchgeführt.

2.8.10 Northern-Transfer

Die Methode erlaubt den Nachweis spezifischer Sequenzen in RNA-Präparationen durch Transfer und Hybridisierung. Der Northern-Transfer unterscheidet sich vom Southern-Transfer (2.8.8) hauptsächlich anhand der denaturierenden Formaldehyd-Gelelektrophorese zu Beginn des Protokolls (2.8.9). Dies ist notwendig, da einzelsträngige RNA-Moleküle durch intramolekulare Basenpaarungen häufig Sekundärstrukturen ausbilden können.

Nach Auftrennung der RNA-Proben mit der Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese wird das Gel mehrfach mit destilliertem Wasser abgespült, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend wird das Gel 30 Min. lang in etwa 10 Gelvolumen 0,05 M NaOH/1,5 M NaCl inkubiert, dann 20 Min. lang in 10 Gelvolumen 0,5 M Tris/Cl (pH 7,4)/1,5 M NaCl neutralisiert. Darauf folgt eine 45-minütige Inkubation in etwa 10 Gelvolumen 20×SSC-Puffer. Ein Schwamm, leicht größer als das Gel, wird in einer bis zur halben Schwammhöhe mit 20×SSC gefüllten Schale mit dem Puffer getränkt. Auf den Schwamm werden 3 in 20×SSC getränkte Whatman-Filterpapiere gleicher Größe gelegt, gefolgt vom Gel. Eventuell vorhandene Luftblasen werden entfernt und die Ränder des Gels mit Plastikfolie abgedeckt, um Kurzschlüsse zu vermeiden. Ein Stück Nylonmembran, das exakt der Gelgröße entspricht wird in destilliertem Wasser angefeuchtet, 10 Minuten in 20×SSC inkubiert und blasenfrei auf das Gel gelegt. Die Oberfläche der Membran wird mit 20×SSC bedeckt. Darauf werden 5 der Gelgröße entsprechende Blatt Whatman-Filterpapier plziert, gefolgt von einem 4 cm hohen Stapel Papierhandtücher der gleichen Größe, der mit einer Glasplatte beschwert wird. Nach dem Transfer über Nacht wird die Membran zweimal in 2×SSC gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und in einem Ofen 2 h bei 80°C getrocknet. Die Membran wird mit 6×SSC angefeuchtet und in einem Hybridisierungsröhrchen mit 1 ml Hybridisierungslösung/10 cm² 3 h lang bei 60°C im Rotations-Hybridisierungs-ofen prähybridisiert. Das erforderliche Volumen an Sonde (>10⁸ dpm/µg) wird in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Hybridisierungslösung wird durch ein gleiches Volumen an 2×SSC/0,1% SDS-Waschlösung ersetzt und 5 Min. bei RT unter Rotation inkubiert, anschließend wird dieser Schritt wiederholt. Es folgen zwei weitere

Waschschritte mit $0,2\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS. Bei Bedarf können noch zwei zusätzliche Waschschritte mit auf 42°C vorgewärmtem $0,2\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS 15 Min. bei 42°C sowie zwei analoge Waschschritte bei 68°C durchgeführt werden. Nachdem die Waschlösung entfernt ist wird die Membran zweimal in $2\times\text{SSC}$ bei Raumtemperatur gewaschen, abgetrocknet, in Plastikfolie gewickelt und auf Röntgenfilm exponiert.

2.8.11 Präparation von DNA und RNA aus Agarosegelen

Die Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des „Qiaex Gelextraction Kit“ des Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zur Wiedergewinnung von Nukleinsäuren aus „Low Melting Agarose“ Gelen (LMA) wird das Agarosestück 10 Min bei 65°C geschmolzen und anschließend zweimal mit 1 Vol. Phenol und einmal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert (2.8.1). Es erfolgt eine Fällung der Nukleinsäuren (2.8.2), die anschließend in 10-50 μl TE oder Wasser gelöst werden.

2.8.12 Restriktion

Alle Restriktionsverdauungen werden nach Angaben der Hersteller der Enzyme durchgeführt. Die benötigten Enzymmengen werden in Bezug auf die jeweilige spezifische Aktivität des Enzyms berechnet.

2.8.13 Ligation

Für eine Standard-Ligation werden 0,1 pmol DNA des geschnittenen Vektors sowie 0,3 pmol des zweiten DNA Fragments und eine Einheit T4 DNA Ligase (MBI Fermentas) in 10 μl Gesamtvolumen (incl. $1\times$ Ligasepuffer, MBI Fermentas) 2 h lang bei 22°C inkubiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert (2.8.3). Ligationen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden oder Ligationen von drei DNA-Fragmenten werden ün bei 15°C durchgeführt.

2.8.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für eine Klonierung bestimmte PCR-Produkte werden in der Regel mit Vent DNA Polymerase (New England Biolabs) hergestellt, da das Enzym eine 3'-5' Exonukleasefunktion besitzt und deshalb im Vergleich zur Taq-Polymerase 5-15 \times weniger Fehler in das PCR-Produkt einbaut.

2.8.14.1 Klonierungs-PCR (Standard)

In einem 100 μl Ansatz werden 100-500 ng Matrizen-DNA, 10 μl $10\times$ Vent-Puffer, 0,5 μM Sinn- und Gegensinn-Primer (100 pmol/ μl), 1 μl BSA (nicht acetyliert) und 10 μl dNTPs (2,5 pmol/ μl pro Nukleotid) miteinander gemischt und mit 30 μl Mineralöl als Dampfbarriere überschichtet. Die Amplifikationsreaktion erfolgt in einem Thermocycler (Trio Thermoblock, Biometra). Zunächst wird der Ansatz 5 Min. auf 95°C erhitzt, um die Matrizen-DNA zu denaturieren. Während des anschließenden drei Minuten dauernden Hybridisierungsschritts, bei 42°C werden 0,5 μl (10 U/ μl) Vent DNA-Polymerase zum Ansatz hinzugefügt („hot start“). Der erste Zyklus wird mit 5 Min. bei 72°C abgeschlossen. Die eigentliche Amplifikation der DNA-Sequenz erfolgt nach dem Temperaturprofil ($40'' 95^\circ\text{C}$, $60'' 48^\circ\text{C}$, $60'' 72^\circ\text{C}$) $\times 15$. Die Dauer des Polymerisationsschritts bei 72°C ist dabei von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Nach Ablauf der 15 Temperaturzyklen wird die Reaktion weitere 5 Min. bei 72°C inkubiert, um ein Maximum an doppelsträngigen Fragmenten zu erhalten. Die optimale Hybridisierungstemperatur muß für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden. Die Dauer des Verlängerungsschritts bei 72°C richtet sich nach der Länge des vervielfältigten Fragments (ca. 1 Min./1000 Basen). Alle wichtigen, mit PCR amplifizierten Fragmente wurden zur Sicherheit einer Sequenzanalyse unterzogen.

2.8.14.2 Ortsspezifische Mutagenese durch Kombinations-PCR

Diese auch „überlappende PCR“ genannte Methode nach Ho *et al.* (1989) wird dafür verwendet einzelne Basen auszutauschen, oder Deletionen und Insertionen in eine Sequenz einzufügen. Es können auch homologe oder heterologe DNA-Sequenzen verknüpft werden, falls keine passenden Restriktionsschnittstellen vorhanden sind. Für jede Mutagenese werden ein Sinn- und ein Gegensinn-Primer verwendet, die beide die veränderte Sequenz enthalten und zueinander komplementär sind. Für jede Mutation wird außerdem ein stromaufwärts liegender, sowie ein stromabwärts liegender, flankierender Primer benötigt.

In einem ersten Schritt werden zwei getrennte PCRs nach dem Standardprotokoll durchgeführt, die einerseits den mutierenden Sinn-Primer und den flankierenden stromabwärts-Primer und andererseits den mutierenden Gegensinn-Primer und den flankierenden Stromaufwärts-Primer enthalten. Als Matrize dient eine DNA mit der zu mutierenden Sequenz. Beide PCR-Produkte werden mit Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und als Matrize in eine zweite PCR eingesetzt, die mit den beiden flankierenden Primern nach Standardprotokoll durchgeführt wird. Dabei können die beiden eingesetzten PCR-Produkte über die Sequenz der Mutagenese-Primer miteinander hybridisieren und werden durch die DNA-Polymerase zu einem vollständigen Doppelstrang ergänzt. Dieses Produkt wird mit Hilfe der flankierenden Primer amplifiziert. Das Endprodukt wird durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und mit Standard-Klonierungstechniken weiterbearbeitet.

2.8.14.3 Ortsspezifische Mutagenese durch Kombination von „Primer-Extension“ und PCR

Die Methode nach Stappert *et al.* (1992) wird eingesetzt, wenn bis zu drei Mutationen in einer einzigen Reaktion in eine Zielsequenz eingeführt werden sollen. Die Einführung der Mutationen in die Zielsequenz beruht auf phosphorylierten Oligonukleotiden, die bis auf eine einzige Punktmutation homolog mit der Matrizensequenz sind, mit der sie hybridisiert werden.

Zuerst wird die Zielsequenz der Mutagenese aus dem Matrizenplasmid ausgeschnitten, um eine optimale Denaturierung zu gewährleisten. 0,5 pmol der Matrize werden alkalisch denaturiert, gefällt und abzentrifugiert (2.8.2). 1/10 der Matrizen-DNA wird zusammen mit 1 pmol eines stromaufwärts liegenden, nichtmutierenden Primers, der einen heterologen „Tag“-Anteil an seinem 5'-Ende besitzt und je 5 pmol phosphorylierten Mutagenese-Primern in 1×Sequense-Puffer 5 Min bei 65°C inkubiert. Nachdem der Ansatz 30 Min. lang bis auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird er auf 0,5 mM eines jeden dNTP's, 2 mM DTT, 1mM ATP, 10 mM Tris/Cl (pH 7,4) und 5 mM MgCl₂ in 20 µl Gesamtvolumen eingestellt. Anschließend werden 2,5 U T4 DNA-Polymerase und 1 U T4 DNA-Ligase (beides von MBI Fermentas) zur Reaktion hinzugegeben und 2 h bei 30°C inkubiert. Nicht eingebaute Oligonukleotide werden mit Hilfe einer Spin-Säule (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers von den Reaktionsprodukten abgetrennt. Jeweils 1/5 der gereinigten Produkte werden zusammen mit einem Primer, der dem heterologen Anteil des zuvor eingesetzten, stromaufwärts gelegenen Primers entspricht, und einem stromabwärts gelegenen Primer in eine PCR nach Standardprotokoll eingesetzt. Mit Hilfe des heterologen Primers werden in der PCR überwiegend mutierte Produkte amplifiziert. Nach einer Agarosegel-Reinigung können sie durch Standard-Klonierungstechniken in die Zielsequenz eingefügt werden.

2.8.15 DNA-Sequenzierung

Die PCR-Sequenzierungsreaktion wird mit dem „Thermo-Sequense Fluorescent Labelled Primer Sequencing Kit“ (7-deaza-dGTP) der Firma Amersham Life Sciences nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion werden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Jede der 4 µl umfassenden Reaktionen enthält zusätzlich 0,025 pmol IRD-41 markierten Primer (MWG Biotech) sowie 2,5 µl eines vorgefertigten Reaktionsmixes. Die PCR-Sequen-

zierungsreaktion wird in einem Biometra Trio-Thermoblock unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: (30“ 95°C, 45“ Hybridisierungstemperatur; 30“ 72°C) × 30. Die Hybridisierungstemperatur wird nach der folgenden Formel berechnet:

Hybridisierungstemperatur [°C] = (69,4 + 0,41 × %GC - 650 / Länge des Primers) + 3

Die Angabe %GC in der Formel bezieht sich dabei auf den prozentualen Anteil der Nukleotide G und C im verwendeten Primer. Analysiert werden die Reaktionen mit einem automatischen DNA-Sequenziergerät (DNA-4000) der Firma Li-Cor. Je 1 µl eines Sequenzieransatzes werden auf ein 41 cm Sequenzgel (6% Acrylamid) aufgetragen. Der Gellauf erfolgt ca. 8 h lang bei 1200 V, 35 mA und 50°C. Die erhaltenen Sequenzdaten werden mit dem Computerprogramm „Mac Molly Tetra“ der Firma Soft Gene (Berlin) ausgewertet.

2.8.16 Präparation von Gesamt-RNA

Bei der Präparation von RNA aus Patientenserum werden 350 µl Serum zusammen mit 1% SDS, 10 mM Tris (pH 8,0), 100 mM NaCl und 0,5 mg/ml Proteinase K in einem Gesamtvolumen von 900 µl zwei Stunden lang bei 56°C verdaut. Es folgen eine doppelte Phenol- und eine Chloroformextraktion mit anschließender Isopropanolfällung. Das mit 80% Ethanol gewaschene und luftgetrocknete Pellet wird zum Schluß in 5 µl Wasser gelöst.

Zur RNA-Präparation aus Lebergewebe oder kultivierten Zellen wird eine modifizierte Extraktionsmethode nach Chomczynski und Sacci (1987) eingesetzt. 100 mg Leber werden zusammen mit 1 ml Guanidin-Lösung in einem Glas-Teflonmörser homogenisiert. Alternativ dazu werden Zellen einer 35 mm Kulturschale mit 750 µl Guanidinlösung lysiert und die dabei freiwerdende chromosomale DNA durch mehrmaliges Pipettieren fragmentiert. Das Lysat wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, zuerst mit 1/10 Vol. 2 M Na-Acetat (pH 4,0), dann mit 1/10 Vol. wassergesättigtem Phenol und 1/Vol Chloroform gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wird die Probe zentrifugiert (10 Min., 13.000 UpM, 4°C) und die Oberphase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol 30 Min. bei -20°C gefällt und abzentrifugiert (10 Min., 13.000 UpM, 4°C). Wird RNA aus Leberzellen isoliert, folgt ein Waschschritt mit 4 M LiCl-Lösung, um Glykogen aus der Probe zu entfernen. Ansonsten wird das Pellet direkt in 300 µl Guanidin-Lösung gelöst, nach Zugabe von 300 µl Isopropanol 30 Min. bei -20°C gefällt und zentrifugiert (10 Min., 13.000 UpM, 4°C). Das Pellet wird in 75% Ethanol resuspendiert, 10 Min. gewaschen, luftgetrocknet, in Wasser gelöst und direkt weiterverwendet oder bei -70°C eingefroren.

2.8.17 Reverse Transkription von RNA mit anschließender Amplifikation der cDNA (RT-PCR)

Die reverse Transkription (RT) wird in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Zu üblicherweise 1 µg Gesamt-RNA werden 10 pmol eines spezifischen Oligonukleotides gegeben. Der Ansatz wird mit Wasser auf 5 µl aufgefüllt, mit Mineralöl überschichtet, 5 Min. auf 95°C erhitzt und auf 4°C (Standardreaktion) bzw. 48°C (strangspezifische Reaktion) abgekühlt. Es wird eine Mischung aus 2 µl „First Strand Buffer“ (Gibco-BRL), 1 µl 10 mM dNTP's, 1 µl 0,1 M DTT, 0,25 µl RNasin (Promega), 0,5 ml Wasser und 200 U MMLV-Reverse Transkriptase angesetzt und beim Standardansatz direkt bei 4°C, beim strangspezifischen Ansatz erst nach Erwärmen auf 48°C zum RNA-Primer-Gemisch hinzugefügt. Die RT-Reaktion wird 1 h bei 37°C (Standardreaktion) bzw. 48°C (strangspezifische Reaktion), anschließend 30 Min. bei 99°C inkubiert.

Die in der RT entstandene cDNA wird in der folgenden Polymerase-Kettenreaktion selektiv amplifiziert. Bei mit Taq-Polymerase durchgeführten Reaktionen wird der PCR-Ansatz auf 60 mM KCl, 15 mM Tris/Cl (pH 8,4), 2,6 mM MgCl₂ und 0,3% Tween 20 eingestellt. Dazu kommen je 50 pmol Sinn- und Gegensinn- Primer sowie 1,5 µl Taq-Polymerase (Eurobio, Perkin-Elmer) und Wasser, bis das Reaktionsvolumen 50 µl beträgt. Die PCR wird in einem

Omnigene Thermocycler (Hybaid) mit Deckelheizung und simuliertem Referenz-Reaktionsgefäß unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 3' 95°C, (30" 95°C, 1' 48-60°C; 1' 72°C) x **35**, 5' 72°C.

Bei PCR's mit den Korrekturlese-Polymerasen Vent und Pfu wird die cDNA zuerst mit Phenol und Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in einer Mischung aus 5 µl des speziellen vom Hersteller gelieferten Enzympuffers, je 10 pmol Sinn- und Gegensinn-Primer und 200 µM dNTP's in 49,5 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Während des ersten Hybridisierungsschritts werden 0,5 µl der Korrekturlese-Polymerase hinzugefügt („Hot Start“).

Ist die erste PCR nicht sensitiv genug, kann eine zweite Amplifikation mit Primern, die innerhalb des Produktes der ersten PCR binden, durchgeführt werden („nested-PCR“). Dabei werden 1/10 der ersten PCR in einem neuen Reaktionsgefäß mit je 50 pmol der internen Primer, 200 µM dNTPs und Taq DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt und entsprechend dem Zyklusprofil der ersten PCR amplifiziert.

2.8.18 „Long-distance RT-PCR“

Bei der reversen Transkription langer Fragmente von HCV-RNA kam das Enzym „Expand Reverse Transcriptase“ der Firma Boehringer Mannheim zum Einsatz, bei der es sich um eine genetisch veränderte Variante der MMLV-RT handelt. Das Enzym besitzt eine Punktmutation in der RNase H-Sequenz, wodurch die RNase H-Aktivität auf ein nicht mehr nachweisbares Maß reduziert wird. Verglichen mit herkömmlicher MMLV-RT lassen sich längere Transkripte herstellen, ferner ist die Menge erhaltener Vollängen-cDNA höher. Als Matrize dient 1 µg Gesamt-RNA aus Lebergewebe oder Serum (2.8.9), die zusammen mit 50 pmol RT-Primer in einem Gesamtvolumen von 9,5 µl 10 Min bei 65°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt wird. Zur RNA werden 8,5 µl eines aus 4 µl Reaktionspuffer (250 mM Tris/Cl pH 8,3; 200 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 2,5% Tween-20), 2 µl 10 mM Natrium-dNTP's (Boehringer Mannheim), 2 µl 0,1 M DTT und 0,5 µl RNasin (Promega) bestehenden Gemisches hinzugefügt. Nach Zugabe von 1 µl (50 U) Expand-RT wird die Reaktion 1 h bei 42°C, und 5 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Standardmäßig wird parallel zum RT-Ansatz eine DNA-Kontaminationskontrolle durchgeführt, bei der Wasser anstelle des Enzyms zum Reaktionsansatz gegeben wird. 1/8 der RT-Reaktion (2,5 µl) wird in die anschließende „Long-PCR“ eingesetzt.

Das für die „Long-PCR“ verwendete „Expand Long Template PCR System“ (Boehringer Mannheim) besteht aus einer Mischung der beiden thermostabilen DNA-Polymerasen Taq und Pwo. Es ist optimiert zur Herstellung langer DNA-Fragmente. Der Reaktionsansatz setzt sich aus 2,5 µl RT-Reaktion, 2,5 µl 10xPuffer 3 (500 mM Tris/Cl pH 9,2; 160 mM (NH₄)₂SO₄; 22,5 mM MgCl₂; 20% DMSO; 1% Tween-20), 5 µl 2,5 mM dNTP's, je 1 µl Sinn- und Gegensinn-Primer und 12,5 µl doppelt destilliertem Wasser zusammen. Der Ansatz wird mit 40 µl Mineralöl überschichtet und die HCV-cDNA in einem Omnigene-Thermocycler (Hybaid) mit simuliertem Referenzgefäß unter den folgenden Zyklusbedingungen spezifisch amplifiziert:

2' 94°C / (10" 94°C; 1'30" 48°C; 5' 68°C) x **10** / (10" 94°C; 1'30" 48°C; 5' 68°C) +10" pro Zyklus x **30** / 10' 68°C. Während des ersten Hybridisierungsschritts bei 48°C werden 0,5 µl „Expand“-Enzymmix zum Reaktionsansatz pipettiert („hot-start“). Die optimale Hybridisierungstemperatur kann je nach Primer variieren und muß deshalb individuell ermittelt werden. Da nach der ersten PCR noch keine Amplifikate im Agarosegel nachgewiesen werden können, schließt sich eine zweite „Long-PCR“ mit intern liegenden Primern an. Dabei wird 1/10 der ersten (2,5 µl) PCR als Matrize in die zweite PCR eingesetzt. Mit Ausnahme der DNA-Matrize und der Primer entspricht die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der ersten PCR. Der Temperaturzyklus der zweiten PCR ist wie folgt aufgebaut: 2' 94°C / (10" 94°C; 1'30" 54°C; 5' 68°C) x **10** / (10" 94°C; 1'30" 54°C; 5' 68°C) +10" pro Zyklus x **20** / 10' 68°C. Nach der PCR werden die Amplifikate mit einer Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen.

2.8.19 In-vitro Transkription

Als Matrize für die Produktion sogenannter „run-off“ Transkripte dient Plasmid-DNA, die vor der in-vitro Transkription mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert wird. Eine linearisierte Matrize bietet den Vorteil, daß sämtliche Transkripte über die gleiche, durch den Restriktionsschritt definierte Länge verfügen. Ein Transkriptions-Terminator zeigt im Gegensatz dazu immer eine gewisse „Durchlässigkeit“ und generiert neben den RNAs erwünschter Länge auch zu lange Transkripte. Die linearisierte Plasmid-DNA wird zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert und Ethanolpräzipitiert. In Wasser gelöste DNA kann dann in die Transkriptionsreaktion eingesetzt werden. Zur Erzeugung größerer Mengen von RNA hoher Qualität kommt das Protokoll des Herstellers (Promega) mit leichten Modifikationen zum Einsatz. Die Ausbeute beträgt ungefähr 1 µg *in-vitro* RNA pro µl Reaktionsansatz. Für einen Standardansatz werden 4 µl optimierter Transkriptionspuffer, 0,5 µl RNasin, 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 2,5 µl 25 mM NTP-Mischung und 50 U T7 oder T3 RNA-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Matrizen-DNA wird anschließend mit 1 U RNase freier DNase (Promega) 15 Min. lang bei 37°C abgebaut und danach einmal Phenol- und einmal Chloroformextrahiert. Um die *in-vitro* RNA von nicht eingebauten NTPs zu reinigen, werden 1/10 Vol. 3 M NaAc und 0,7 Vol. Isopropanol hinzugemischt und sofort 15 Min. bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in Wasser gelöst. Die Lagerung der *in-vitro* RNA erfolgt bei -70°C.

2.8.20 Reinigung von Transkriptionsreaktionen

Um Matrizen-DNA aus einer Transkriptionsreaktion zu entfernen ist in der Regel ein einfacher DNase-Verdau ausreichend. Dies ist allerdings nicht der Fall, wenn die verbleibende Menge an DNA-Matrize unter der Nachweisgrenze einer PCR bleiben muß. Bei einer Transfektion von *in-vitro* Transkripten mit anschließendem strangspezifischem PCR-Nachweis möglicher Replikationsprodukte führen die verbliebenen DNA-Reste zu einem falsch positiven Ergebnis. Um den benötigten höheren Reinheitsgrad der *in-vitro* Transkripte zu erhalten, werden verschiedene Reinigungsmethoden nacheinander eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine Extraktion mit saurem Phenol (Kedzierski und Porter, 1991) und einen DNase-Verdau, die beide für sich allein nicht in der Lage sind die DNA quantitativ zu entfernen, in Kombination allerdings ein ausreichendes Maß an Reinheit gewährleisten. Jeder Reinigungsschritt hat negative Auswirkungen in Bezug auf Ausbeute und Integrität der *in-vitro* RNA. Die Methode wird deshalb in ihrem modularen Aufbau den jeweiligen Ansprüchen an Reinheit, Integrität und Ausbeute angepaßt.

Für eine Phenolextraktion wird der 100 µl Transkriptionsansatz mit 35 µl 2 M NaAc (pH4,5) und Wasser auf 400 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 300 µl wassergesättigtem, saurem Phenol, wird der Ansatz kräftig gemischt, 10 Min auf Eis inkubiert und 10 Min. zentrifugiert (13.000 UpM, 4°C). 400 µl der Oberphase werden in ein frisches Gefäß überführt, mit 2,5 Vol. Ethanol 30 Min. bei -70°C präzipitiert und zentrifugiert (15', 13.000 UpM, 4°C). Von diesem Punkt an werden alle weiteren Schritte in einem Raum durchgeführt, der ebenso wie die verwendeten Geräte und Reagentien frei von kontaminierender Plasmid-DNA sein muß. Nachdem das Pellet in 100 µl Wasser gelöst ist, wird es mit 675 µl Guanidin-Lösung, 2 M NaAc (pH 4,5) und 500 µl Phenol (wassergesättigt)/Chloroform (5:1) intensiv gemischt, 10 Min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10', 13.000 Upm, 4°C). 600 µl der Oberphase werden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,7 Vol. Isopropanol gemischt, und zentrifugiert (15', 13.000 UpM, RT). Nachdem das Pellet bei Raumtemperatur mit 75% Ethanol gewaschen ist, wird es luftgetrocknet und in 120 µl Wasser gelöst.

Es folgt der DNase-Verdau, für den 40 µl Standard-Transkriptionspuffer, 20 µl 100 mM DTT, 400 U RNasin und 30 U RNase freie DNase zum Reaktionsansatz gegeben werden. Der Verdau wird 30 Min. bei 37°C inkubiert, anschließend mit 40 µl 3 M NaAc (pH 4,5), 160 µl Wasser

sowie 600 µl Phenol (wassergesättigt)/Chloroform (1:1) gemischt und zentrifugiert (10', 13.000 UpM, 4°C). 300 µl der Oberphase werden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 450 µl Phenol (wassergesättigt)/Chloroform (1:1) gemischt und zentrifugiert (10', 13.000 UpM, 4°C). Nachdem 250 µl Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt sind, erfolgt eine Extraktion mit 250 µl Chloroform und eine Präzipitation mit 625 µl Ethanol für 30 Min. bei -70°C mit anschließender Zentrifugation (15', 13.000 UpM, 4°C). Zum Schluß wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser gelöst. Die Reinheit der RNA wird anschließend durch Einsatz von 500 ng in einer PCR überprüft. Wenn nach 30 Zyklen kein Signal in einem Agarosegel zu erkennen ist, wird die *in-vitro* RNA als ausreichend sauber betrachtet. Die Verlustrate der *in-vitro* Transkripte während der Reinigungsprozedur beträgt zwischen 60 und 80%, zusätzlich geht der Anteil an Vollängentranskripten zurück. Verglichen mit einer Agarose-Gelreinigung sind bei der beschriebenen Methode Ausbeute und Integrität der RNA besser, sowie das Risiko einer RNase-Kontamination geringer.

Im Falle der Replikon-Konstrukte wird der Ansatz nach der *in-vitro* Transkription mit 2U RNase freier DNase 60 Minuten lang bei 37°C behandelt und anschließend wie zuvor beschrieben mit saurem Phenol, Phenol-Chloroform und Chloroform extrahiert. Nach einer Fällung wird die Integrität der RNA mit einem Formaldehyd-Agarosegel überprüft (2.8.9).

2.8.21 Transfektion eukaryontischer Zellen

2.8.21.1 Lipofektion

Zum Transfizieren eukaryontischer Zellen werden ca. 1 µg gereinigte RNA (2.8.20) in ein Gesamtvolumen von 100 µl Opti-MEM (Gibco-BRL) gegeben und mit 10-20 µl Lipofektamin (Gibco-BRL, 10 µl bei BHK- und HeLa-Zellen, 20 µl bei HepG2 und HuH-7-Zellen) die sich ebenfalls in 100 µl Opti-MEM befinden gemischt. Der Ansatz wird 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Vorbereitend werden 24 Stunden vor der Transfektion 3×10^5 Zellen pro Loch in komplettem DMEM-Medium in 6-Lochplatten ausgesät. Vor der Transfektion werden die Zellen zweimal mit Opti-MEM gewaschen. Der Transfektionsansatz wird mit Opti-MEM auf 1 ml aufgefüllt, auf die Zellen gegeben und 4 Stunden (bei 37°C) später gegen 3 ml komplettes DMEM ausgetauscht. Nach drei Tagen werden die Zellen trypsiniert und passagiert. Dabei werden 1/3 der Zellen in einer neuen Kulturschale ausgesät, der Rest wird für eine RNA-Präparation verwendet. Nach weiteren drei Tagen erfolgt die nächste Passage, bei der das FKS-haltige Serum gegen das serumfreie „Ham's F12 Medium“ ausgetauscht wird. Die Zellen werden 4 Tage bis zur nächsten Passage inkubiert, bei der wieder komplettes DMEM zum Einsatz kommt. Die weiteren Passagen der Zellen und der Wechsel zwischen serumhaltigem und Serumfreiem Medium werden in den gleichen Intervallen fortgeführt.

2.8.21.2 Elektroporation

Vorbereitend werden die Zielzellen trypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und die Zelldichte auf 10^7 /ml eingestellt. Zu 0,8 ml eisgekühlten Zellen werden ca. 15 µg RNA gemischt und der Ansatz anschließend in eine Elektroporationsküvette überführt. Darauf folgt die Elektroporation, wobei Stärke und Dauer des elektrischen Pulses von der verwendeten Zelllinie abhängig sind (BHK: doppelter Puls bei 1200V und 25 µF; HuH-7: einfacher Puls bei 300V und 960 µF). Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die elektroporierten Zellen in 10 ml Kulturmedium überführt und auf 3 Löcher einer 6-Lochplatte verteilt, bzw. in einer einzigen 10 cm Schale ausgesät.

Bei den Replikon-Transfektionen werden HuH-7 Zellen 24h nach der Aussaat in 10 cm Schalen mit G418 einer Endkonzentration von 1 mg/ml inkubiert. Das Medium wird anschließend zweimal pro Woche gewechselt. Nach 3-5 Wochen werden einzelne Kolonien sichtbar, die isoliert und unter gleichen Bedingungen passagiert werden.

2.9 Arbeiten mit Proteinen

2.9.1 In-vitro Translation

Die *in-vitro* Translation wird mit Kaninchen-Retikulozyten Lysat (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Reaktionsprodukte können mit SDS-PAGE (2.9.8) und Autoradiographie nachgewiesen werden.

2.9.2 Das Vacciniavirus T7-Proteinexpressionssystem

Nachfolgend sind die Teile des Vacciniavirus T7-Proteinexpressionssystems beschrieben, die während der Arbeiten zum Einsatz gekommen sind. Ein 50-80% konfluenter Zellrasen in einer 6-Lochplatte wird zweimal mit serumfreiem DMEM gewaschen und mit vTF7-3 Vacciniavirus (5pfu/Zelle) 1h lang bei RT infiziert. Anschließend werden die Zellen mit 10 µl Lipofektamin (Gibco-BRL) und 1-5 µg Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers infiziert. Nach 3h Inkubation bei 37°C werden die Zellen zweimal mit DMEM ohne Methionin gewaschen und 3h bei 37°C in 1 ml DMEM ohne FCS inklusive 100 µCi 35S-Methionin (Amersham) inkubiert. Das Markierungsmedium wird verworfen und die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 1 ml Lyse-Puffer (1×NPB incl. 1mM PMSF und 0,001 U Aprotinin) aufgeschlossen werden. Das Lysat wird in ein Eppendorfgesäß überführt, zentrifugiert (10', 13.000 UpM; 4°C) und der Überstand weiterverwendet.

2.9.3 Immunpräzipitation

Vor der eigentlichen Immunpräzipitation werden die Immunglobuline an Protein A-gekoppelter Agarose (Bio-Rad) immobilisiert. Dabei werden bei Einsatz einer 6-Lochschale 30 µl Protein-A Agarose dreimal mit 500 µl NPB gewaschen und zentrifugiert (8500 UpM). Zum Ansatz werden zwischen 6-8 µl Antiserum gegeben. Er wird mindestens 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler präinkubiert und dreimal mit NPB gewaschen. Bei nativem Antigen wird das geklärte Zellysate direkt zu den immobilisierten Antikörpern gegeben. Werden denaturierte Antigene verwendet, müssen sie zuvor präpariert werden. Dafür werden 100 µl 20% SDS und 50 µl gesättigte Trichloressigsäure (ccTCA) mit dem Lysat intensiv gemischt und mindestens 30 Min. auf Eis inkubiert. Das weiße Präzipitat wird abzentrifugiert (10', 10.000 UpM, 4°C), mit 300 µl 2% TCA gewaschen und in 40 µl Protein-Probenpuffer gelöst. Die Probe wird 5 Min. bei 95°C erhitzt, mit 1,2 ml NPB ohne SDS verdünnt und zu den auf Protein-A Agarose immobilisierten Immunglobulinen gegeben. Native bzw. denaturierte Antigene werden üN auf einem Schüttler inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wird durch dreimaliges Waschen aus dem Ansatz entfernt, der dann mit 70 µl Protein-Probenpuffergemisch und 5 Min bei 95°C inkubiert wird. Die Probe wird in einer SDS-PAGE (2.9.8) analysiert.

2.9.4 Proteinexpression mit dem Baculovirus-System

Das Baculovirus-System erlaubt die Expression großer Mengen von Fremdproteinen in Insektenzellen. Dabei werden zuerst rekombinante Bakuloviren hergestellt, mit denen in einem zweiten Schritt Insektenzellen infiziert werden, die dann das gewünschte Fremdprotein exprimieren.

Zur Herstellung rekombinanter Bakuloviren werden 10⁶ Sf9 Zellen pro 6-Lochplatte eine Stunde vor der Transfektion ausgesät, zweimal mit 1,5 ml Grace-Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Grace-Medium inkubiert. Pro Ansatz werden 0,2 µg linearisierte BacPAK6 DNA (Clontech) mit 1 µg Rekombinationsplasmid in 50 µl Gesamtvolumen mit 50 µl Lipofektin (1:1,5 mit Wasser verdünnt; Gibco-BRL) gemischt. Nach 10 Min. Inkubation bei RT wird der Transfektionsansatz tropfenweise auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Es folgt ein weiterer 5 Stunden dauernder Inkubationsschritt bei 27°C, bevor 3 ml Grace+ Medium hinzugegeben

werden. Die Zellen werden 5 Tage bei 27°C inkubiert, bevor die Hälfte des Kulturüberstandes zur Amplifikation der rekombinanten Viren in einer weiteren 6-Lochplatte verwendet wird. Ist nach 5 weiteren Tagen ein zytopathischer Effekt zu erkennen, wird eine 15 cm Kulturschale, die 2×10^7 Sf9-Zellen enthält mit dem kompletten Kulturüberstand infiziert. Für eine Plaquereinigung der rekombinanten Viren werden Sf9-Zellen in FCS-freiem Medium mit seriellen Verdünnungen des virushaltigen Kulturüberstandes infiziert und mit 0,5% LMA (Seaplaque GTG, Biozym) überschichtet. Die Plaques werden einzeln mit einer Pasteurpipette ausgestochen und auf Sf9-Zellen amplifiziert.

Zur Expression rekombinanter Proteine werden 4×10^7 High5 -Zellen in PBS gewaschen, in 3 ml Grace⁷ resuspendiert und mit 150-500 µl Viruslösung (ca. 10 PFU/Zelle) infiziert. Die Zellsuspension wird eine Stunde bei RT inkubiert, nach Zugabe von 12 ml Grace+ in 15 cm Kulturschalen ausgesät und 3 Tage bei 27°C inkubiert.

2.9.5 Proteinquantifizierung nach Lowry

Für die Proteinquantifizierung kommt eine modifizierte Version des Protokolls nach Lowry zum Einsatz (Peterson, 1977). Alle Messungen werden als Doppelwerte durchgeführt, in die zwischen 1 und 20 µg Protein eingesetzt werden. Eine entsprechende Menge der Proteinprobe wird mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt, mit 20 µl 0,15% Natriumdesoxycholat gemischt und 10 Min. bei RT inkubiert. Der Leerwert der Messung setzt sich aus den selben Komponenten zusammen mit der Ausnahme, daß er kein Protein enthält. Durch Zugabe von 20 µl 72% TCA werden die Proteine gefällt und anschließend abzentrifugiert (15', 3.000 g, RT). Nachdem das Pellet in 200 µl Wasser gelöst ist, wird es mit 200 µl frisch angesetzter CTC-Arbeitslösung gemischt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz werden 100 µl 20% Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugefügt und nach 30 Min. Inkubation die Extinktion der Proben im Vergleich mit dem Leerwert bei 750 nm bestimmt. Parallel dazu wird eine Reihe serieller Verdünnungen von BSA untersucht, mit deren Hilfe eine Eichkurve erstellt werden kann. Die Proteinmengen werden anhand der Eichkurve bestimmt.

2.9.6 Reinigung von NS5B aus Bakulovirus infizierten Zellen

Zwischen 2 und 4×10^7 mit einer Bakulovirus-Rekombinante infizierte High5-Zellen werden in Kulturmedium suspendiert, einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml LP I resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Sämtliche folgenden Arbeitsschritte werden sofern nicht anders vermerkt bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Es folgt eine Zentrifugation (10 Min., 13.000 UpM), deren Überstand (Ü1) verworfen und das Pellet in 1 ml LP II resuspendiert wird. Die Probe wird 5×10 Sekunden lang in einem Becherresonator (Branson 450 Sonifier, Beschallungsbecher mit Kühleinrichtung, Stufe 2) bei 7°C beschallt. Der sich nach 10 Min. Zentrifugation (13.000 UpM.) bildende Überstand (Ü2) wird erneut verworfen, das Pellet in 1 ml LP III gelöst, fünfmal 20 Sekunden lang im Becherresonator bei 7°C auf Stufe 3 beschallt und anschließend zentrifugiert (10 Min. 13.000 UpM). Der Überstand, Ü III genannt, wird auf eine mit 500 µl LP III inkubierte Ni-NTA Zentrifugationssäule (Qiagen) gegeben und 5 Min. bei 500 g zentrifugiert. Danach wird die Säule einmal mit LP III und zweimal mit S7-Puffer gewaschen. Um an die Säulenmatrix gebundene Nukleinsäuren zu hydrolysieren wird die Säule 20 Min. lang mit 500 µl S7-Puffer inklusive 30 Einheiten S7-Nuklease bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird eine Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl durchgeführt, um zu gewährleisten, daß das Puffer-Enzymgemisch gleichmäßig, über den vollen Zeitraum die Säule durchflutet. Die Säule wird dreimal mit 500 µl LP III incl. 50 mM Imidazol gewaschen und das gebundene Protein mit 200 µl LP III incl. 250 mM Imidazol sowie 2 mM EGTA eluiert und in Aliquots bei -70°C gelagert.

2.9.7 Funktionstest für die RNA-abhängige RNA-Polymerase Aktivität (RaRP) von NS5B

Die Reaktionsbedingungen des Aktivitätstests entsprechen weitestgehend der Beschreibung von Behrens *et al.* (1996). Der Test kann sowohl mit gereinigter Polymerase, als auch mit Zellextrakt durchgeführt werden. Die Polymerase wird mit 0,5 µg in-vitro transkribierter RNA, 2,5 µl 10×RaRP-Puffer, 0,25 µl 100 mM DTT, 20 U RNasin (Promega), 1-10 µCi α -³²P-NTP (3.000 Ci/mM, Amersham), und je 500 µM der verbleibenden drei Nukleotide in einem Gesamtvolumen von 25 µl 2 h bei 22°C inkubiert. Für Versuche in denen Vollängen-RNA zum Einsatz kommt, wird die Konzentration des radioaktiv markierten Nukleotids zusammen mit dem gleichen, nichtmarkierten Nukleotid auf 10 mM eingestellt. Die Polymerisationsreaktion wird durch Zugabe von 100 µg Kalbsthymus-DNA und 1 ml 10% TCA / 0,5% NaPPi gestoppt. Nach 30 Min. Inkubation wird die Probe durch einen GF/C Glasfaserfilter (Whatman) filtriert und fünfmal mit 1% TCA/0,1% NaPPi gewaschen. Der Filter wird getrocknet und in einem Szintillationsröhrchen zusammen mit 4 ml Rotiszint-2200 Szintillationsflüssigkeit (Roth, Karlsruhe) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckmann) ausgewertet.

2.9.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode ist geeignet zur Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 20 und 200 kDa und basiert auf dem Protokoll von Laemmli (1970). Im Rahmen dieser Arbeit wird standardmäßig eine EMBL V290 Gelapparatur mit 40 Spuren verwendet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels variiert je nach optimalem Trennbereich zwischen 8,5% und 12%. Das Sammelgel besitzt eine Acrylamidkonzentration von 4,5%. In Tabelle 2-3: ist die Zusammensetzung von Trenngelen verschiedener Acrylamidkonzentrationen aufgeführt.

Acrylamidkonzentration	8,5%	10%	11%	12,5%
Acrylamid-Stammlösung (30%) [ml]	12,75	15	16,5	18,75
Trenngel-Puffer [ml]	11,25	11,25	11,25	11,25
H ₂ O [ml]	20,91	17,91	17,16	14,91

Tabelle 2-3: Zusammensetzung von SDS-PAGE Trenngelen. Das Gesamtvolumen beträgt 45 ml. Die Polymerisation wird mit 1/1000 konzentrierter APS-Lösung (45 µl) und 1/1000 TEMED (45 µl) gestartet. Das Sammelgel (4,5% Acrylamid) setzt sich aus 3 ml Acrylamid-Stammlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer und 14,5 ml dest. Wasser zusammen.

Die Elektrophorese wird in 1×TGS Puffer bei 45 mA durchgeführt und dauert ungefähr 4-5 h. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die flüssigen Proben 1:1 mit Protein-Probenpuffer gemischt. Zellen und Proteinpellets werden direkt in Probenpuffer gelöst und werden 5 Min. bei 95°C denaturiert. Ist Imidazol im Ansatz vorhanden erfolgt die Denaturierung bei 37°C. Das Molekulargewicht der Proben kann in einem Vergleich mit einem parallel aufgetragenen Protein-Größenmarker (Biorad „Broad Range“) abgeschätzt werden. Nach dem Ende der Elektrophorese können die Proteine im Acrylamidgel mit Coomassie-Färbelösung angefärbt werden. Dafür wird das Trenngel 30 Min. in Coomassie-Färbelösung einer Temperatur von 65°C gefärbt, 30 Min. bei 65°C in Fixierlösung entfärbt und anschließend bei 75°C auf Whatman-Papier im Vakuum getrocknet. Bei immunpräzipitierten Proteinen wird das Gel nach dem Entfärben 20 Min. in 1 M Natriumsalicylat, 5% Glycerol, 50 mM Natriumphosphat (pH 7,2) inkubiert, getrocknet und eine Fluorographie auf einem Biomax-Röntgenfilm (Kodak) durchgeführt.

2.9.9 Western-Transfer

Zur weiteren Analyse können die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western-Transfer in einer halbtrockenen Elektrotransferapparatur (Keutz) auf eine Nitrozellulose (Schleicher und Schuell) oder PVDF-Membran (Polyscreen, NEN) übertragen werden. Der

Transferansatz ist wie folgt aufgebaut: Anode; 2 Lagen in Anodenpuffer 1 (300 mM Tris/Cl, pH 8,9; 20% Methanol) getränktes Whatman-Filterpapier; 1 Lage Anodenpuffer 2 (25 mM Tris/Cl pH 8,9; 20% Methanol) getränktes Filterpapier; Transfermembran (Nitrozellulose in Wasser; PVDF in Methanol angefeuchtet); Trenngel; 3 Lagen in Kathodenpuffer (25 mM Tris/Cl, pH 7,6; 20% Methanol; 30 mM 6-Amino-Hexansäure) getränktes Filterpapier; Kathode. Der Transfer erfolgt 1h lang bei 1 mA/cm² Geloberfläche. Die Membran wird 1 h in Blockierlösung (PBS incl. 5% Magermilchpulver und 1% Tween-20) inkubiert, die anschließend für mindestens 2 h durch den in Blockierlösung (1:1.000 bis 1:3.000) verdünnten primären Antikörper ersetzt wird. Die Membran wird dreimal 5 Min. in Blockierlösung gewaschen und mindestens 1 h mit dem 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper (Ziege- α -Kaninchen konjugiert mit alkalischer Phosphatase, Sigma) inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal in PBS incl. 0,1% Tween-20 gewaschen und 5 Min. in TBS (100 mM Tris/Cl pH (9,5); 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Färbereaktion erfolgt mit 10 ml TBS incl. 45 μ l NBT (100 mg/ml) und 35 μ l X-Phosphat (beides Boehringer Mannheim). An PVDF-Membranen gebundene Antikörper werden mit einer Chemilumineszenzreaktion (CDP-Star, Du Pont NEN) nach Angaben des Herstellers nachgewiesen.

2.9.10 Immunfluoreszenz

HuH-7 Zellen werden auf sterilen Deckgläschen in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach einer Fixierung mit -20°C kaltem 90% Aceton werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und der erste Antikörper (1:100 in PBS verdünnt) zu den Zellen gegeben. Die Inkubationsdauer beträgt 1-2 h. Danach werden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper (α Rabbit-FITC +1% Evans-Blau; 1:100 in PBS verdünnt) hinzugegeben wird. Die überschüssigen Antikörper werden nach einer Stunde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Nachweis der Antigene erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3 Ergebnisse

3.1 Das Konzept des *in vitro* Replikationssystems

Für viele Plusstrang-RNA Viren konnte gezeigt werden, daß die Transfektion von RNA eine Produktion infektiöser Viren erlaubt. Als Ersatz für native Genome dienten dabei *in vitro* transkribierte Genome (Boyer und Haenni, 1994; Conzelmann und Meyers, 1996). Nach der Transfektion wird das RNA-Inokulum in der Wirtszelle translatiert und das virale Polyprotein prozessiert. Daraufhin synthetisiert ein Replikationskomplex aus Plusstrang-RNA und Nichtstrukturproteinen Minusstrang-RNA. Ausgehend vom Minusstrang, der ein Replikationsintermediat darstellt, können neue Plusstrang Genome synthetisiert werden. Diese werden entweder in Viruspartikel verpackt und ausgeschleust, erneut für die Synthese von Minussträngen verwendet, oder translatiert. Ein kloniertes Genom eines RNA-Virus, das in der Lage war neue infektiöse Viruspartikel zu bilden wurde in diesem Zusammenhang als "infektiöse cDNA" bezeichnet. Das Konzept besitzt eine Reihe von Vorteilen. So sind die viralen Genome beliebig manipulierbar und in nahezu unbegrenzter Menge verfügbar. Zusätzlich werden alle frühen Schritte des Replikationszyklus bis zur Freisetzung des Genoms umgangen.

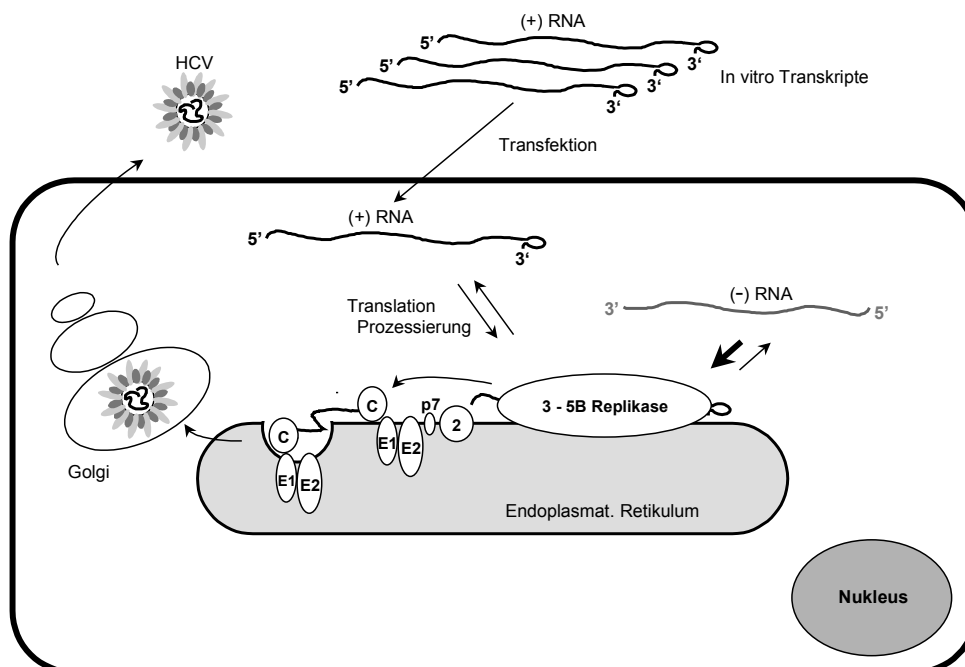


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des *in vitro* Replikationssystems für das HCV (verändert nach Bartenschlager, 2000). Ein Plasmidmolekül, das ein HCV-Komplettgenom enthält, wird linearisiert und *in vitro* transkribiert. Die Plusstrang *in vitro* Transkripte [(+) RNA] werden in Zielzellen transfiziert und dort translatiert. Der Replikationskomplex bildet sich aus Plusstrang-RNA und Nichtstrukturproteinen und beginnt zunächst mit der Synthese von Minusstrang-RNA [(-) RNA]. Die restlichen Schritte des Replikationszyklus entsprechen der natürlichen Infektion permissiver Zellen.

Beim Übertragen dieses bei anderen Plusstrangviren bewährten Konzepts auf das HCV ergibt sich allerdings ein grundsätzliches Problem. Für den Nachweis infektiöser Viruspartikel des HCV stehen weder ein Tiermodell noch ein Zellkultursystem zur Verfügung. Ein eindeutiger Nachweis viraler Genome im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen ist nicht möglich, denn selbst kleinste Reste des RNA-Inokulums können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der RNA-Minusstrang ist als intrazelluläres Intermediat das einzige Produkt, das ausschließlich während der Replikation entsteht. Sein Nachweis kann deshalb als erster Hinweis auf eine virale Replikation angesehen werden. Dies setzt allerdings voraus, daß die doppelsträngige Matrizen-DNA zuvor vollständig aus dem *in vitro* Transkriptionsansatz entfernt wurde, da die Nachweis-PCR sonst falsch positive Ergebnisse liefert. Ein vereinfachtes Versuchsschema ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

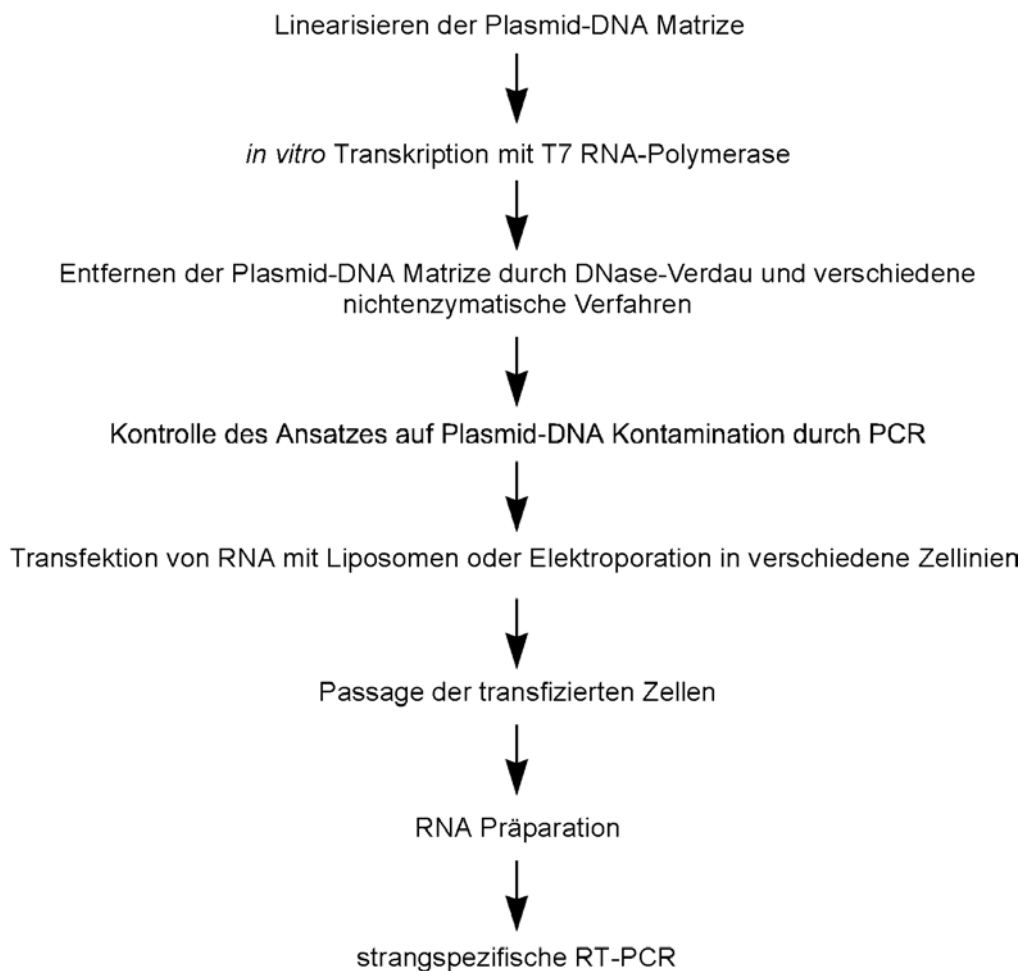


Abbildung 3-2: Vereinfachtes Versuchsschema zum Nachweis der Replikation *in vitro* transkribierter HCV-Genome.

3.1.1 Das Prinzip der strangspezifischen RT-PCR

Zum spezifischen Nachweis von Minusstrang RNA standen prinzipiell mehrere verschiedene Methoden zur Auswahl wie Northern Transfer, Rnase-Schutz-Experimente oder strangspezifische RT-PCR. Da völlig unbekannt war, mit welchen Mengen an Minusstrang-RNA in transfizierten Zellen zu rechnen war, wurde die strangspezifische RT-PCR als sensitivste aller Methoden ausgewählt. Das Prinzip der Methode bestand aus zwei voneinander getrennten Reaktionen, wobei nur die erste Teilreaktion die Strangspezifität begründete. Je nachdem, ob der Plus- oder der Minusstrang nachgewiesen werden sollte, wurden in der reversen Transkription (RT) Primer eingesetzt, die spezifisch an den jeweiligen Strang hybridisierten. Deshalb konnten cDNA Moleküle nur entstehen, wenn RNA entsprechender Polarität vorhanden war. In der zweiten Reaktion wurden die aus der RT hervorgegangenen cDNA Moleküle unabhängig von ihrer Polarität in einer PCR vervielfältigt. Dabei kam neben dem in der RT verwendeten Primer ein zweiter, an den Gegenstrang bindender Primer zum Einsatz. Endprodukt der Reaktion war ein PCR-Fragment definierter Größe, welches als Nachweis viraler RNA entsprechender Polarität zu werten war (Abbildung 3-3A). Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und gegebenenfalls Southern-Transfer mit anschließender Hybridisierung nachgewiesen.

In einer Reihe von Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß mit der RT-PCR unter Standardbedingungen entgegen der Theorie nahezu keine Strangspezifität zu erzielen war (Lanford et al., 1994; Lerat et al., 1996; Lohmann, 1997). Dies war auf eine unspezifische Initiation der cDNA-Synthese zurückzuführen, die unabhängig von dem in der RT-Reaktion eingesetzten Primer stattfand. Der Effekt trat besonders stark hervor, wenn zusätzlich zu den HCV *in vitro* Transkripten noch zelluläre Gesamt-RNA in den RT-Ansatz gemischt wurde. Mit der Zugabe zellulärer Gesamt-RNA sollten die Verhältnisse, die beim HCV-RNA Nachweis in transfizierten Zellen herrschen simuliert werden, da auch dort auf eine Gesamt-RNA Präparation zurückgegriffen werden mußte. In der zellulären Gesamt-RNA waren zahlreiche RNA-Moleküle unterschiedlichster Sequenz vorhanden, die als potentielle Primer zu einer unspezifischen Initiation der cDNA-Synthese führen konnten. Für eine weitere Art der unspezifischen Initiation konnte das HCV-Genom selbst verantwortlich sein. Der nichttranslatierte Bereich am 3'-Ende der viralen Sequenz konnte starke Sekundärstrukturen ausbilden und dadurch eine Selbstinitiation der reversen Transkription auslösen (Abbildung 3-3B). Unabhängig von ihrer Entstehung stellten die unspezifisch initiierten cDNA-Moleküle ein großes Problem dar. Da es sich dabei um revers transkribierte Teile des Plusstranges handelte konnten sie in einem

Nachweis von Minusstrang-RNA zu einem PCR-Produkt führen und somit die Präsenz von Minusstrang vortäuschen. Diese falsch positiven Ergebnisse der Nachweis-PCR wurden als "Minusstrang-Artefakte" bezeichnet.

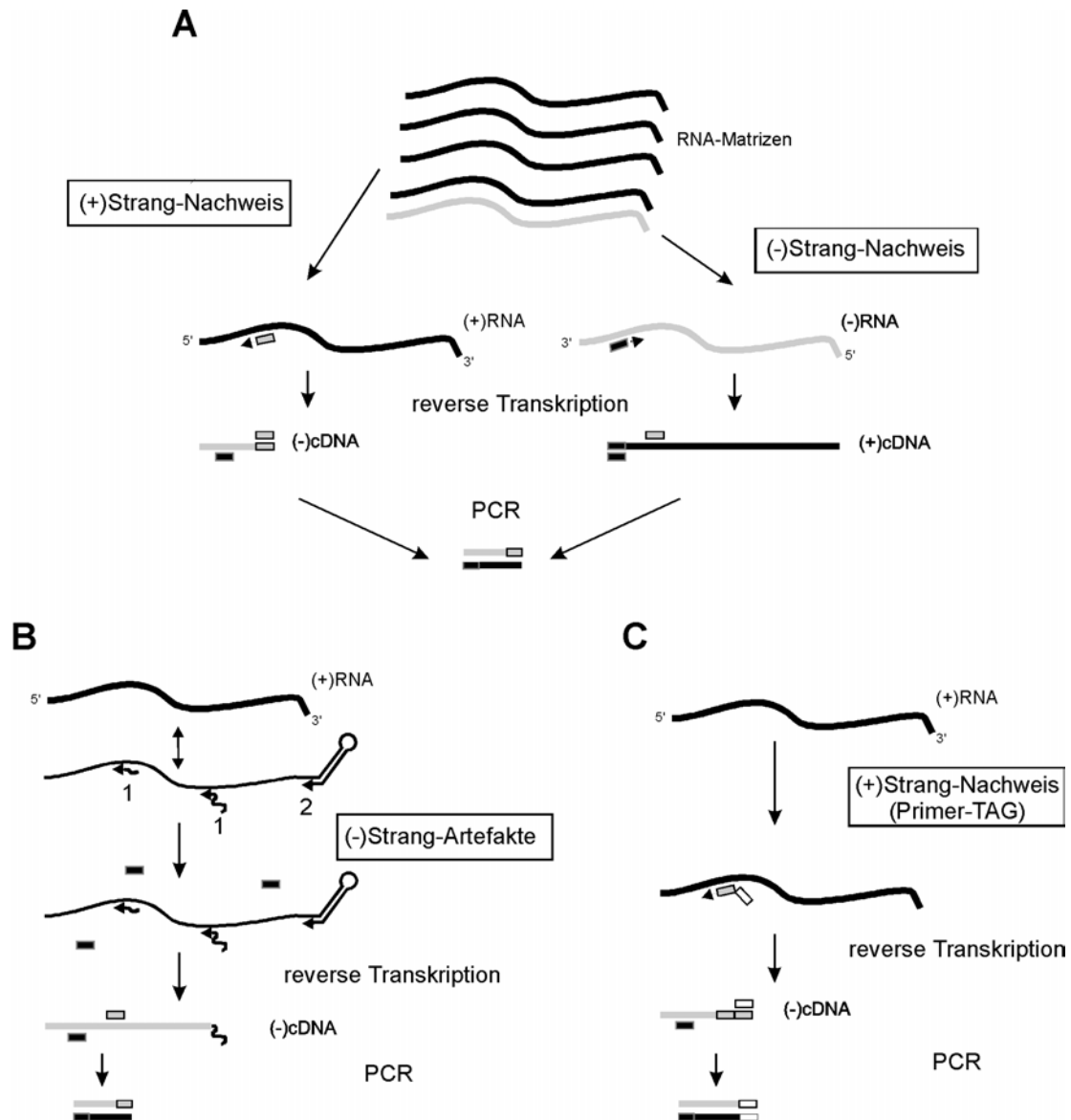


Abbildung 3-3: Prinzip der strangspezifischen RT-PCR und mögliche Ursachen unspezifischer Initiation (verändert nach Lohmann, 1997). (A) Mit der RT findet der strangspezifische Schritt der Reaktion statt. Das für die RT verwendete Primermolekül bindet spezifisch an eine Sequenz des viralen Plus- bzw. Minusstrangs und dient als Ausgangspunkt der cDNA-Synthese. In der PCR werden für den Nachweis von Minus- und Plusstrang cDNA die gleichen Primermoleküle verwendet. (B) Mögliche Ursachen von "Minusstrang-Artefakten" beim Minusstrang-Nachweis. Unspezifisch bindende exogene RNA-Moleküle (1) sowie Sekundärstrukturen am 3'-Ende der Matrizen-RNA (2) könnten die cDNA-Synthese auch auf RNA-Plussträngen initiieren. Diese unspezifisch initiierte cDNA würde entsprechend einer spezifisch initiierten in der PCR amplifiziert werden und würde das Vorhandensein von Minusstrang-RNA vortäuschen. (C) Prinzip der strangspezifischen PCR mit TAG-Primer. Der RT-Primer ist in zwei Teile gegliedert, einen HCV-spezifischen Teil (grau) und einen heterologen Teil (weiß). Der HCV-spezifische Teil des Primers initiiert die cDNA-Synthese. In der PCR kann der heterologe Teil des Primers zur Amplifikation der cDNA-Moleküle verwendet werden, da die cDNAs die heterologe Sequenz an ihrem 5'-Ende besitzen. RNA-Moleküle sind als Wellenlinien dargestellt, DNA-Moleküle als gerade Linien. Plusstränge sind schwarz, Minusstränge grau und Primer entsprechend ihrer Polarität als umrahmte Rechtecke dargestellt.

3.1.2 Etablierung des RNA-Minusstrangnachweises

Basierend auf Vorarbeiten von V. Lohmann in unserem Labor, wurden zur Detektion viraler RNA zwei bereits etablierte Systeme verwendet. Die erste Nachweismethode orientierte sich an der strangspezifischen RT-PCR mit einem sogenannten "TAG-Primer" nach Lanford *et al.* (1994). In der reversen Transkription wurde dabei ein Primer verwendet, dessen 3'-Hälfte spezifisch mit einem HCV RNA-Strang hybridisierte. Die 5'-Hälfte des Primers entsprach einer Markierungssequenz, die nicht im HCV-Genom vorkam und als "TAG" bezeichnet wurde. Durchgeführt wurde die RT bei 48°C statt bei 37°C, um zusätzlich Spezifität zu gewinnen. Als Primer für die PCR-Amplifikation der cDNAs wurde diese TAG-Sequenz und ein zweiter Gegenstrang-Primer eingesetzt. Theoretisch konnten in der Reaktion nur cDNAs amplifiziert werden, die an ihren 5'-Enden eine TAG-Sequenz besaßen, während alle unspezifisch, z.B. durch zelluläre RNAs initiierten cDNAs nicht amplifiziert werden sollten (Abbildung 3-3C). Die Zielregion der Primer lag innerhalb des NS5B zwischen Nukleotidposition 8467 und 8700. Diese Wahl erlaubte eine direkte Unterscheidung zwischen der Vollängensequenz und einer Deletionsmutante, die in den Transfektionsexperimenten als Negativkontrolle diente. Im Falle der Deletionsmutante war das aktive Zentrum der NS5B RNA-Polymerase entfernt worden. Dies führte zu einem verkürzten PCR-Produkt, mit dessen Hilfe die Deletionsmutante identifiziert werden konnte. Auch bei diesem Nachweissystem traten entgegen der Theorie falsch positive Minusstrang-Signale auf. Die Minusstrang-Artefakte waren in diesem System auf unverbrauchte RT-Primer (bestehend aus HCV und TAG-Anteil) zurückzuführen, die in der PCR noch vorhanden waren. Während der PCR konnten diese Primer an unspezifisch initiierte cDNA-Moleküle binden und damit zur Synthese von PCR-Produkten führen, die eine TAG-Sequenz an ihrem 5'-Ende besaßen. Dieser Effekt war von der Konzentration des TAG-Primers abhängig, von dem während der RT-Reaktion nicht alle Moleküle in cDNA eingebaut wurden. Deshalb konnte eine Verringerung der Primermenge in der RT die Minusstrang-Artefaktrate deutlich senken. Dieser Gewinn an Spezifität ging allerdings deutlich zu Lasten der Sensitivität, die bei ca. 10^6 RNA-Molekülen lag. Der spezifische Bereich des Minusstrangnachweises lag zwischen 3 und 4 \log_{10} -Stufen.

Das zweite strangspezifische Nachweisverfahren verwendete eine konventionelle RT-PCR, die den Bereich von Nukleotid 59 bis 349 in der konservierten 5'-NTR des HCV-Genoms zum Ziel hatte. Einzige Besonderheit des Protokolls war die bei 48°C durchgeführte reverse Transkription. Der strangspezifische Bereich lag hier im Mittel bei etwa 4 \log_{10} Stufen.

In Abbildung 3-4 ist exemplarisch ein strangspezifischer Nachweis von Plus- und Minusstrang RNA bei einer Verdünnungsreihe von *in vitro* Plusstrang-RNA gezeigt. Vom linearisierten Matrizenplasmid pFK 1-9605/B wurden *in vitro* "run-off"-Transkripte hergestellt und anschließend von Matrizen-DNA befreit. Je 1 µg Hintergrund-RNA wurde zusammen mit verschiedenen Mengen *in vitro* Plusstrang RNA in die strangspezifische RT-PCR eingesetzt. Die Menge an eingesetzter *in vitro* RNA reichte von 10 bis zu 10^{10} Molekülen. Der konventionelle RT-PCR Nachweis erfolgte am 5'-Ende des HCV-Genoms mit den Oligonukleotiden S59 und A 349, wobei die RT zur Steigerung der Strangspezifität bei 48°C stattfand. Parallel zu Plus- und Minusstrangnachweis wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, um HCV-DNA Kontaminationen zu identifizieren. Dabei wurde Wasser anstelle von *in vitro* RNA verwendet. Der Plusstrang konnte ab einer Anzahl von 10^4 Molekülen in der Probe nachgewiesen werden. Minusstrang-Artefakte tauchten ab einer Menge von 10^7 Plusstrang-Molekülen im Minusstrang-Nachweis auf. In der Kontrollreaktion konnte keine DNA-Kontamination der eingesetzten Matrizen-RNA nachgewiesen werden.

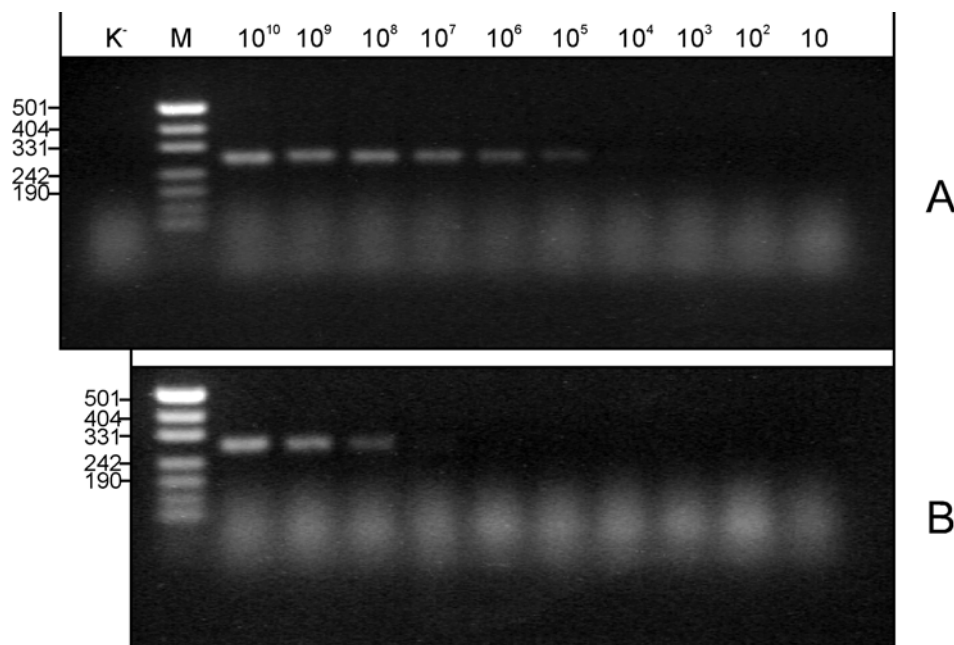


Abbildung 3-4: Sensitivität und Spezifität der strangspezifischen RT-PCR beim Nachweis von *in vitro* HCV-Plusstrang-RNA. Die konventionelle RT-PCR wurde mit den Oligonukleotiden S59 und A 349 am 5'-Ende des viralen Genoms durchgeführt, wobei A349 in der reversen Transkription zum Nachweis des Plusstrangs und S59 zum Nachweis des Minusstrangs dienten. In die RT bei 48°C wurden zwischen 10 und 10^{10} Moleküle *in vitro* RNA sowie je 1 µg zelluläre Gesamt-RNA aus Hepatomazellen eingesetzt. Die PCR umfaßte 35 Zyklen nach Standardprotokoll. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. (A) Plusstrang-Nachweis; (B) Minusstrang-Nachweis; K = DNA-Kontaminationskontrolle; M= DNA-Größenmarker.

Es standen damit zwei Verfahren zur Auswahl, die sich in puncto Spezifität und Sensitivität voneinander unterschieden. Die konventionelle RT-PCR am 5'-Ende des Genoms bei 48°C besaß die höhere Sensitivität, die RT-PCR mit TAG-Primern am 3'-Ende des Genoms bei 48°C hatte die größere absolute Spezifität (10^9 Plusstrang RNA-Moleküle verursachten keine Minusstrang-Artefakte).

Bei der Entstehung der Artefakte spielten mehrere schwer kontrollierbare Faktoren eine Rolle. Aus diesem Grund konnte der Nachweis viraler Minusstrang-RNA für sich allein nicht als Beweis einer Replikation angesehen werden. Vielmehr wurde eine Kombination mehrerer Kriterien herangezogen, um HCV-Replikation nachzuweisen:

1. der Nachweis viraler Minusstrang-RNA;
2. ein Vergleich zwischen dem potentiell replikationsfähigen Vollängengenom und einer nicht replikationsfähigen Deletionsmutante;
3. die Verweildauer viraler Plusstrang-RNA.

Diese Kriterien ermöglichten in der Summe eine zuverlässige Aussage, ob Replikation stattfand. Insbesondere mit der Deletionsmutante stand eine zuverlässige Negativkontrolle zur Verfügung. Dies war der entscheidende Vorteil der Transfektionsexperimente mit *in vitro* transkribierten RNA-Genomen gegenüber Infektionsexperimenten mit virushaltigem Patientenserum.

3.2 Klonierung des HCV-Vollängengenoms RB01

Zu Beginn der Arbeiten standen eine Reihe von HCV-Konstrukten zur Verfügung, welche einem Patientenserum mit der verschlüsselten Bezeichnung "H01" entstammten. Sie beinhalteten alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Teile des HCV-Genoms und waren bereits weitestgehend sequenziert. Die Funktionalität der klonierten Sequenz war soweit möglich zuvor bestätigt worden. Eine korrekte Prozessierung der Strukturproteine Core, E1 und E2 konnte nach transienter Expression *in vitro* nachgewiesen werden (Lohmann *et al.*, 1996). Auch beide viralen Proteasen (NS2 und NS3/4A) waren aktiv und spalteten an ihren entsprechenden Schnittstellen (Bartenschlager *et al.*, 1993). Die Aktivität der Helikasedomäne des NS3 konnte von einer kooperierenden Arbeitsgruppe bestätigt werden (H. Overton, persönliche Mitteilung). Über die Funktion der Nichtstrukturproteine NS4B und NS5A war nichts bekannt und für die vermutete Polymeraseaktivität des NS5B stand zu Beginn der Arbeiten noch kein Testsystem zur Verfügung. Zusammengefaßt ließ sich aus den vorhandenen Teilstücken ein HCV-Vollängengenom bekannter Sequenz konstruieren (Abbildung 3-5). Dieses Vollängengenom wurde RB01 genannt.

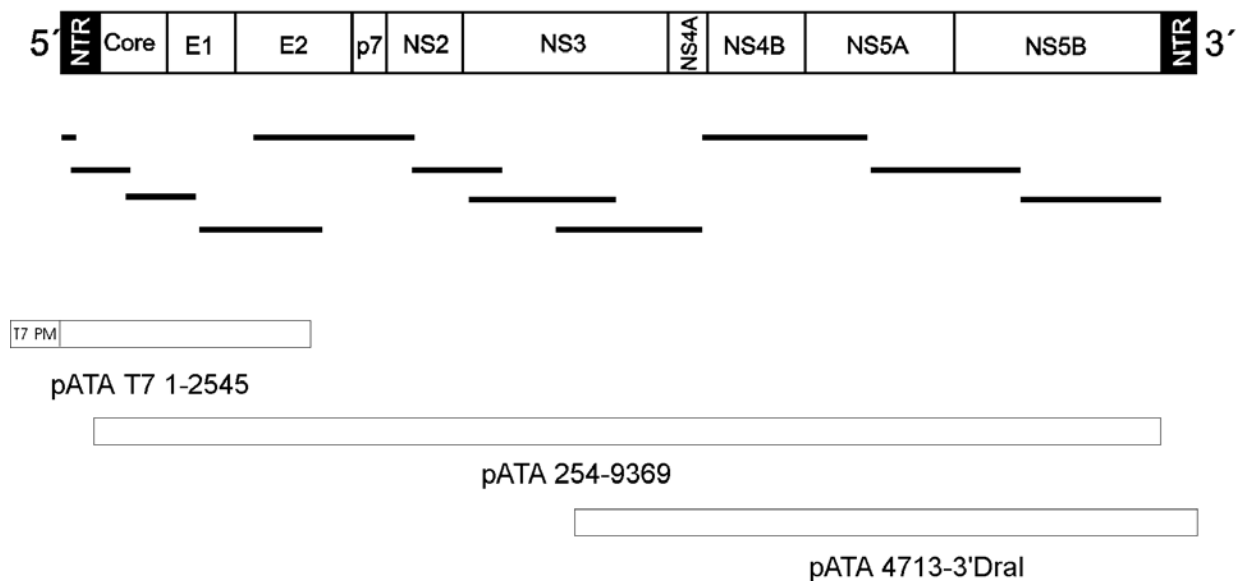


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der RT-PCR-Fragmente, die aus dem Serum eines chronisch infizierten Patienten isoliert wurden. Sie lieferten die Basis für alle weiteren Klonierungen auf dem Weg zum Vollängengenom RB01. Unter anderem entstanden die Zwischenkonstrukte pATA1-2545, pATA254-9369, und pATA4713-3'Dral, welche die Ausgangspunkte der unter 3.2.2 beschriebenen Konstruktion des Vollängengenoms waren. T7PM= T7-Promotor.

3.2.1 Konstruktion der Klonierungsvektoren pBT3 und pBT37

Ein wichtiger Problempunkt der geplanten Klonierung war die Entstehung unerwünschter Punktmutationen und Rekombinationsereignisse während der Amplifikation der Plasmide in *E. coli*. Deshalb sollte ein Vektor geringer Kopienzahl bei der Klonierung zum Einsatz kommen. Zusätzlich sollten ausschließlich rekombinationsdefiziente *E. coli*-Stämme verwendet werden. Zur Konstruktion eines maßgeschneiderten Klonierungsvektors geringer Kopienzahl wurde in den Ausgangsvektor pBR322 eine multiple Klonierungsstelle eingefügt. Des Weiteren mußte eine *SalI* Schnittstelle, die die Klonierungsprozedur störte aus dem Vektor entfernt werden. Zusätzlich sollten ein T7 und ein T3-Promotor die multiple Klonierungsstelle flankieren, um mit dem Plasmid *in vitro* Transkriptionen durchführen zu können.

Zur Herstellung des Klonierungsvektors pBT3 wurde das Plasmid pBR322 mit *EcoRI* und *NruI* restringiert, wobei ein Großteil des Tetrazyklinresistenzgens, welches eine *SalI* Schnittstelle enthielt entfernt wurde. Die überstehenden Enden des DNA-Doppelstrangs wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aufgefüllt. In den linearisierten Vektor wurde anschließend ein Teil der multiplen Klonierungsstelle von pBluescript SK II eingefügt. Hierfür wurde zuvor mittels PCR ein die gesamte multiple Klonierungsstelle umfassendes DNA-Fragment generiert, welches vom T3 bis zum T7 Promotor reichte. Anschließend konnte mit

einem SalI Verdau der T7 Promotor sowie ein Teil des Polylinkers entfernt werden. Dies war aus klonierungstechnischen Gründen notwendig, da der T7 Promotor zusammen mit dem 5'-Ende der Vollängensequenz direkt aus dem Plasmid pATA T7 1-2545 übernommen wurde. Nach Klenow-Behandlung und Ligation des Fragments in den vorbereiteten pBR 322 Vektor zeigte sich, daß die SalI Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle regeneriert war. Um diese unerwünschte Schnittstelle zu entfernen wurde ein weiterer Teil der multiplen Klonierungsstelle mit einem HindIII/SalI Verdau entfernt, die Überhänge mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt und der Vektor anschließend religiert. Eine Sequenzierung des Vektors ergab, daß die HindIII Schnittstelle nicht regeneriert war. Der Vektor pBT37 wurde parallel zum Vektor pBT3 kloniert. Im Gegensatz zu diesem enthielt er die komplette multiple Klonierungsstelle von pBluescript II SK.

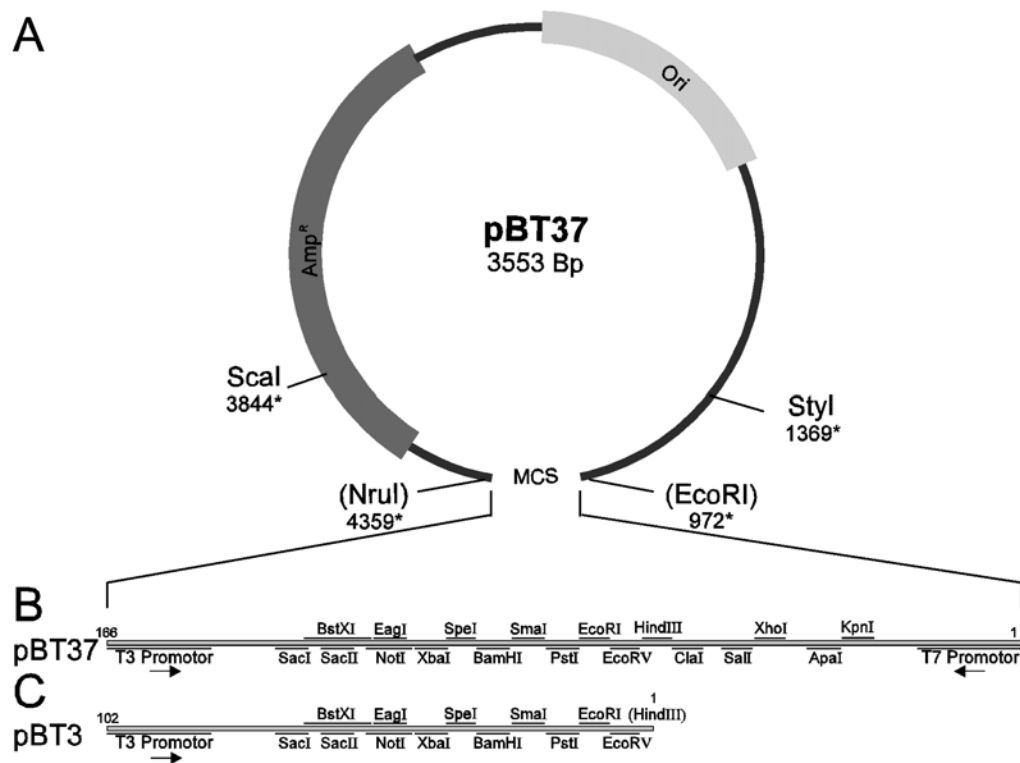


Abbildung 3-6: (A) Ansicht des Klonierungsvektors pBT37. Das Tetracyclingen des Ausgangsvektors pBR322 ist bei beiden Plasmiden durch die multiple Klonierungsstelle (MCS) ersetzt. Mit * gekennzeichnete Werte entsprechen der Position der Schnittstelle in der originären pBR322 Sequenz. (B) Beim Vektor pBT37 entspricht die MCS der des Vektors pBluescript II SK einschließlich der beiden flankierenden T3 und T7 Promotoren. Die MCS ist durch einen Balken schematisch dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind ihrer relativen Position in der MCS entsprechend dargestellt. (C) pBT3 enthält nur einen Teil der multiplen Klonierungsstelle von pBluescript II SK, der vom T3 Promotor bis zur ehemaligen HindIII Schnittstelle reicht. MCS, multiple Klonierungsstelle; Ori, Replikationsursprung; Amp^R, Ampicillinresistenz

3.2.2 Insertion des RB01-Genoms in den Vektor pBT

Zu Beginn der Klonierung lag das RB01-Genom auf drei verschiedene Konstrukte verteilt vor (Abbildung 3-5). Diese Ausgangsplasmide wurden über eine Reihe von Zwischenkonstrukten zur Rekonstitution des vollständigen RB01-Genoms verwendet. Als Empfänger dienten dabei die Klonierungsvektoren pBT3 und pBT37. Die Zusammensetzung der Vollängensequenz aus Teilstücken der Ausgangsvektoren ist in Abbildung 3-7 dargestellt.

Der vordere Bereich der RB01 Sequenz bis zur MluI Schnittstelle an Nukleotidposition 1729 einschließlich eines direkt vor die HCV-Sequenz fusionierten T7-Promotors entstammte dem Vektor pATA T7 1-2545. Der mittlere Teil der Vollängensequenz von der MluI Schnittstelle an Nukleotidposition 1729 bis zur NcoI-Schnittstelle an Position 8996 ging aus dem Vektor pATA 254-9369 hervor. Der hintere Bereich ab Position 8996 inklusive des 3'-Endes der Sequenz stammte aus dem Plasmid pATA 4713-3' DraI. Eine am 3'-Ende der viralen Sequenz gelegene DraI Schnittstelle (TTT/AAA) sollte die Herstellung von *in vitro* Transkripten mit authentischem 3'-Ende ermöglichen. Das 3'-Ende aller zu diesem Zeitpunkt bekannten Genome bestand aus einem kurzen nichttranslatierten Bereich gefolgt von einer variablen Anzahl von Uridinen. Dieser nichttranslatierte Bereich mit einem "Schwanz" von 15 Uridinen war mit dem offenen Leseraster von RB01 fusioniert. Damit umfaßte das RB01-Vollängengenom insgesamt 9428 Nukleotide. Parallel dazu entstand eine RB01-replikationsinaktive Variante mit einer Deletion von 10 Aminosäuren im NS5B. Die Deletion umfaßte das für eine Polymeraseaktivität notwendige "GDD"-Motiv. In diesem Fall stammte der Bereich von Nukleotidposition 4713 (SalI Schnittstelle) bis 8996 der HCV-Sequenz aus dem Vektor pATAT7 1-3'Δ5b.

Es standen damit ein potentiell replikationsfähiges Vollängengenom sowie eine Deletionsmutante zur Verfügung, die als Negativkontrolle eingesetzt werden konnte. Mit der Verwendung eines Vektors geringer Kopienzahl (pBT) sowie rekombinationsdefizienter Bakterienstämmen (DH5α; Sure™) wurde unerwünschten Rekombinationsereignissen während der Passagen in Bakterien vorgebeugt. Zusätzlich wurde die Integrität des offenen Leserasters durch eine *in vitro* Translation der *in vitro* transkribierten Vollängen-RNAs nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

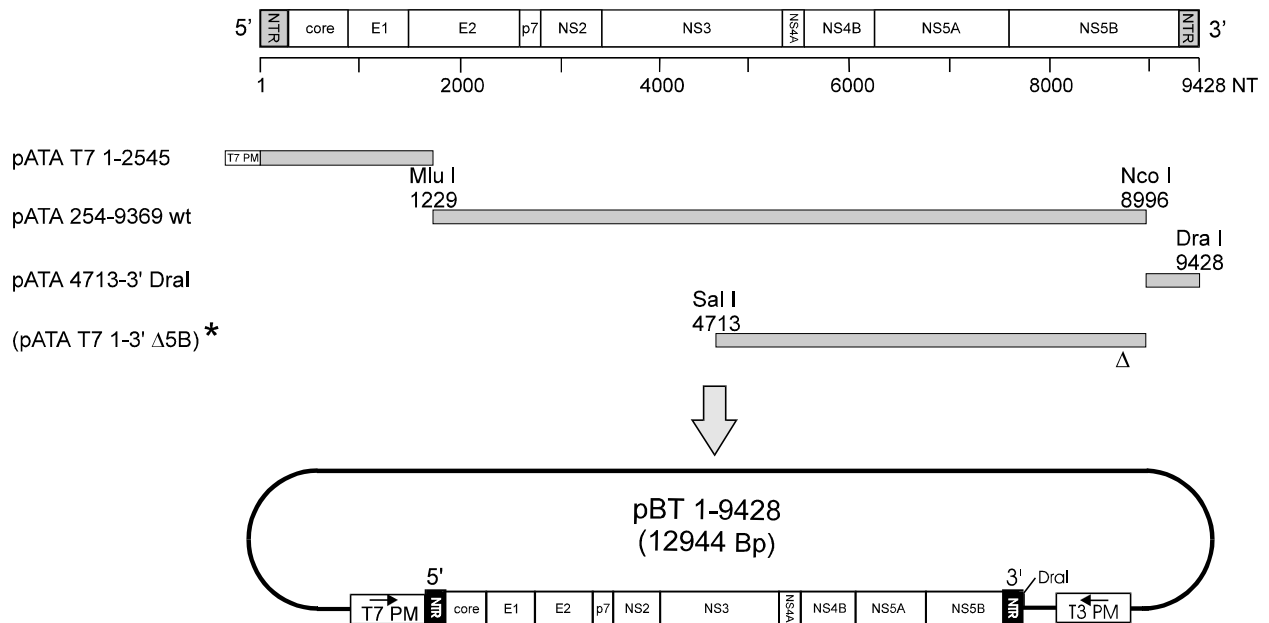


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vollängengenoms RB01 aus Teilstücken verschiedener Ausgangsplasmide und ihrer Lage innerhalb der HCV-Sequenz. Im oberen Teil der Grafik ist das HCV-Genom mit Struktur- und Nichtstrukturproteinen sowie 5'- und 3'-NTRs gezeigt. Der dem jeweiligen Ausgangsplasmid entsprechende Anteil am Vollängengenom RB01 ist durch einen grauen Querbalken symbolisiert. Verwendete Restriktionsenzyme sind jeweils mit Namen und Position im RB01-Genom angegeben. Der unten gezeigte Vektor pBT 1-9428 stellt das Endprodukt der Klonierung dar. Er enthält das Vollängengenom RB01. (T7-PM = T7-Promotor; T3-PM = T3-Promotor).

* symbolisiert einen aus dem Vektor pATA T7 1-3' Δ5B stammenden Teil des HCV-Genoms, durch den sich die Deletionsmutante (pBT 1-9428 Δ5B) vom RB01-Vollängengenom (pBT 1-9428) unterscheidet.

Δ symbolisiert eine Deletion im aktiven Zentrum von NS5B.

3.3 Transfektion *in vitro* transkribierter Vollängen-Genome

3.3.1 *In vitro* Transkription und Aufreinigung der *in vitro* RNAs

Mit Hilfe der Konstrukte pBT 1-9428 und pBT 1-9428 Δ5B konnten *in vitro* Transkripte des potentiell infektiösen Vollängengenoms sowie der Deletionsmutante hergestellt werden. Zu Beginn stand eine Linearisierung des entsprechenden Plasmids mit dem Restriktionsenzym DraI (TTT/AAA). Nach einer *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase besaßen die Vollängen-RNAs ein authentisches 3'-Poly U-Ende. Die Integrität der *in vitro* Transkripte wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese bestätigt. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem Schema in Abbildung 3-2. Als kritischer Punkt erwies sich die Entfernung der Matrizen-DNA nach der *in vitro* Transkription. Selbst geringste Mengen an cotransfizierter DNA konnten das Ergebnis sowohl in Bezug auf den Zeitraum der Nachweisbarkeit als auch den Minusstrang-Nachweis grob verfälschen. Alle *in vitro* RNAs wurden deshalb vor einer Transfektion mehreren Reinigungsschritten unterzogen und anschließend mit einer PCR auf Matrizen-DNA

Kontamination untersucht. Als bester Kompromiß zwischen Ausbeute, Reinheit und Integrität der RNA erwies sich eine Kombination mehrerer Extraktionen mit saurem Phenol und eines DNase-Verdau. Eine *in vitro* RNA wurde als kontaminationsfrei angesehen, wenn in einem halben Mikrogramm RNA nach 30 PCR-Zyklen kein Signal mehr in einem Ethidiumbromidgel nachweisbar war.

3.3.2 Transfektion von HuH7 und BHK Zellen mit Vollängen *in vitro* RNAs

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die Transfektionseffizienz für jede verwendete Zelllinie optimiert. Nach Transfektion eines Reporterplasmids (pCMV-lacZ) wurde die Anzahl an transfizierten Zellen ermittelt und die dabei erhaltenen Daten auf die Transfektion der *in vitro* RNA übertragen. Die transfizierten Zellen wurden nur einmal pro Woche passagiert. Dabei wurden sie nach der Passage zunächst 2 Tage lang in komplettem Medium und anschließend 5 Tage lang in serumfreiem Ham's F12 Medium kultiviert. Nach der Transfektion war es wichtig die Zellen möglichst selten zu passagieren, da anzunehmen war, daß die Menge replizierender HCV-RNA von Passage zu Passage verdünnt wurde. Zum strangspezifischen Nachweis viraler Plus- und Minusstrang-RNA kam die zuvor beschriebene RT-PCR mit TAG-Primern zum Einsatz. Zuerst wurden die *in vitro* RNAs der beiden Konstrukte pBT 1-9428 und pBT 1-9428 Δ 5B in BHK-21 Zellen getestet, da sich diese Zelllinie in den Vorversuchen als am besten transfizierbar erwies. Nach der Transfektion war die virale RNA drei Wochen lang nachweisbar. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Vollängen-RNA und Deletionsmutante festgestellt werden. Da den vom Hamster abstammenden BHK-21 Zellen möglicherweise ein für die HCV-Replikation essentieller zellulärer Faktor fehlte, wurde auch die humane Hepatomzelllinie HuH-7 mit den *in vitro* RNAs transfiziert. Die Ergebnisse mehrerer unabhängig voneinander durchgeführten Experimente entsprachen den in BHK-21 Zellen erzielten negativen Resultaten (siehe Tabelle 3-1).

Konstrukt	transfizierte Zelllinie	Minusstrang-Nachweis	Plusstrang-Nachweis	Nachweis eines Mengenunterschieds zwischen Vollängen-RNA und Deletionsmutante Δ 5b
pBT 1-9428	BHK-21	negativ	3 Wochen lang	nein
pBT 1-9428 Δ 5b	BHK-21	negativ	3 Wochen lang	nein
pBT 1-9428	HuH7	negativ	3-5 Wochen lang	nein
pBT 1-9428 Δ 5b	HuH7	negativ	3-5 Wochen lang	nein

Tabelle 3-1: Ergebnis der Transfektion von BHK-21 und HuH7-Zellen mit *in vitro* RNAs der beiden Konstrukte pBT 1-9428 und pBT 1-9428 Δ 5B.

3.4 Reklonierung des HCV-Genoms

Für die Replikationsblockade des Vollängengenoms RB01 konnte eine Reihe verschiedener Gründe verantwortlich sein:

- 1) nicht permissive Zelllinien,
- 2) ein falsches 5'-Ende,
- 3) fehlende Sequenzen am 3'-Ende,
- 4) Punktmutationen, da das Genom aus zahlreichen, durch RT-PCR mit Taq-Polymerase amplifizierten Teilstücken rekonstituiert wurde.

Vor der Durchführung weiterer Transfektionsexperimente wurden deshalb in Zusammenarbeit mit V. Lohmann eine Reihe von Veränderungen am Vollängengenom durchgeführt, um die möglichen Ursachen der mangelnden Replikationsfähigkeit des Genoms zu eliminieren.

Zwei das 5' und das 3'-Ende der Sequenz betreffende Modifikationen standen zu diesem Zeitpunkt bereits zur Verfügung. Das 5'-Ende der *in vitro* Transkripte besaß zwei zusätzliche Guanosin-Nukleotide, bedingt durch den authentischen T7-Promotor. Eine Verkürzung des T7-Promotors um diese zwei Guanosine erlaubte die Herstellung von Transkripten mit authentischem 5'-Ende wobei die Promotoraktivität um ca. 50% reduziert wurde. Etwa zeitgleich mit den zuvor beschriebenen Transfektionsexperimenten entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine zusätzliche Sequenz am 3'-Ende des HCV-Genoms (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1995, 1996). Es handelte sich dabei um eine 98 Nukleotide lange, stark konservierte Sequenz, die auf einen heterogenen poly(U)-Bereich etwa gleicher Länge folgte. Dieser Bereich am 3'-Ende der viralen Sequenz wurde als "X-Sequenz" bezeichnet. Die analoge 3'-Sequenz des H01-Genoms konnte aus Gesamt-RNA der infizierten Leber des Patienten kloniert werden (V. Lohmann, 1997).

Eine weitere Ursache der Replikationsdefizienz konnte in der ursprünglichen Klonierungsmethode des RB01 Genoms liegen. Da das HCV nur in geringen Mengen im Serum vorkam, mußte die virale Sequenz nach einer reversen Transkription der RNA in zwei aufeinanderfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen, "nested-PCR" genannt, vervielfältigt werden. Während dieser Reaktionen kam es entsprechend der Fehlerraten der verwendeten Enzyme "Reverse Transkriptase" (RT) und "Taq-Polymerase" (Taq-Pol.) zu Fehlinkorporationen in die amplifizierte Sequenz. Das Vollängengenom RB01 war ferner aus über 10 verschiedenen, unabhängig voneinander klonierten Subfragmenten rekonstituiert worden. Damit entsprach es mit Sicherheit keiner der real im Patienten vorkommenden Varianten des Virus sondern mußte vielmehr als künstliche Mischform mehrerer Varianten angesehen werden.

Deshalb wurde die Reklonierung des vollständigen Genoms beschlossen. Im Unterschied zur Erstklonierung sollte für die PCR eine thermostabile DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion und einer deutlich geringeren Fehlerrate als Taq-Polymerase eingesetzt werden. Außerdem sollten durch Verwendung eines Plasmids geringer Kopienzahl sowie rekombinationsdefizienter Bakterienstämme unerwünschte Mutations- und Rekombinationsereignisse ausgeschlossen werden. Es sollten möglichst lange Fragmente amplifiziert werden, die direkt über nur einmal in der RB01-Sequenz schneidende Restriktionsenzyme ins Vollängengenom kloniert werden konnten. Ein aus möglichst wenigen, langen Teilstücken bestehendes Vollängengenom spiegelt die tatsächlichen Verhältnisse der HCV-Sequenz eher wieder, als eine aus vielen kurzen Stücken zusammengesetzte Sequenz.

3.4.1 Konzept zur Reklonierung des HCV-Genoms mit "Korrekturlese"-Polymerasen

Um die Anzahl an Fehlinkorporationen möglichst gering zu halten, sollten anstelle von Taq-Polymerase die Enzyme Vent- oder Pfu-Polymerase eingesetzt werden. Mit Hilfe ihrer 3'→5' Exonukleasefunktion konnten beide Enzyme fehlerhaft eingebaute Nukleotide korrigieren und besaßen damit eine geringere Fehlerrate. Verglichen mit DNA-Polymerasen ohne Korrekturlesefunktion, kann die Genauigkeit der Korrekturlese-Polymerasen, abhängig von der verwendeten Mutationsanalyse bis um das Zehnfache höher liegen (Mattila *et al.*, 1991; Lundberg *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1996; Bracho *et al.*, 1998). Tabelle 3-2 stellt einen direkten Vergleich der Korrekturlese-Polymerasen Taq und Pfu dar.

Enzym	Taq-Polymerase	Pfu-Polymerase
Herkunft	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
3'→5' Exonuklease	nein	ja
Fehlerrate	$2,7 \times 10^{-5}$	3×10^{-6}

Tabelle 3-2: Vergleich der Fehlerraten thermostabiler DNA-Polymerasen. Die in der Tabelle angegebenen durchschnittlichen Fehlerraten beziehen sich auf die Mutationsfrequenz / Basenpaar / Temperaturzyklus. Die Fehlerrate wurde durch Sequenzierung rekombinanter Plasmide eines PCR-Produktes ermittelt (Bracho *et al.*, 1998).

RNA-Isolationen aus Serum erfolgten durch SDS/Proteinase K-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion. Die gereinigte und in Wasser gelöste RNA konnte direkt in die RT-Reaktion eingesetzt werden. Einer möglichen Inhibition der RT-Reaktion durch Substanzen innerhalb der RNA-Präparation konnte durch Einsatz verschiedener RNA-Verdünnungen vorgebeugt werden. Nach reverser Transkription erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und daran anschließend eine Ethanolpräzipitation. Der Reaktionspuffer der Probe wurde den Bedürfnissen einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion angepaßt und das

HCV-Genom in zwei aufeinanderfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen von je 35 Zyklen amplifiziert. Um eine größere Spezifität zu erreichen, wurde in der zweiten PCR ein intern liegender Primer eingesetzt ("nested-PCR"). Die Amplifikate wurden in einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.4.2 Nachweis von HCV-RNA in Patientenseren mittels RT-PCR mit "Korrekturlese"-Polymerasen

Zunächst sollte untersucht werden, ob solche Polymerasen überhaupt für die Amplifikation von HCV-RNA aus Serum geeignet waren. Hierzu wurden ein Bereich der 5'NTR und des Beginns der Core-Region als Zielsequenzen ausgewählt und mit Vent-Polymerase vervielfältigt. Als Ausgangsmaterial dienten vier verschiedene Seren chronisch HCV-infizierter Patienten. Die Seren H01 (Blutentnahme 21.6.91) und H03 (Blutentnahme 18.4.91) stammten von zwei Patienten aus Heidelberg. Serum H01 diente zuvor als Ausgangsmaterial für die Klonierung der Sequenz RB01. HCT-1 (Blutentnahme 6.6.95) und HCT-2 (Blutentnahme 11.7.95) wurden einem HCV-positiven Hämochromatosepatienten in Mainz entnommen. Die Virustiter der Seren H01 und HCT wurden mittels kompetitiver RT-PCR bestimmt und betragen 3×10^5 bzw. 7×10^5 Genomäquivalente pro ml. Da die RNA-Präparationen Substanzen enthalten konnten, die sich eventuell inhibitorisch auf nachfolgende Reaktionen auswirkten, wurden die einzelnen Proben unverdünnt, sowie zehnfach verdünnt in den RT-Reaktionen mit "Superscript-RT" (Promega) eingesetzt.

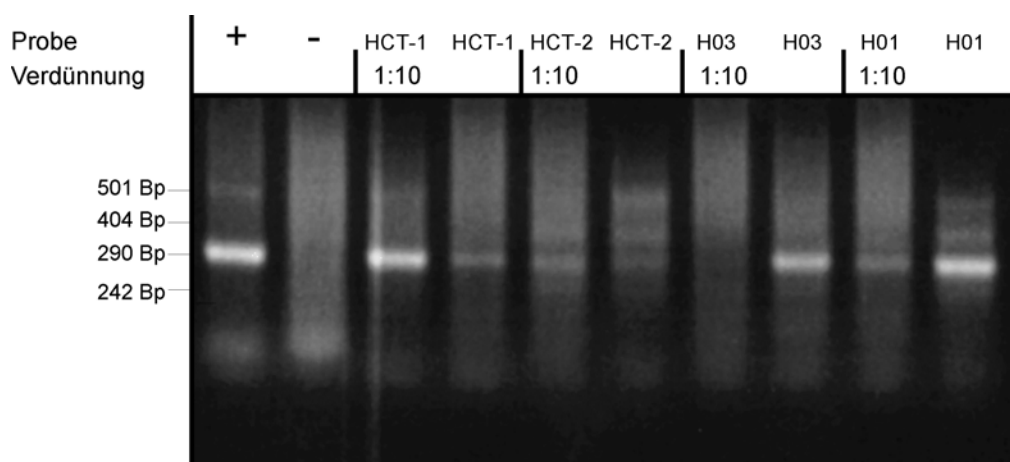


Abbildung 3-8: Nachweis des HCV in verschiedenen Patientenseren mit "nested" RT-PCR. Von den RNA-Präparationen aus 350 µl Serum wurden jeweils die Hälfte bzw. 1/20 in die RT-Reaktionen eingesetzt. In der ersten PCR kamen die Primer S59 und A578 zum Einsatz, in der zweiten PCR die Primer S59 und A349. Als thermostabile DNA-Polymerase diente Vent-Polymerase in der PCR, die bei 54°C mit 35 Reaktionszyklen durchgeführt wurde. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte mit einem 2%igen Agarosegel. Die Abbildung stellt das Ergebnis der zweiten PCR dar. Das HCV-spezifische Reaktionsprodukt hatte eine Größe von 290 Bp. Alle Spuren sind mit dem Namen des verwendeten Serums sowie der eingesetzten Serummenge beschriftet.

+ = Positivkontrolle (ca. 1000 Moleküle pBT1-9428Dra1Δ5B in vitro RNA), - = Negativkontrolle.

Nach der ersten PCR waren keine spezifischen PCR-Produkte im Agarosegel zu erkennen. Erst mit der "nested"-PCR konnten die 290 Bp langen HCV-spezifischen Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung 3-8). Das HCV-spezifische Produkt konnte in allen vier Patientenseren nachgewiesen werden, im Serum HCT-2 allerdings nur sehr schwach. Dies ließ darauf schließen, daß der HCV-Titer des Hämochromatosepatienten in der Zeit zwischen den Blutentnahmen gesunken war. Beide RNA-Präparationen der Seren HCT-1 und HCT-2 enthielten inhibitorische Substanzen, welche die Ausbeute der RT-PCR bei unverdünnt eingesetzter RNA verringerten. Im Falle der Seren H01 und H03 war ein deutlicher Verdünnungseffekt in Bezug auf die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt bei den 1/10 verdünnten RNA-Präparationen zu beobachten. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß sich mit Vent-Polymerase Teile des HCV-Genoms aus verschiedenen Patientenseren, einschließlich des als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungen vorgesehenen H01-Serums amplifizieren ließen.

Auf dieser Grundlage aufbauend wurde die PCR optimiert. Mit einer Steigerung der Hybridisierungstemperatur ließ sich kein Spezifitätsgewinn erzielen. Ein fünffache Verringerung der Primerkonzentration führte jedoch zu einer Reduktion der unspezifischen Produkte. Parallel zur Vent-Polymerase wurden mit Pfu-Polymerase vergleichbare Ergebnisse bei der Amplifikation der HCV-Genomfragmente erzielt (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 Test der Klonierungsprimer

Das Ziel der Klonierungsstrategie war es möglichst großer Teilstücke der HCV-Sequenz zu amplifizieren und diese über nur einmal vorhandene Restriktionsschnittstellen direkt in die bereits bekannte RB01-Sequenz zu integrieren. Hierfür wurden drei verschiedene Sätze neuer Primermoleküle ausgewählt. Ihrer Lage im HCV-Genom entsprechend ergaben sich PCR-Produkte von maximal 2,4 kb Länge. Theoretisch konnte so ein Großteil des HCV-Genoms, der vom Ende des NS2 bis zum Anfang von NS5B reichte, gegen drei hintereinanderliegende PCR-Fragmente ausgetauscht werden. Dieser Bereich umfaßte fast den gesamten hypothetischen Replikationskomplex, der sich wahrscheinlich aus den viralen Nichtstrukturproteinen zusammensetzt (Abbildung 3-9).

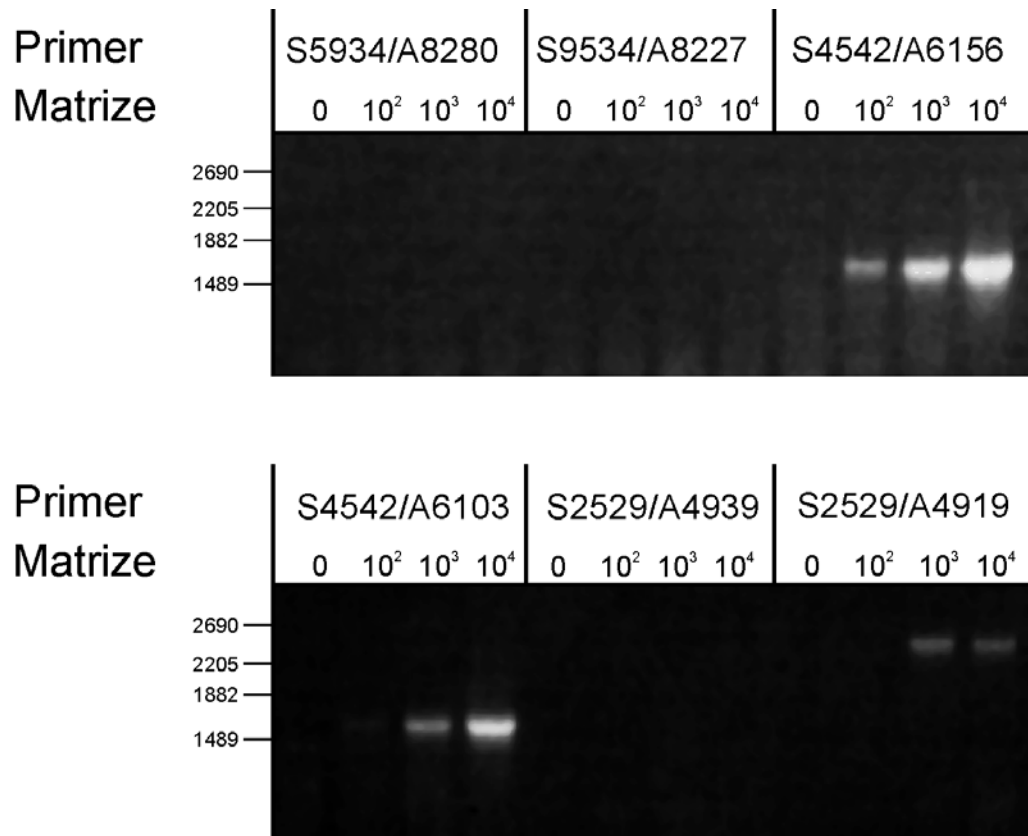


Abbildung 3-10: Test der Klonierungsprimer in der PCR mit Pfu-Polymerase. Als Matrize diente eine Verdünnungsreihe von pTM 330-9369 Plasmid-DNA (0; 10²; 10³; 10⁴ Moleküle). Die PCR umfaßte 35 Reaktionszyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 54°C. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. Die Spuren sind mit den Namen der eingesetzten Primer sowie der eingesetzten Matrizenmenge beschriftet. Die Zahlen am linken Rand der Gele repräsentieren die Positionen des DNA-Größenmarkers.

Bei der PCR mit Korrekturlesepolymerasen traten charakteristische Probleme auf. Neben einer stark variierenden Ausbeute machte eine große Menge unspezifisch amplifizierter Nebenprodukte einzelne Reaktionen nur schwer reproduzierbar. Wurde die Hybridisierungstemperatur von 54°C auf 56 bzw. 58°C erhöht, brachte dies nur einen geringen Gewinn an Spezifität, dafür sank die Ausbeute stark ab (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt war die PCR-Amplifikation von DNA-Sequenzen größer als 1,5 kb mit Korrekturlese-Polymerasen im Gegensatz zu kurzen Fragmenten sehr problematisch. Vor diesem Hintergrund erwies sich das aufwendige, aus reverser Transkription und zwei PCRs bestehende Amplifikationsprotokoll als nicht praktikabel. Da außerdem nur 5 der 9 vorgesehenen Klonierungsprimer für die PCR geeignet waren, mußte konsequenterweise an diesem Punkt die gesamte Klonierungsstrategie neu überdacht werden.

3.4.4 Klonierung des Hepatitis-C Virusgenoms aus Lebergewebe des Patienten H01 mittels "Long-distance RT-PCR"

Alternativ zur Amplifikation mittels Korrekturlese-Polymerase kam die "Long-distance RT-PCR" (Barnes *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994) in Betracht, die die Amplifikation von DNA-Sequenzen bis zu 35 kb bei geringer Fehlerrate ermöglicht. Die Methode unterscheidet sich in mehreren Punkten von einer herkömmlichen PCR. Der Hauptunterschied besteht in der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase. Wird bei der klassischen PCR nur ein einziges Enzym eingesetzt, benutzt man für die "long-distance PCR" ein Gemisch aus Taq-Polymerase sowie einer geringen Menge Korrekturlese-Polymerase. Der Methode liegt die Theorie zugrunde, daß eine fehlerhafte Basenpaarung am 3'-Ende eines Amplifikats zu einem Abbruch der PCR führt und damit die Länge der PCR-Produkte limitiert. Eine Korrekturlese-Polymerase kann den Fehler mit Hilfe ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität korrigieren und die Taq-Polymerase danach mit der Strangsynthese fortfahren. Ein weiterer Unterschied betrifft den Temperaturzyklus der Reaktion. Ein möglichst kurzer Denaturierungsschritt bei abgesenkter Temperatur soll Strangbrüche der Matrize vermeiden, da Strangbrüche um so stärker in Gewicht fallen, je länger das Produkt ist. Außerdem wird der pH-Wert des Reaktionspuffers auf pH9 erhöht, um die Bindung von Nukleotiden an den neuen Strang zu erleichtern. Die erfolgreichsten Protokolle kombinieren Modifikationen des Standard-PCR-Puffers und des Temperaturzyklusprofils mit dem 2-Polymerasesystem. Aufgrund dieser Vorteile wurde ein verändertes Klonierungskonzept auf Basis der "Long-distance PCR" entwickelt.

Die erste Änderung der Klonierungsstrategie betraf das Ausgangsmaterial. Das zur Verfügung stehende H01-Patientenserum besaß mit 10^5 RNA-Molekülen/ml einen vergleichsweise niedrigen Virustiter. Für eine erfolgreiche Amplifikation viraler Sequenzen in der "Long-distance PCR" war eine ausreichend hohe Menge an Virusgenomen im Ausgangsmaterial aber zwingend notwendig. Deshalb diente von diesem Zeitpunkt an Lebergewebe des selben Patienten als Ausgangsmaterial der RNA-Präparation, denn am Hauptort der HCV-Replikation sollten größere Mengen viraler RNA als im Serum zu finden sein. Die Isolierung der RNA aus Lebergewebe erfolgte mit kleinen Abweichungen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Aufgrund inhibitorischer Substanzen in der RNA-Präparation ließ sich die Virusmenge im Lebergewebe nicht mit quantitativer PCR bestimmen.

In der reversen Transkription wurde das Enzym "Expand Reverse Transkriptase" (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Es zeichnete sich durch das Fehlen einer RNase H-Aktivität aus und

ermöglichte damit die Synthese längerer cDNAs als bei herkömmlichen reversen Transkriptasen mit RNase H-Aktivität.

Theoretisch erlaubte der Einsatz der "Long-distance RT-PCR" die Amplifikation längerer Bereiche des HCV-Genoms, als im alten Klonierungskonzept vorgesehen war. Deshalb sollte versucht werden das gesamte offene Leseraster des Genoms in nur zwei Hälften zu isolieren. Für die reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktionen konnte zum Teil auf bereits erprobte Primer zurückgegriffen werden. Neu waren lediglich die in der 3'-Region des Genoms hybridisierenden Oligonukleotide A9413 und A9386. Alle in der "Long-distance RT-PCR" eingesetzten Primer sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Reaktion	Primer RT	Primer 1.PCR	Primer 2.PCR
Amplifikation der vorderen Genomhälfte (6044 Bp)	A6156	S59; A6156	S59; A6103
Amplifikation der hinteren Genomhälfte (4844 Bp)	A9413	S4542; A9413	S4542; A9386

Tabelle 3-4: Verwendete Klonierungsprimer der "Long-distance RT-PCR".

Parallel zum alten Klonierungskonzept sollten die cDNAs der beiden Genomhälften nach der reversen Transkription in zwei aufeinanderfolgenden "Long- distance PCR"s vervielfältigt werden. Das hierfür verwendete "Expand High Fidelity PCR System" (Boehringer Mannheim) basierte auf einer Mischung der thermostabilen DNA-Polymerasen Taq und Pwo. Mit ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität gewährleistete die Pwo-Polymerase eine dreimal höhere Genauigkeit der DNA-Synthese verglichen mit Taq-Polymerase.

Unter Standardbedingungen erwies sich die Amplifikation der 5-6 kb langen HCV-Genomhälften als unmöglich und erforderte deshalb eine Optimierung des Reaktionspuffers. Nach Zugabe von 5% Dimethylsulfoxid (DMSO), in den Reaktionspuffer gelang es die vordere Genomhälfte zu vervielfältigen (Abbildung 3-11A, Spur 3). DMSO destabilisiert Sekundärstrukturen in der HCV-Sequenz, die sich vor allem an deren 5'- und 3'-Ende bilden und die Taq-Polymerase bei der Doppelstrangsynthese behindern (Sidhu et al., 1996). Ausbeute und Spezifität der Reaktion waren relativ gering und konnten auch durch eine Steigerung der Hybridisierungstemperatur nicht verbessert werden. Mit einem "Southern-Transfer" Experiment wurde gezeigt, daß eine HCV-spezifische Sonde mit dem 6 kb großen PCR-Produkt hybridisierte. Bei der Sonde handelte es sich um ein Digoxigenin-markiertes Oligonukleotid (S4833), welches spezifisch an eine Sequenz im 3'-Terminus des NS3 codierenden Bereichs hybridisierte (Abbildung 3-11B).

Die geringe Ausbeute und niedrige Spezifität legten den Schluß nahe, daß die "Long- distance PCR" mit dem "Expand High Fidelity PCR System" in Kombination mit einer reversen

Transkription bei Amplifikaten mit einer Länge von ca. 5 kb an ihre Leistungsgrenze stieß. Mit steigender Produktlänge verlor die Methode zunehmend an Effizienz.

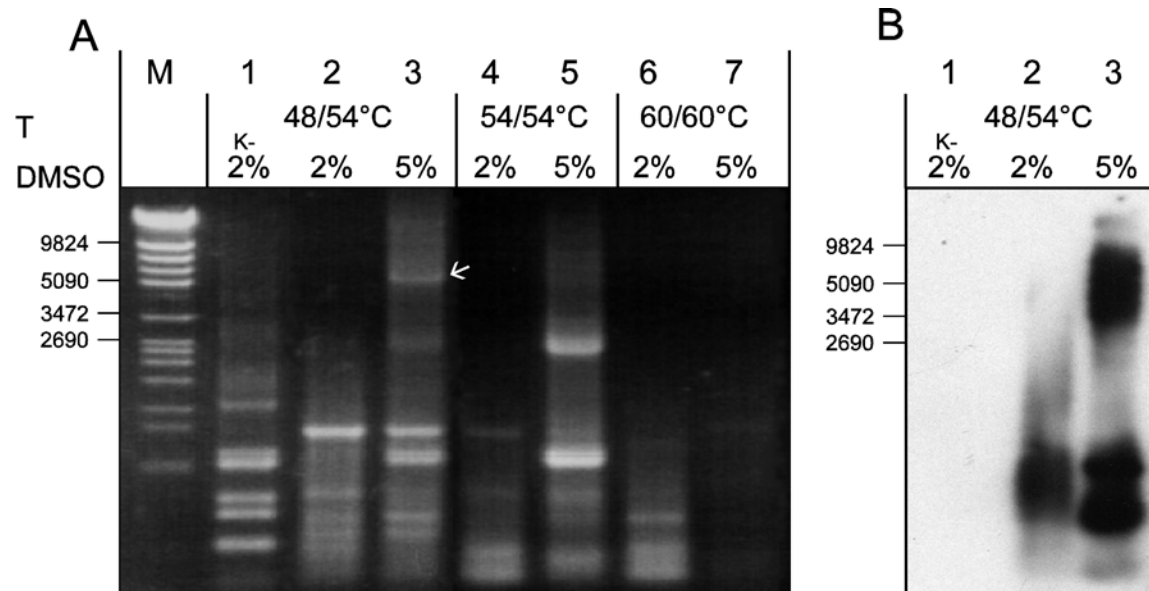


Abbildung 3-11: (A) Optimierung der Reaktionsbedingungen der "Long RT-PCR". Zur Amplifikation der vorderen HCV-Genomhälfte wurden je 0,5µg Leber-RNA in die reverse Transkription mit dem Primer A6156 eingesetzt. Nach nested PCR mit den Primerkombinationen S59/A6156 und S59/A6103 zu je 30 Zyklen wurden die Produkte in einem 1%ige Agarosegel aufgetrennt. Das der vorderen Genomhälfte entsprechende 6044 Bp lange Produkt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Menge des DMSO im Reaktionspuffer der PCR lag bei 2% oder 5%. Die Reaktionen wurden bei den in Klammern angegebenen Hybridisierungstemperaturen durchgeführt, wobei die erste Temperatur der 1. PCR entsprach und die zweite Temperatur der 2. PCR. Spur 1: Negativkontrolle, M = DNA-Größenmarker. (B) Southern-Hybridisierung der selben Long RT-PCR Produkte mit der sequenzspezifischen Sonde S4833. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Spur 1 entspricht der Negativkontrolle. Die Zahlen am linken Rand der Gele repräsentieren die Positionen des DNA-Größenmarkers.

Aufgrund der geringen Produktmenge wurde alternativ eine analoge RT-PCR mit dem "Expand Long Template PCR System" (Boehringer Mannheim) durchgeführt, welches für die Amplifikation langer Sequenzen optimiert ist. In diesem Fall konnten mit einem Reaktionspuffer, der nur 2% DMSO enthielt, die beiden HCV-Genomhälften in ausreichender Menge amplifiziert werden (Abbildung 3.12).

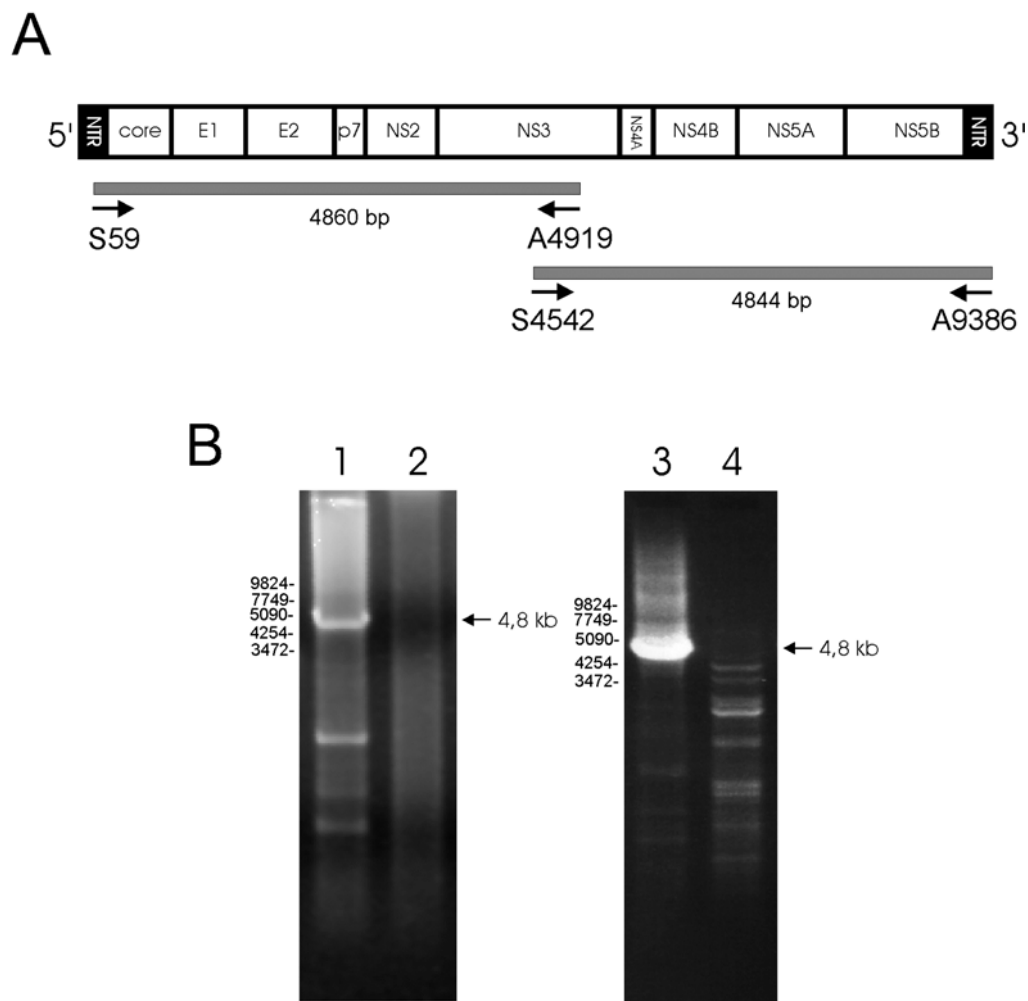


Abbildung 3-12: Long RT-PCR Amplifikation beider Hälften des HCV-Genoms. Die RT wurde mit 1 μ g Leber-RNA sowie den Primern A6103 oder A9413 durchgeführt um die 5'- bzw. die 3'-Hälfte des HCV-Genoms in cDNA umzuschreiben. Für die PCRs, von denen die erste 40 Zyklen und die zweite 30 Zyklen umfaßte, wurde der Reaktionspuffer des Herstellers mit 2% DMSO eingesetzt. (A) Schematische Darstellung der erwarteten PCR-Produkte und ihrer Lage im HCV-Genom. Die Pfeile entsprechen den in der zweiten PCR eingesetzten Primern. Um die Länge des Produkts der vorderen Genomhälfte möglichst gering zu halten, wurden die Gegenstrangprimer A6103 und A4919 eingesetzt. (B) Agarosegelelektrophorese der Produkte der "Long- distance PCR". Je 1/5 der zweiten PCR wurde auf das 1%ige Gel aufgetragen. Die der 5'- und 3'-Hälfte des HCV-Genoms entsprechenden Amplifikate sind in Spur 1 bzw. Spur 3 zu sehen, Spur 2 und 4 entsprechen Kontaminationskontrollen, die parallel ohne RT durchgeführt wurden. Die Zahlen am linken Rand repräsentieren die Positionen des DNA-Größenmarkers.

Das die vordere Genomhälfte umfassende PCR-Produkt wurde nach Mung-Bean Nukleaseverdau in den Vektor pBluescript II SK (pBSK II SK) kloniert. Mit Hilfe der blau-weiß Selektion konnte eine Reihe von Klonen identifiziert werden, die das gewünschte HCV-Fragment enthielten. Die Wahl des Klonierungsvektors pBSK II SK stellte sich jedoch als problematisch heraus, da die "blunt-end" Ligationsreaktion ineffizient war und es häufig zu Rekombinationen kam. Deshalb konnten nur vier verschiedene Klone des kompletten HCV-Fragments isoliert werden.

Als weitaus effektiver erwies sich die Verwendung des TA-Klonierungsvektors pCR 2.1 mit dem sich die PCR-Produkte beider Genomhälften problemlos klonieren und mittels blau-weiß Selektion identifizieren ließen. Am Ende der Klonierungsprozedur stand eine Reihe von Klonen beider Genomhälften zur Verfügung.

3.4.5 Ermittlung der isolatspezifischen Konsensussequenz und Vergleich mit der RB01 Sequenz

Verglich man die Sequenz der isolierten Klone miteinander, so fiel die hohe Variabilität der Sequenzen untereinander auf, die auf Nukleotidebene deutlich größer war als auf Aminosäureebene, da viele der Austausche an Position 2 bzw. 3 des Codons lagen und deshalb "stumm" waren. Bei den Sequenzunterschieden konnte es sich sowohl um Klonierungsartefakte durch Fehler der RT bzw. Taq-Polymerase als auch um eine natürliche Variabilität der verschiedenen Quasispezies des Virus handeln. Eine direkte Verwendung der neuen Klone für die Konstruktion einer Vollängensequenz hätte zur Folge gehabt, daß unbekannte, für das Virus potentiell letale Mutationen mit übernommen worden wären. Um solche Mutationen auszuschließen wurde eine isolatspezifische Konsensussequenz ermittelt.

Zu diesem Zweck wurden die zur Verfügung stehenden DNA- und Aminosäuresequenzen aller neuen Klone mit der alten Vollängensequenz RB01 sowie einer Reihe ausgewählter HCV-Isolate verschiedener Genotypen verglichen. Vor dem Hintergrund aller zum Vergleich herangezogenen Sequenzen konnten Abweichungen einzelner Klone vom allgemeinen H01-Konsens sowie isolatspezifische Abweichungen identifiziert werden. Auf diesem Weg war es möglich eine allgemeine Konsensussequenz des H01-Isolats auf DNA- und Aminosäureebene herzuleiten. Abbildung 3-13 zeigt exemplarisch die Vorgehensweise am Beispiel der Aminosäuresequenz an der NS2/3 Schnittstelle.

In Falle der RB01-Sequenz sind zwei Austausche (rot markiert) besonders auffällig, da sie von der gemeinsamen Sequenz aller anderen untersuchten Klone abweichen. Diese Mutationen könnten unter Umständen letal sein. Auffällig sind außerdem zwei Abweichungen (grün markiert), die in allen vom Isolat H01 abstammenden Klonen zu finden sind. Dabei handelt es sich um isolatspezifische Austausche.

	NS2 ← → NS3					
5' / 8	DMETK V ITWG	ADTAACGDII	LGLPVSARRG	REI H LGPADS	LEGQGWRLLA	PITAYSQQTR
5' / 26 n n
5' / 29 n n
RB01 n	P n	H
HCV-J L	S.....	K..... L	FGE.....
HCV-BK I	K..... L R L
HCV-JT I L	I..... A
HCV-T I L R A
HCV-1	Q..... L	N..... L G	MVSK..... A
HCV-H	R..... L	N.....	Q..... L G	MVSK..... A

Abbildung 3-13: Sequenzheterogenität an der NS2/3 Schnittstelle. Vergleich zahlreicher Aminosäuresequenzen an der NS2/3 Schnittstelle. Drei aus Lebergewebe klonierte Fragmente (5'/8; 5'/26 und 5'/28), welche die 5' Hälfte des HCV-Genoms umfassen wurden mit der aus Patientenserum stammenden Nicht-Konsensussequenz RB01 und einer Reihe ausgewählter HCV-Isolate verschiedener Genotypen verglichen. Die oberste Zeile stellt die Aminosäuresequenz von Klon 5'/8 dar. Entspricht eine Aminosäure der übrigen Klone derjenigen von Klon 5'/8, so wird sie symbolisch durch „n“ ersetzt. Bei Abweichungen von Konsensus ist der jeweilige Buchstabencode dargestellt. Isolatspezifische Abweichungen sind grün markiert. Abweichungen des RB01 Genoms vom Konsensus sind rot markiert. Die zum Vergleich herangezogenen HCV-Isolate gehören bis auf zwei Ausnahmen dem Genotyp 1b an. HCV-1 und HCV-H gehören zum Genotyp 1a. Die einzelnen Isolate sind in folgenden Referenzen beschrieben: HCV-J (Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528, 1990); HCV-BK (Takamizawa et al., J. Virol., 65, 1105-1113, 1991); HCV-JT (Tanaka et al., Virus Res., 23, 39-53, 1992); HCV-T (Chen et al., Virology, 188, 102-113, 1992); HCV-1 (Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455, 1991); HCV-H (Kolykhalov et al., Science 277, 570-574, 1997).

Insgesamt wurden 7 der klonierten PCR-Fragmente komplett sequenziert, von denen 3 die vordere und 4 die hintere Hälfte des HCV-Genoms umfaßten. Die Fragmente, die der vorderen Genomhälfte entsprachen wurden 5'/8, 5'/26 und 5'/29 genannt, die 4 der hinteren Genomhälfte umfassenden Klone 3'/1, 3'/7, 3'/13 und 3'/18. Alle Fragmente wurden entsprechend ihrer Position im HCV-Genom untereinander und mit der Sequenz RB01 verglichen und daraus eine Konsensussequenz, K1 genannt, hergeleitet.

Die Anzahl der Abweichungen von der Konsensussequenz lag auf Aminosäureebene je nach Fragment zwischen 3 und 9 (siehe Abbildung 3-14). Bei zwei Klonen wurden eine Insertion bzw. Deletion entdeckt, die zu einer Verschiebung des Leserasters führten und demzufolge letale Mutationen darstellten. Klon 5'/8 besaß eine 2 Nukleotide umfassende Deletion an Position 1550 und Klon 3'/1 eine Insertion von einem Nukleotid an Position 8648. Zur Erstellung der Konsensussequenz wurden die Mutationen ignoriert und beide Sequenzen an das ursprüngliche HCV-Leseraster angepaßt.

Für die hypervariablen Region von E2 (Aminosäure 384-410) konnte die Konsensussequenz mit den zur Verfügung stehenden 7 sequenzierten Genomhälften nicht hinreichend bestimmt werden. Deshalb wurde dieser Bereich bei 12 weiteren Fragmenten zusätzlich sequenziert, um die Konsensussequenz eindeutig zu bestimmen.

Beim Vergleich der Sequenz des Konsensusgenoms mit dem Vollängengenom RB01, welches mit konventioneller RT-PCR aus Serum des selben Patienten kloniert war (3.2.2), fiel eine Reihe von Unterschieden auf. Insgesamt wurden 30 Aminosäureabweichungen von der Konsensussequenz innerhalb des Leserasters und eine Nukleotidabweichung innerhalb der 5'-NTR entdeckt (siehe Tabelle 3-5; Abb. 3-15). Die auffälligsten Abweichungen waren (a) ein Nukleotidaustausch in der 5' NTR des RB01-Genoms an Position 196 (C→T), (b) eine potentielle zusätzliche Glykosylierungsstelle im E2 Protein des Konsensusgenoms (Aminosäure 576: Ser → Asn) und (c) zwei zusätzliche Serinreste im Carboxyterminus von NS5A der Konsensussequenz (siehe Tabelle 3-5 und Abbildung 3-15).

Zur besseren Veranschaulichung und Abgrenzung von der Konsensussequenz wurde die Vollängensequenz RB01 von diesem Zeitpunkt an als Nicht-Konsensussequenz "NK1" bezeichnet, die Konsensussequenz bekam die Abkürzung "K1":

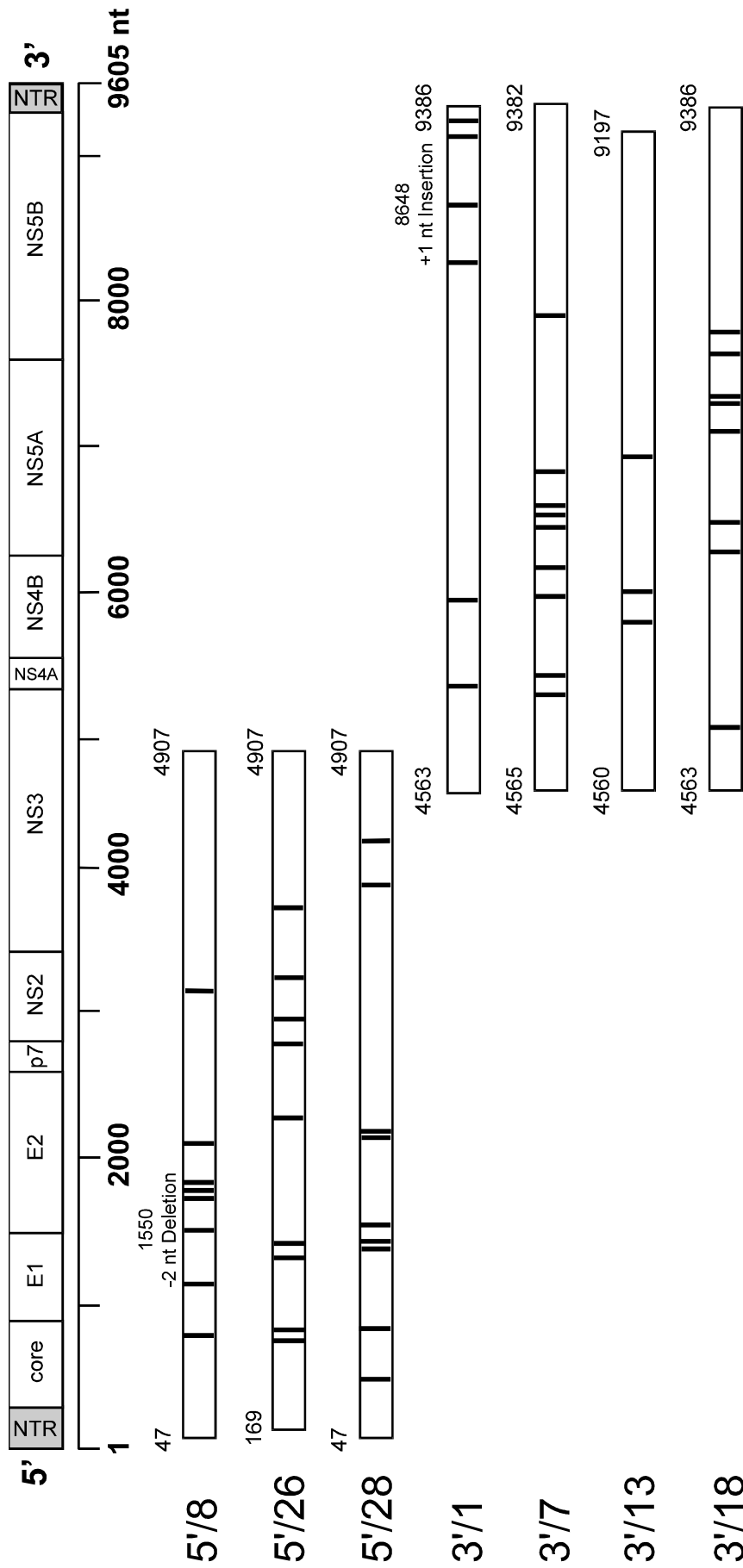


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Long-RT-PCR-Fragmente, die zur Erstellung der Konsensussequenz K1 verwendet wurden. Drei Fragmente, die der 5'-Hälfte des Genoms entsprachen und 4 Fragmente, die der 3'-Hälfte entsprachen, wurden vollständig sequenziert, um anschließend daraus eine Konsensussequenz zu erstellen. Im Falle hochvariabler Positionen, an denen die Konsensussequenz mit den vorhandenen Fragmenten nicht eindeutig zu bestimmen war, wurden weitere Fragmente, die den entsprechenden Bereich umfassen analysiert. Die Grafik stellt die einzelnen Fragmente und ihre Lage im HCV-Genom dar. Vertikale Linien repräsentieren Aminosäureabweichungen innerhalb des offenen Leserasters von der Konsensussequenz K1. Klon 5'/8 besaß eine 2 Nukleotide umfassende Deletion an Position 1550, Klon 3'/1 eine Insertion eines Nukleotides an Position 8648.

Region	Position	Austausch (NK1→K1)
5'-NTR (*1-341)	*196	*196 C → T
Core (1-191)	137	Leu → Ile
E1 (192-383)	-	-
E2 (384-746)	576	Ser → Asn
	604	Ile → Thr
	723	Leu → Phe
p7 (747-809)	747	Thr → Ala
	806	Gln → Arg
NS2 (810-1026)	837	Phe → Leu
	840	Thr → Ala
	842	Pro → Leu
	988	Pro → Ala
NS3 (1027-1657)	1028	His → Pro
	1061	Met → Val
	1263	Ser → Gly
	1285	Thr → Ile
	1373	Val → Ile
	1496	Ile → Met
NS4A (1658-1711)	1687	Val → Ile
NS4B (1712-1972)	1792	Val → Ala
NS5A (1973-2419)	2047	Phe → Val
	2119	Leu → Pro
	2260	Arg → Gln
	2360	Ala → Val
	2368	Pro → Ser
	2383	Gly → Glu
	2413	Gly → Ser
NS5B (2420-3010)	2536	Ser → Asn
	2626	Thr → Ala
	2629	Ser → Ala
	2979	Thr → Ile
	2981	Arg → His
3'-NTR (*9375-9605)	-	-

Tabelle 3-5: Unterschiede zwischen der nicht-Konsensussequenz (NK1) und der Konsensussequenz (K1). Die Tabelle zeigt alle gefundenen Aminosäureabweichungen der nicht-Konsensussequenz von der Konsensussequenz. Zu jedem einzelnen Austausch sind Genomregion, Aminosäureposition und der notwendige Aminosäureaustausch zum Angleich an die Konsensussequenz angegeben.

* Innerhalb der 5'-NTR beziehen sich alle Angaben auf das entsprechende Nukleotid.

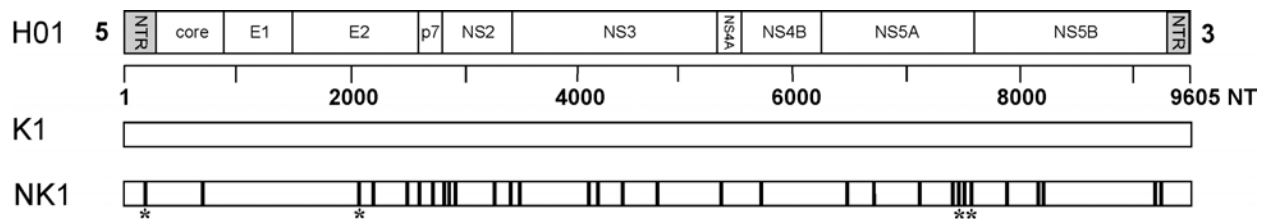


Abbildung 3-15: Vergleich der Konsensussequenz (K1) und der Nicht-Konsensussequenz (NK1). Abweichungen des NK1-Genoms von der Konsensussequenz sind durch vertikale Linien dargestellt. Insgesamt konnten 30 Aminosäure- und eine Nucleotidabweichung in der 5'-NTR gefunden werden. Die auffälligsten Unterschiede zwischen beiden Sequenzen sind mit Sternchen markiert: 1. Ein Nukleotidaustausch in der 5' NTR des NK1 Genoms an Position 196 (C→T); 2. Eine zusätzliche Glykosylierungsstelle im E2 Protein des Konsensusgenoms (Aminosäure 576: S→N); 3. Zwei zusätzliche Serinreste im Carboxyterminus von NS5A der Konsensussequenz (Aminosäure 2368: P→S und 2413: G→S).

3.4.6 Strategie zur Klonierung des authentischen K1-Konsensusgenoms

Basierend auf der K1-Sequenzinformation konnte eine Klonierungsstrategie entwickelt werden, um die Konsensussequenz aus den zur Verfügung stehenden Einzelfragmenten zu konstruieren. Oberstes Ziel war unerwünschte Mutationen und Rekombinationen während der Klonierungsprozedur möglichst zu verhindern. Als Klonierungsvektor diente deshalb wie bei der zuvor beschriebenen Konstruktion des Vollängengenoms RB01 ein Plasmid geringer Kopienzahl. Außerdem sollte die Zahl der Klonierungsschritte auf ein Minimum reduziert werden, um so das Risiko weiter zu minimieren. Auf der Suche nach passenden Restriktionsschnittstellen zeigte sich, daß Abschnitte verwendet werden mußten, die Abweichungen von der Konsensussequenz enthielten. Da alle übernommenen Aminosäureabweichungen von der Konsensussequenz nachträglich nur durch ortsspezifische Mutagenesen beseitigt werden konnten, wurde ihre Anzahl so gering wie möglich gehalten. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Erzeugung des 3'-Endes des Genoms, welches die gesamte "X-Sequenz" einschließen sollte. Von dem fertigen Konstrukt sollten dann *in vitro* "run-off"-Transkripte der Konsensussequenz mit authentischen 3'-Enden hergestellt werden.

Zur Herstellung von *in vitro* RNAs mit authentischem 3'-Ende standen mehrere Alternativen zur Verfügung. Eine Möglichkeit bestand darin, die Konsensussequenz an ihrem 3'-Ende mit einer cis-aktiven Ribozymsequenz zu fusionieren, die sich nach der Transkription selbstständig vom Vorläufertranskript abspaltete. Der einfachere Weg war jedoch eine geeignete Restriktionsschnittstelle einzubauen, die die Herstellung von "run-off" Transkripten mit authentischem 3'-Ende erlaubte. Dabei war zu beachten, daß keine weitere Schnittstelle innerhalb des HCV-Genoms vorkam. Von den kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen konnte keines diese Anforderungen erfüllen. Es wurde deshalb ein passendes Enzym gesucht bei dem die Anzahl

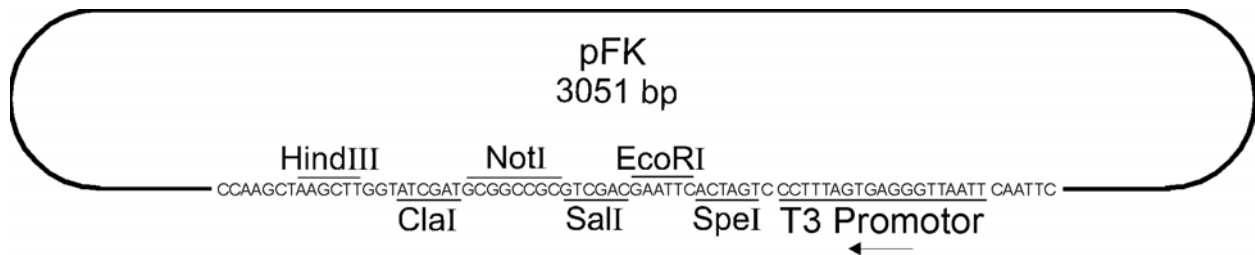


Abbildung 3-17: (A) Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pFK. Grundlage des Konstrukts ist der Vektor pBR322, aus dem der Bereich zwischen den Schnittstellen EcoRI und StyI durch eine multiple Klonierungsstelle, bestehend aus T3-Promotor und ausgewählten Restriktionsschnittstellen, ersetzt ist. EcoRI- und StyI-Schnittstelle sind nicht regeneriert. Die Nukleotidposition 1 des Vektors entspricht der Stelle, an der später der Beginn der eingefügten HCV-Sequenz liegt.

3.4.8 Konstruktion des Konsensusgenoms

Entsprechend der zuvor ausgearbeiteten Klonierungsstrategie wurde das Konsensusgenom aus 8 verschiedenen Teilstücken konstruiert. Innerhalb der Teilstücke waren insgesamt 8 Abweichungen von der Konsensussequenz zu finden, die korrigiert werden mußten. Zusätzlich waren 3 Nukleotidaustausche notwendig, um das authentische 3'-Ende zu generieren. Ortsspezifische Mutagenesen wurden entweder mit der Methode nach Stappert et al. (1992), die es erlaubte in einer Reaktion an mehreren Positionen gleichzeitig Austausch vorzunehmen, oder durch "überlappende PCR" nach Ho et al. (1989) zum Austausch einzelner Basen durchgeführt. Alle mit PCR hergestellten Fragmente wurden anschließend zur Kontrolle sequenziert. Tabelle 3-6 zeigt eine Auflistung aller im Rahmen der Klonierung durchgeführten Mutagenesen. Die Konstruktion des Konsensusgenoms erfolgte über ausgewählte Restriktionsschnittstellen nach molekularbiologischen Standardmethoden. In Abbildung 3-18 sind schematisch die Zusammensetzung des K1 Genoms aus 7 verschiedenen Ausgangskonstrukten und die Lage der einzelnen Teilstücke innerhalb der HCV-Sequenz dargestellt. Alle beteiligten Konstrukte und Zwischenkonstrukte sind im Anhang aufgeführt. Am Ende der Klonierungsprozedur stand das fertige Konstrukt pFK K1 (1-9605). Nachdem sämtliche Klonierungsschritte ausgeführt waren, wurde die Konsensussequenz zur Sicherheit noch einmal vollständig sequenziert.

Mutation	DNA-Matrize	Mutagenese-Oligonukleotide
NT 196 (C → T)	pAT 1-2545	A278 Konsensus
AS 137 (Leu → Ile)	pAT 254-9369	S740 (L → I)
AS 557 (Gly → Ser)	5'/29	S1998 (G → S)
AS 595 (Ala → Thr)	5'/29	S 2112 (A → T)
AS 1151 (Gly → Ser)	5'/29	S3780 (G → S); A3804 (G → S)
AS 1288 (Ser → Gly)	5'/29	S4192 (S → G); A4215 (S → G)
AS 1812 (Pro → Leu)	3'/13	S5765 (P → L)
AS 1886 (Thr → Ile)	3'/13	S5985 (T → I)
AS 2383 (Gly → Glu)	3'/18	S7478 (G → E)
NT 8180 (G → A)	3'/18	S8170 ΔScaI
NT 9562 (A → T)	pTM 5ab rev+3'NTR	3'rev Antisense
NT 9603 (T → A)	pTM 5ab rev+3'NTR	3'rev Antisense

Tabelle 3-6: Zusammenfassung aller zur Konstruktion des Konsensusgenoms notwendigen Mutagenesen. Neben jeder Mutagenese sind Position und Art des Austausches angegeben (NT = Nukleotidaustausch, AS = Aminosäureaustausch) sowie die verwendete DNA-Matrize und Mutagenese-Oligonukleotide.

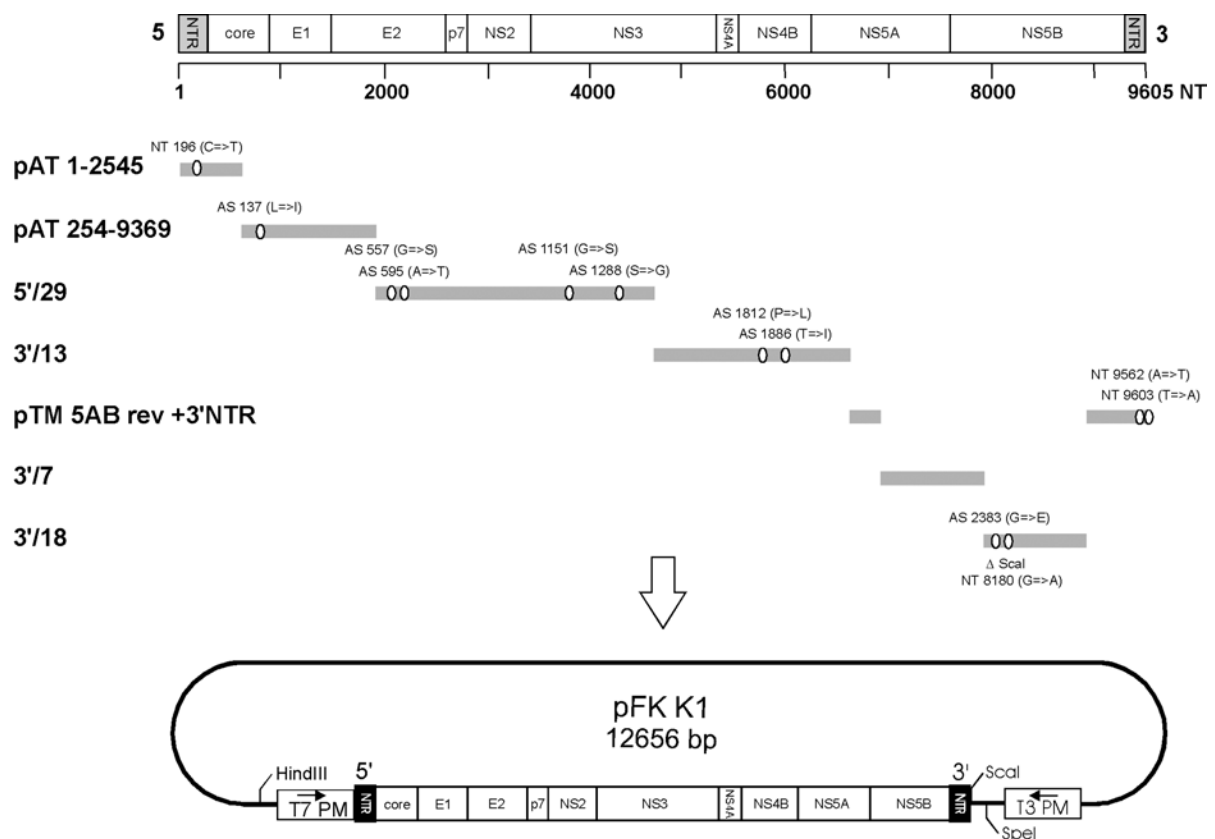


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Konsensusgenoms K1 aus Teilstücken verschiedener Ausgangsplasmide sowie deren Lage innerhalb der HCV-Sequenz. Punkte innerhalb der DNA-Fragmente stellen die eingefügte Punktmutationen dar, daneben sind die Position und die Art des Austausches beschrieben. (NT= Nukleotidaustausch; AS= Aminosäureaustausch).

Unten: Schematische Darstellung des Vektors pFK K1. Der Vektor stellt das Endprodukt der Konsensusgenom - Klonierung dar. Mit Hilfe der begrenzenden T7- und T3-Promotoren lassen sich *in vitro* Plus- und Minusstränge des Konsensusgenoms herstellen. Eine Linearisierung des Plasmids mit ScaI ermöglicht die Herstellung von *in vitro* Plusstrang-RNA mit authentischem 3'-Ende. PM = Promotor.

3.5 Expression des Konsensusgenoms

3.5.1 Die IRES-Aktivität des K1-Genoms ist deutlich erhöht

Nachdem das Konsensusgenom fertig konstruiert war, konnte überprüft werden, welche Auswirkungen die entdeckten Unterschiede zwischen der Konsensussequenz (K1) und der nicht-Konsensussequenz (NK1) hatten. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit J. O. Koch in unserem Labor durchgeführt. Zuerst sollte der Einfluß des an Position 196 entdeckten Nukleotidaustauschs (C→T) auf die Aktivität der viralen IRES in einer *in vitro* Translation näher untersucht werden. Hierfür wurden drei verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt, welche die codierende Sequenz des Core-Proteins und einen kurzen Teil von E1 unter Kontrolle der Encephalomyocarditisvirus-IRES (EMCV-IRES), der IRES des Konsensusgenoms (K1; 196 T) sowie der IRES des Nicht-Konsensusgenoms (NK1; 196 C) umfaßten. Die EMCV-IRES diente als Standard mit dem die beiden HCV-IRES-Varianten verglichen werden konnten. Nach Linearisierung der Plasmide mit FspI (Nukleotidposition 924) wurden "run-off" Transkripte hergestellt (Abbildung 3-19A) und die drei verschiedenen *in vitro* Transkripte im Retikulozytenlysat mit zugesetztem ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert. Nach Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE konnte die Menge des entstandenen Core-E1 Fusionsproteins mit einem Phosphoimager quantifiziert werden. Je Konstrukt wurden drei Experimente mit je 0,25µg und 0,125µg RNA pro 25µl *in vitro* Translation unabhängig voneinander durchgeführt und die daraus resultierenden Meßwerte gemittelt. Die Menge des mit der EMCV-IRES erhaltenen Core-E1 Proteins wurde in seiner Funktion als Vergleichsstandard mit 100% definiert. Ein Vergleich der beiden HCV-IRES-Varianten zeigte eine etwa doppelt so hohe Translationseffizienz der K1-IRES im Vergleich mit der des NK1-Genoms (Abbildung 3-19B). Dies ließ darauf schließen, daß der Nukleotidaustausch an Position 196 des NK1 Genoms die IRES-Aktivität deutlich reduzierte.

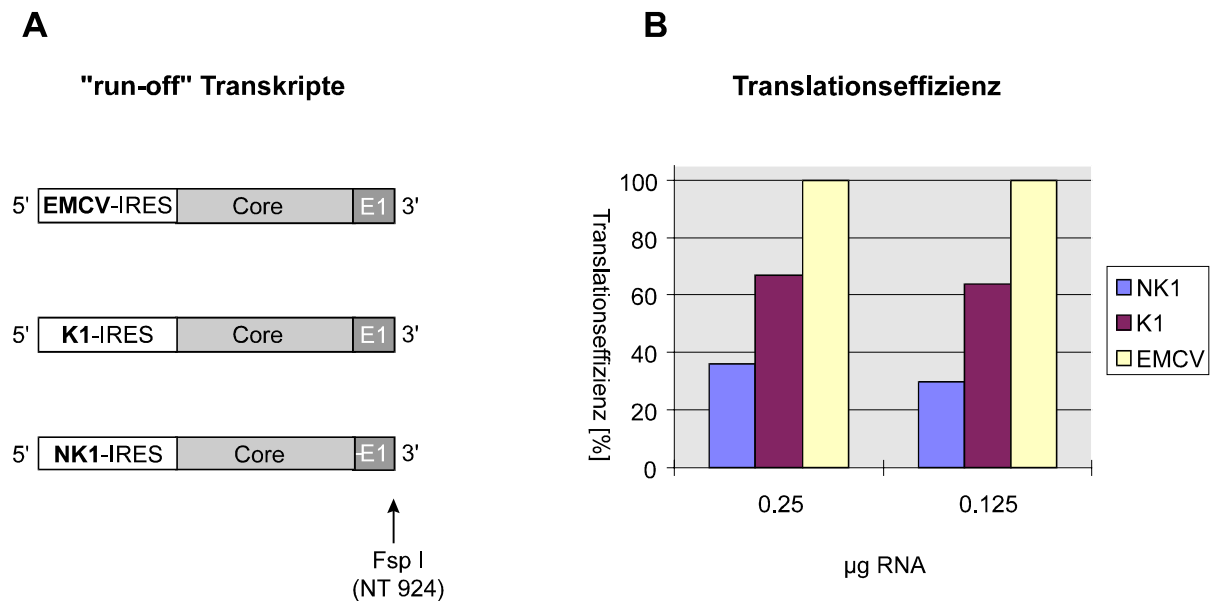


Abbildung 3-19: (A) Schematische Darstellung der für die Untersuchung der Nukleotidaustausche in der HCV-IRES hergestellten "run-off" Transkripte. Die Balken zeigen die in den "in vitro" Transkripten enthaltenen Teile des HCV, sowie die verschiedenen IRES-Strukturen. (EMCV-IRES = Encephalomyocarditisvirus-IRES; K1-IRES = IRES des Konsensusgenoms; NK1-IRES = IRES des Nicht-Konsensusgenoms)

(B) Vergleich der IRES-Aktivitäten des K1 und des NK1 Genoms mit der EMCV-IRES. Die Werte der Translationseffizienz wurden mittels densitometrischer Messungen bestimmt. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in die jeweils 0,25 µg und 0,125 µg RNA eingesetzt wurden. Die Aktivität der EMCV-IRES wurde als 100% definiert.

3.5.2 Expression des vollständigen Polyproteins in Zellkultur und Untersuchung der Polyproteinreifung

Als nächster Schritt sollte die Funktionalität des Konsensusgenoms näher untersucht werden. Hierbei stellte sich die Frage inwiefern sich die im Vergleich der Proteinsequenzen beobachteten Unterschiede zwischen Konsensus- und Nicht-Konsensusgenom auswirkten. Voraussetzung eines funktionellen Genoms war eine korrekte Prozessierung und Reifung des Polyproteins, was mit Hilfe des von Fuerst *et al.* (1986) beschriebenen Vacciniavirus T7-Hybridexpressionssystem, mit dem Proteine transient in verschiedenen Säugerzelllinien exprimiert werden konnten, untersucht werden sollte.

Dieses System besteht im wesentlichen aus zwei Komponenten (Fuerst *et al.*, 1986 ; Elroy-Stein *et al.*, 1989), zum einen aus einem rekombinanten Vacciniavirus (vTF7-3), welches unter Kontrolle des viralen 7.5k-Promotors die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimiert (T7 RNA-Polymerase), zum anderen aus einem Expressionsvektor, der die Transkription von RNAs unter Kontrolle des T7-Promotors erlaubt. Die Vorteile dieses Systems sind die schnelle Expression, sowie das hohe Expressionsniveau des rekombinanten Proteins im Zytoplasma der Wirtszelle. Ein weiterer Vorteil ist das breite Spektrum von Zelllinien, die sich mit dem Vacciniavirus infizieren lassen.

Die Konsensussequenz und Nicht-Konsensussequenz wurden in zwei verschiedene Expressionsvektoren unter transkriptioneller Kontrolle des T7-Promotors kloniert. Aufgrund der zuvor beobachteten geringen Translationseffizienz (Abbildung 3-19B) wurde das RB01-Genom unter Kontrolle der effizienten Encephalomyocarditisvirus IRES (EMCV-IRES) in einem vom Vektor pTM1 (Fuerst *et al.*, 1986) abgeleiteten Plasmid exprimiert (pTM NK1, Abbildung 3-20). Zur Expression der Konsensussequenz wurde das Plasmid pFK K1 verwendet. In diesem Fall wurde die Translation des Polyproteins von der authentischen HCV-IRES vermittelt.

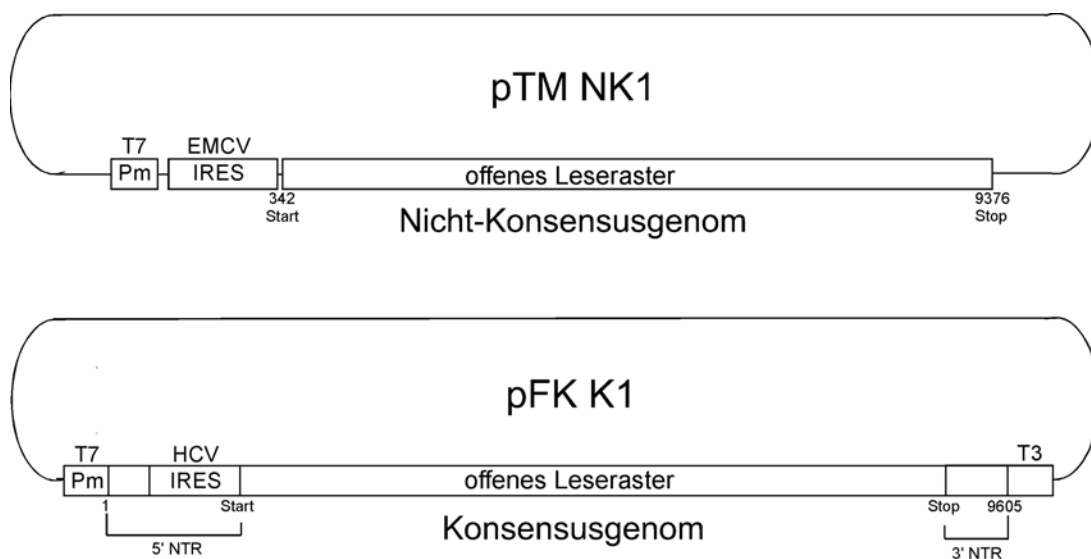


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pTM NK1 und pFK K1. Beide Plasmide enthalten das komplette offene Leseraster des HCV und werden unter Kontrolle des T7-Promotors (T7Pm) transkribiert. Die Cap-unabhängige Initiation der Translation wurde bei pTM NK1 von der EMCV-IRES und bei pFK K1 von der authentischen HCV-IRES vermittelt.

Nach Transfektion von BHK-21 Zellen und metabolischer Radiomarkierung der Proteine mit ^{32}S -Methionin wurden die HCV-spezifischen Proteine aus den Zellysaten sowohl unter denaturierenden, als auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen mittels Immunpräzipitation isoliert. Hierfür wurden folgende Antiseren verwendet: αE1 , αE2 , αNS2 , αNS3 , αNS4 , αNS5A und αNS5B (siehe 2.5). Das Ergebnis der Experimente ist in Abbildung 3-21 gezeigt.

Bei beiden klonierten HCV-Genomen konnten alle beschriebenen Prozessierungsprodukte und damit auch die Funktionalität der beiden viralen Proteasen nachgewiesen werden, was auf eine korrekte Spaltung des viralen Polyproteins schließen ließ. Zwischen den beiden Genomen waren zwei deutliche Unterschiede zu erkennen. E2 und das E2-p7-NS2 Vorläuferprotein des K1-Genoms besaßen eine geringere elektrophoretische Mobilität als die entsprechenden Proteine des NK1-Genoms (Abbildung 3-21B Spur 2 und 9).

Die zweite Beobachtung betraf das NS5A-Protein des K1 Genoms, das in zwei elektrophoretischen Varianten auftrat (Gel A, Spur 6), während sich das NS5A des NK1-Genoms als nur eine homogene Bande darstellte (Gel A, Spur 13).

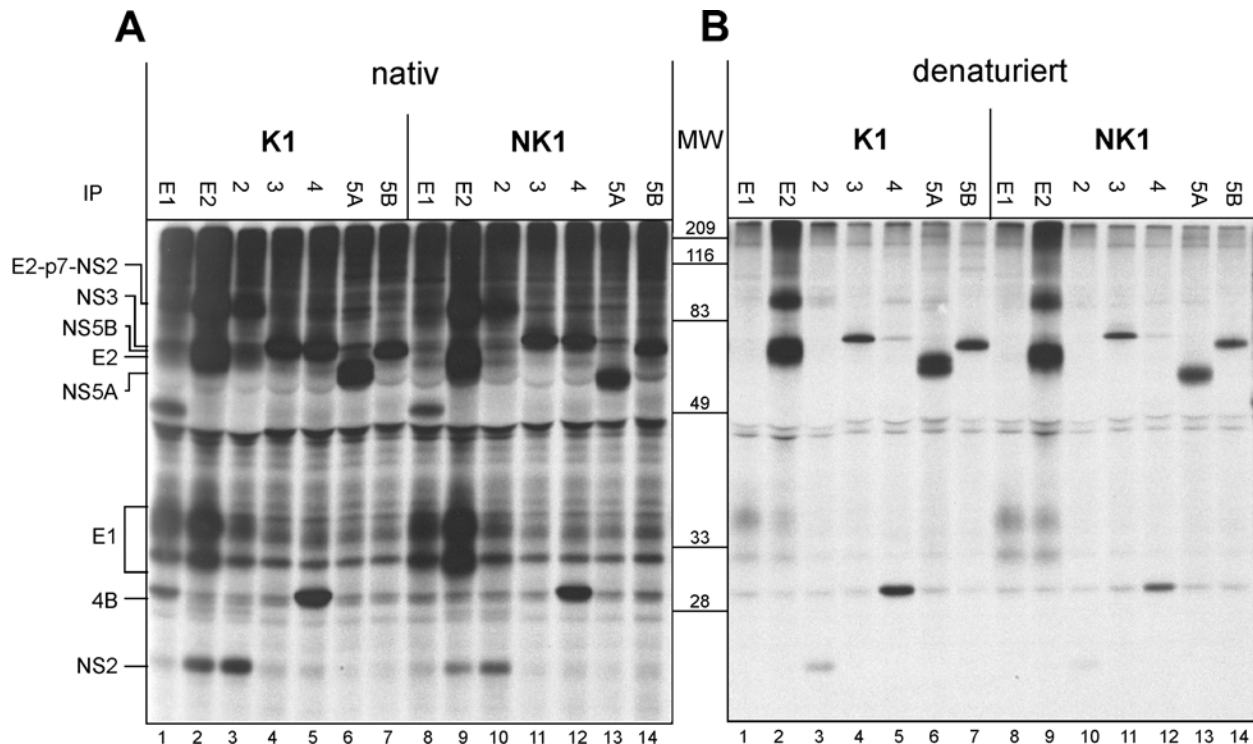


Abbildung 3-21: Vergleich der Polyproteinprozessierung zwischen dem K1 und dem NK1-Genom. BHK-21 Zellen wurden mit dem T7-RNA-Polymerase exprimierenden rekombinanten Vacciniavirus vTF7-3 infiziert und anschließend mit den Plasmiden pFK K1 oder pTM NK1 transfiziert. Nach drei Stunden Transfektion wurden die Zellen mit ^{35}S -methioninhaltigem Medium inkubiert, um die entstehenden Proteine radioaktiv zu markieren. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen mit verschiedenen Antisera, die über den einzelnen Spuren angegeben sind immunpräzipitiert (IP). Die gereinigten Proteine wurden mit einem 11%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, und durch Autoradiographie detektiert. Das linke Gel (A) umfaßt die nativ gefällten Proteine, das rechte Gel (B) die denaturiert gefällten Proteine. Die Zuordnungen der Proteine sind am linken Rand, der mitgeführte Größenstandard ist zwischen den Gelen zu dargestellt. Für experimentelle Details siehe Material und Methoden.

3.5.3 Das E2 Protein der K1 Sequenz besitzt eine zusätzliche funktionelle Glykosylierungsstelle

Bei der N-Glykosylierung im Endoplasmatischen Retikulum werden aktivierte Core-Oligosaccharide auf Asparaginseitenketten eines gerade entstehenden Proteins übertragen. Ein Asparaginrest kann nur als Akzeptor fungieren, wenn er Bestandteil eines speziellen Aminosäuremotivs ist (Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr). Es werden allerdings nicht alle Asparaginreste in solchen Sequenzen glykosyliert. Beim Vergleich des Konsensusgenoms mit dem Nicht-Konsensusgenom (3.4.5) fiel auf, daß durch eine Mutation an Position 576 (Ser-Lys-Thr \rightarrow Asn-Lys-Thr) eine neue potentielle Glykosylierungsstelle im E2-Protein entstanden war.

Deshalb wurde untersucht, ob die in Abbildung 3-21 beobachteten, scheinbar höheren Molekulargewichte der Proteine E2 und E2-p7-NS2 des Konsensusgenoms auf eine zusätzliche Glykosylierung des E2 zurückzuführen waren. Die Polyproteine des K1 und NK1-Genoms wurden mit dem Vacciniavirus T7-Hybridsystem in BHK-21 Zellen exprimiert und die Glykoproteine unter nativen oder denaturierenden Bedingungen mittels Immunpräzipitation isoliert. Für die Immunpräzipitationen wurden die Antiseren α E1, α E2 und α NS2 verwendet.

Unter nativen Bedingungen wurden E1 und NS2 beider Genome mit dem jeweiligen E2 copräzipitiert (Abbildung 3-22, Gel D). Dieser Komplex war unter denaturierenden Bedingungen nicht stabil (Abbildung 3-22, Gel A, B und E).

Im Falle einer unterschiedlich starken Glykosylierung der E2-Proteine des K1 und NK1 Genoms sollte ihr zuvor abweichendes Molekulargewicht nach einem Verdau komplexer Zucker mit dem Enzym Endoglykosidase H (EndoH) die gleiche Größe besitzen. Nach EndoH-Verdau besaßen sowohl die E2 Proteine beider Genome als auch die E2-p7-NS2 Vorläuferproteine das gleiche apparente Molekulargewicht von ca. 40 und 80 kDa (Abbildung 3-22, Gel D). Diese Beobachtung war ein starker Hinweis darauf, daß die zusätzliche Glykosylierungsstelle des K1-E2 an Position 576 funktionell war.

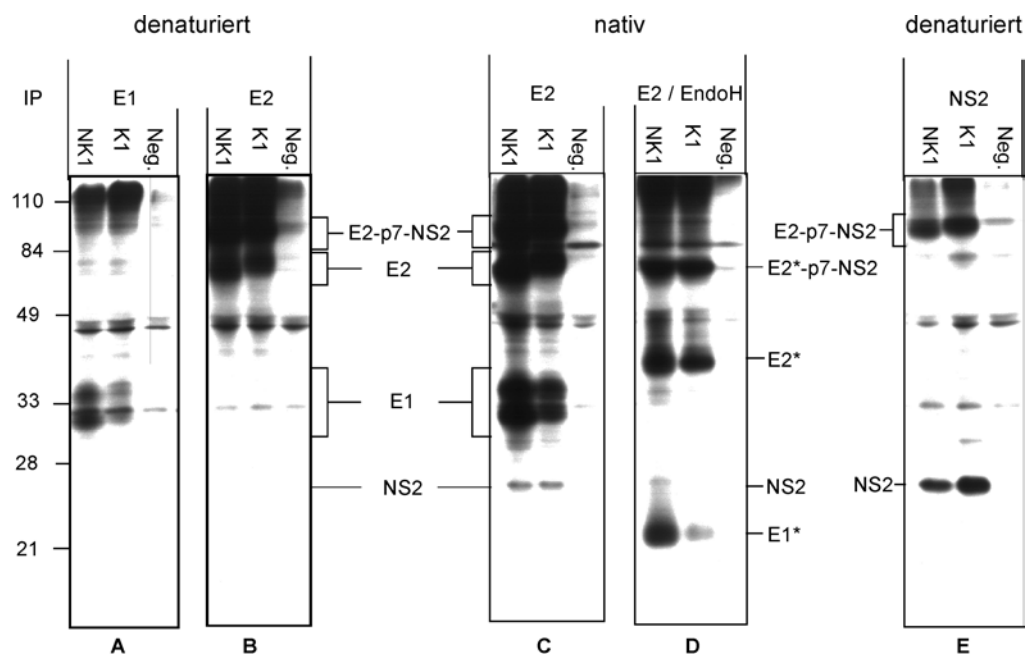


Abbildung 3-22: Endoglykosidase H-Verdau der Polypeptide des K1 und NK1 Genoms. Die Polyproteine beider Genome wurden mit dem Vacciniavirus T7-Hybridsystemsystem in BHK-21 Zellen exprimiert und mit 35 S-Methionin markiert. HCV-spezifische Proteine wurden nach Denaturierung bzw. unter nativen Bedingungen durch Immunpräzipitation mit den Antiseren α E1, α E2 und α NS2 isoliert, mit 11% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der Typ des HCV-Genoms sowie die verwendeten Antiseren sind über den Spuren angegeben. Gel D zeigt den EndoH-Verdau der K1 und NK1 Proteine. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angegeben und die Zuordnungen der HCV-spezifischen Proteine zwischen den Autoradiogrammen aufgeführt. Neg. = Negativkontrolle.

3.5.4 Das NS5A Protein der Konsensussequenz ist hyperphosphoryliert

Bei der Phosphorylierung von Proteinen wird eine Phosphatgruppe auf Serin, Tyrosin oder Threonin übertragen. In der Regel wird die Phosphatgruppe dabei an eine Hydroxylgruppe der entsprechenden Aminosäure gebunden. Die Phosphatgruppe besitzt eine negative Ladung und hat deshalb einen bedeutenden Einfluß auf die elektrostatischen Eigenschaften des Proteins

Bei Expressionen des Konsensusgenoms mit dem Vacciniavirus T7-Hybridssystem und anschließender SDS-PAGE konnte eine zweite, NS5A entsprechende Bande mit verminderter elektrophoretischer Mobilität entdeckt werden (

Abbildung 3-23, Spur 1, NS5A*). Ein Vergleich der K1- und NK1-Genome zeigte, daß die Konsensussequenz zwei zusätzliche Serinreste im carboxyterminalen Bereich des NS5A besaß (AS-Position 2368 und 2413), die als zusätzliche Akzeptoren von Phosphatgruppen dienen konnten (Tabelle 3-5). Diese Beobachtungen ließen zusammen mit Berichten aus der Literatur (Tanji *et al.*, 1995b; Asabe *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1997) darauf schließen, daß es sich bei der zusätzlichen Bande um die hyperphosphorylierte Form des NS5A handelte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden immunpräzipitierte und ³⁵S-Methionin-markierte NS5A Proteine beider HCV-Genome mit 800 U λ-Phosphatase oder 10U "Calf Intestinal Phosphatase" behandelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Abbildung 3-23 zeigt, daß nach Phosphatasebehandlung die obere NS5A-Bande des K1-Genoms verschwand und gleichzeitig die Intensität der unteren Bande zunahm (Spur 2 und 3). Dieses Ergebnis wies stark darauf hin, daß das NS5A des K1-Genoms hyperphosphoryliert wurde. Da diese Modifikation nicht beim NS5A des NK1-Genoms gefunden wurde (Abbildung 3-23, Spur 5 und 6) lag der Schluß nahe, daß die beiden zusätzlichen Serinreste des K1-NS5A an den Positionen 2368 und 2413 für die Hyperphosphorylierung verantwortlich waren. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht. J. O. Koch konnte in unserem Labor zeigen, daß die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster auf Mutationen in der NS3-4B Region des NK1-Genoms zurückzuführen sind (Koch und Bartenschlager, 1999).

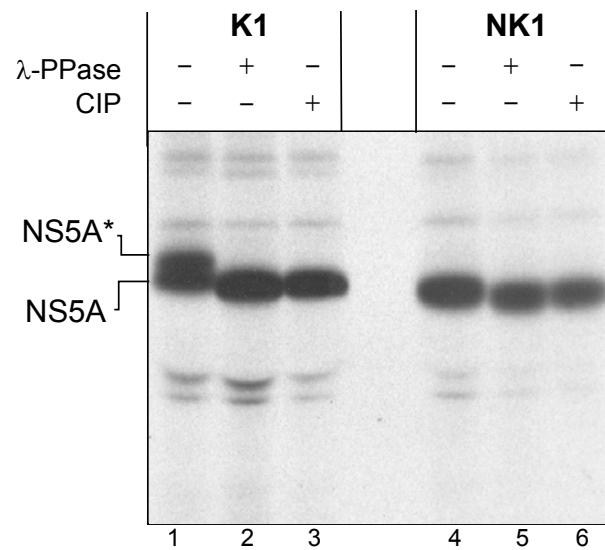


Abbildung 3-23: Nachweis der Hyperphosphorylierung des K1-NS5A. Polyproteine beider Genome wurden mit dem Vacciniavirus T7-Hybridssystem in BHK-21 Zellen exprimiert und metabolisch mit ^{35}S -Methionin markiert. NS5A Proteine wurde durch Immunpräzipitation isoliert, mit 11% SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Autoradiographie nachgewiesen. Die verwendeten HCV-Genome und Phosphatasen sind über den Spuren angegeben. Die Zuordnungen des NS5A sind am linken Rand aufgeführt. λ -PPase = λ -Phosphatase; CIP = "Calf Intestinal Phosphatase".

Mit der Sequenz K1 stand nun ein komplettes Konsensusgenom zur Verfügung, das viele deutliche Veränderungen gegenüber dem ursprünglichen NK1-Genom besaß. Neben dem modifizierten 5'-Ende und dem authentischen 3'-Ende mit "X-Sequenz" konnten beim K1-Genom im direkten Vergleich mit dem alten NK1-Isolat eine Reihe von Veränderungen beobachtet werden. Diese umfaßten eine um den Faktor 2 aktivere IRES, eine zusätzliche funktionelle Glykosylierungsstelle im E2-Protein sowie die hyperphosphorylierte Form des NS5A, die zwar für andere Isolate beschrieben war, aber beim NK1-Isolat nicht vorkam. Zusätzlich wurde die Funktionalität des Konsensussequenz-NS5B als RNA-abhängige RNA-Polymerase mit einem Aktivitätstest nachgewiesen (R. Bartenschlager, pers. Mitteilung). Vor dem Hintergrund dieser offensichtlichen Verbesserungen innerhalb der K1-Sequenz sollte nun untersucht werden, ob transfizierte *in vitro* Vollängengenome dieses Isolats in der Lage waren, in Zellkulturen zu replizieren.

3.6 Transfektion des *in vitro* transkribierten Konsensusgenoms in HuH-7 Zellen und Nachweis der Replikationskompetenz

Mit dem Konstrukt pFK K1 als Matrize ließen sich potentiell infektiöse *in vitro* Plusstränge des Konsensusgenoms herstellen. Zuvor mußte das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert werden, damit die mit T7 RNA-Polymerase hergestellten "run-off" Transkripte ein authentisches 3'-Ende (inclusive "X-Sequenz") besaßen. Nach einem Aufreinigungsschritt wurde die Integrität der *in vitro* RNAs in einer Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese sowie die Reinheit hinsichtlich residueller Matrizen-DNA mittels PCR bestimmt. Erst wenn diese Kriterien zufriedenstellend erfüllt waren, konnte die RNA für Transfektionsversuche verwendet werden.

Bei vorherigen Transfektionen konnte beobachtet werden, daß ein Plusstrang-Inokulum nach Lipofektion noch über lange Zeit in den transfizierten Zellen nachweisbar war (siehe Tabelle 3-1). Es wurde deshalb vermutet, daß Liposomen mit der darin verpackten RNA an Oberflächenstrukturen der Zellen, bzw. der Kulturschale gebunden vorlagen. Die in den Liposomen enthaltenen RNAs waren dort vor Abbau durch RNasen geschützt und konnten deshalb auch nach mehreren Tagen noch in der PCR nachgewiesen werden. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten *in vitro* RNA per Elektroporation in Zellen transfiziert. *In vitro* Transkripte waren außerhalb von Zellen nicht mehr vor RNasen geschützt und konnten zusätzlich besser durch Waschen entfernt werden. Nach Elektroporation der hochdifferenzierten humanen Hepatomzelllinie HuH-7 (Nakabayashi *et al.*, 1982) wurden die transfizierten Zellen in komplettem DMEM aufgenommen. Am nächsten Tag wurde das alte Kulturmedium gegen frisches HAMs F12 Medium ausgetauscht. Nach jeweils drei Tagen wurde ein Drittel jedes Ansatzes in der strangspezifische RT-PCR untersucht und die Zellen alle 6 Tage in einem Verhältnis von 1:3 passagiert.

Insgesamt wurden drei verschiedene *in vitro* RNAs in HuH-7 Zellen elektroporiert:

- 1) Transkripte des Konstrukts K1, die dem Konsensusgenom entsprachen.
- 2) Transkripte der Deletionsmutante K1/ Δ 5B.
- 3) Transkripte des Vektors K1/1-8181, denen 1424 Nukleotide am 3'-Ende des Konsensusgenoms fehlten.

Nach Transfektion sollten die Mengen an nachgewiesener Plusstrang-RNA miteinander verglichen werden. Könnte für das Konsensusgenom eine größere Plusstrangmenge im direkten Vergleich mit der Deletionsmutante (K1/ Δ 5B) nachgewiesen werden, so wäre dies als ein Hinweis auf Replikation zu deuten. Im Falle des Konsensusgenoms wurden *in vitro* Transkripte

von zwei Klonen elektroporiert, und damit das Risiko eine unerwünschte Mutante einzusetzen verringert. Die unter Punkt 3 beschriebenen Transkripte entsprachen einer am 3'-Ende um 1420 Nukleotide verkürzten Variante der K1-RNA. Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob der stark strukturierte 3'-Bereich des HCV-Genoms einen Einfluß auf die Verweildauer der transfizierten RNA in den Zellen hatte. Parallel dazu wurde als weitere Kontrolle eine "mock-Transfektion" durchgeführt. An den Tagen 3, 6, 10, 13 und 17 wurde die Gesamt-RNA der HuH-7 Zellen präpariert und in Verdünnungen von 1:10; 1:30 und 1:90 in die RT eingesetzt. Die Verdünnungen der Matrizen-RNA waren so gewählt, daß die Grenze des Nachweisbereiches im Agarosegel gerade erreicht wurde. In diesem Bereich sollte es möglich sein, Mengenunterschiede der Plusstränge von Konsensusgenom und Deletionsmutante zu erkennen. Der Plusstrang-Nachweis erfolgte mit konventioneller RT-PCR am 5'-Ende des Genoms (siehe Abbildung 3-24).

In allen Präparationen der drei verschiedenen *in vitro* RNAs war bis zum Tag 17 HCV Plusstrang-RNA nachzuweisen. Dabei zeigten parallel durchgeführte Kontrollreaktionen, daß es sich dabei weder um DNA-Kontamination, noch RNA-Kreuzkontamination handelte (Daten nicht gezeigt). Zwischen den Mengen an nachgewiesenem Plusstrang von Konsensusgenom und Deletionsmutanten war bis zum Ende der Beobachtung (Tag 17) kein Unterschied zu erkennen. Nach jeder Passage der Zellen nahm die Menge der nachgewiesenen RNA in allen Ansätzen gleichmäßig ab, was auf einen Verdünnungseffekt bei der Passage zurückzuführen war. Zwischen Tag 10 und Tag 17 war bei einigen Proben eine zweite, etwas schwächere Bande unterhalb der HCV-spezifischen Bande zu beobachten. Hierbei handelte es sich um ein unspezifisches Nebenprodukt der PCR, das bei geringer werdender Menge an HCV-Matrize in zunehmendem Maße amplifiziert wurde. Die Menge nachgewiesener RNA-Stabilitätskontrolle blieb im Verhältnis zu Konsensusgenom und Deletionsmutante gleich hoch (Abbildung 3-24). Das 3'-Ende hatte damit erwiesenermaßen keinen, die Stabilität erhöhenden Einfluß. Insgesamt ergab der Vergleich der Plusstrangmengen von Konsensusgenom und Deletionsmutante nach Elektroporation keinen Hinweis auf Replikation.

Neben HuH-7 Zellen wurden primäre humane Hepatozyten mit *in vitro* Transkripten des K1-Genoms oder der Deletionsmutante transfiziert. Beim Vergleich der mit RT-PCR nachgewiesenen Plusstrangmengen beider Genome konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Menge an Plusstrang-RNA zwischen dem Konsensusgenom und der Deletionsmutante festgestellt werden.

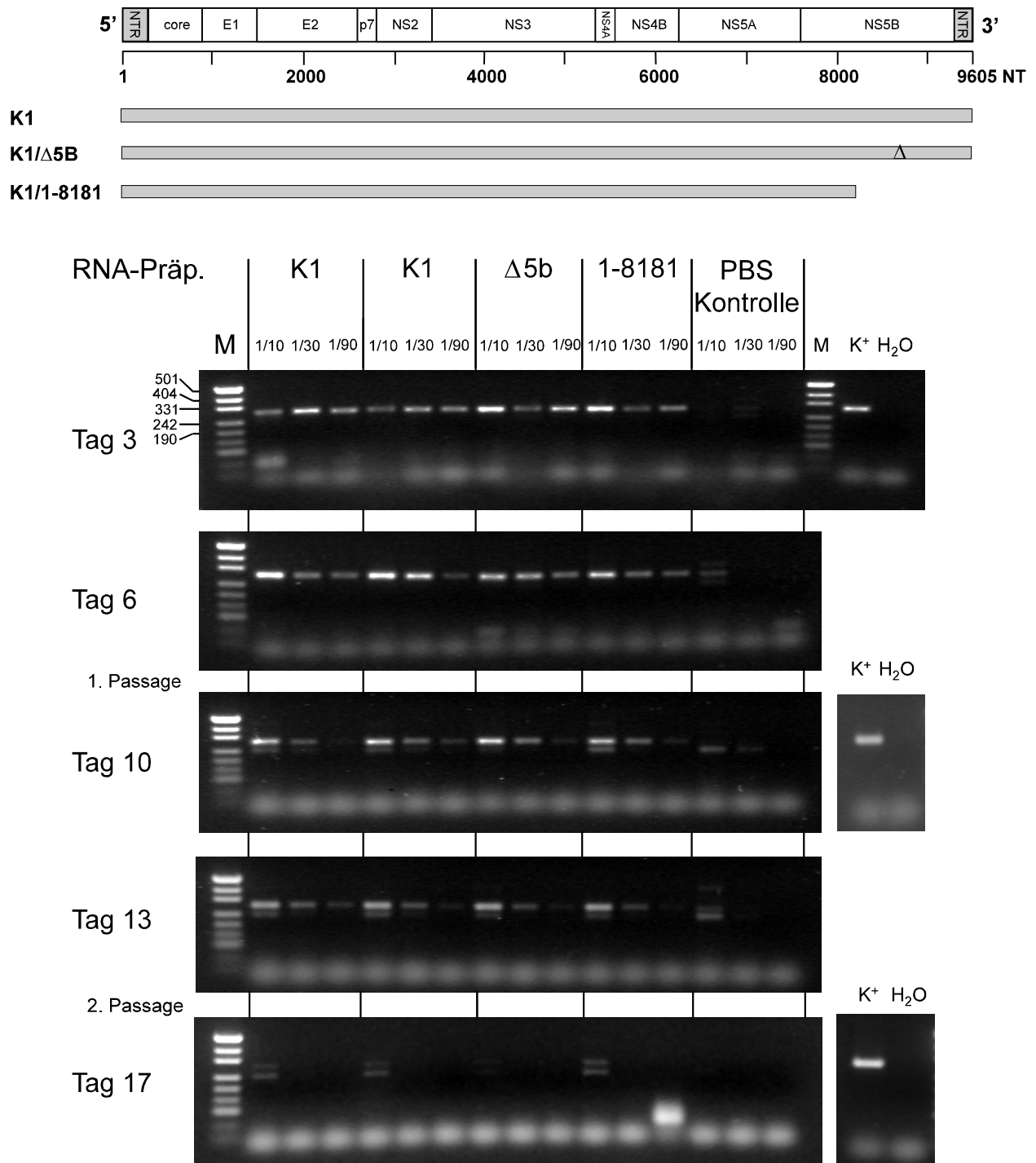


Abbildung 3-24: Plusstrangnachweis nach Elektroporation von HuH-7 Zellen mit Vollängen- *in vitro* RNAs. Im oberen Teil der Abbildung sind die drei verschiedenen transfizierten *in vitro* RNAs schematisch dargestellt. Die Grafik zeigt ihre Länge im Vergleich mit dem HCV-Genom. Die konventionelle RT-PCR wurde mit den Primern S59 und A 349 am 5'-Ende des viralen Genoms durchgeführt, wobei A349 in der reversen Transkription zum Nachweis des Plusstrangs und S59 zum Nachweis des Minusstrangs diente. In die RT bei 48°C wurde je 1 µl 1/10, 1/30 und 1/90 verdünnte RNA-Präparation eingesetzt. Die PCR umfaßte 35 Zyklen nach Standardprotokoll und ergab ein 290bp langes Produkt. PCR-Reaktionsprodukte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Namen und Verdünnungen der elektroporierten RNAs sind über den Gelen angegeben. Der Tag der RNA-Isolation sowie Zellpassagen und DNA-Größenstandard sind links vermerkt. Δ = Deletion im aktiven Zentrum des NS5b; M = DNA-Größenstandard; K⁺ = Positivkontrolle; H₂O = Wasserkontrolle.

3.7 Konstruktion selektionierbarer Replikons

Der Mißerfolg der in Abschnitt 3.6 beschriebenen Experimente konnte unter anderem auf Fehlern im K1-Genom oder, insbesondere im Falle der primären Hepatozyten, auf geringer Transfektionseffizienz beruhen. Außerdem mußte in Betracht gezogen werden, daß das HCV vergleichsweise zytopathogen ist und damit zur Lyse oder Wachstumshemmung erfolgreich transfizierter Zellen geführt haben konnte. Des weiteren war es möglich, daß die verwendeten Zelllinien nicht permissiv für das HCV waren oder nur eine abortive bzw. sehr geringe Replikation des Virus erlaubten. Um einige dieser Beschränkungen zu umgehen, wurde beschlossen eine neue Form von Konstrukten, sogenannte "selektionierbare Replikons" herzustellen. Das Konzept lehnte sich an aktuelle, bei Flavi- und Pestiviren gewonnene Erkenntnisse an (Khromykh *et al.*, 1997; Behrens *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 1998).

Neben viralen Vollängengenomen und Defektmutanten können in infizierten Zellen auch besondere Formen defekter viraler RNA vorkommen, sogenannte "DI-Partikel" (Defective Interfering Particles). DI-Partikeln fehlen ein oder mehrere für den vollständigen viralen Replikationszyklus notwendige Bestandteile (z.B. Struktur- oder Capsid-Proteine). Ihre Vermehrung ist deshalb strikt von der Anwesenheit eines sogenannten Helfervirus abhängig. Die DI-Partikel greifen in die Replikation des Helfervirus ein, das ihnen die fehlenden Komponenten zur Verfügung stellt (Meyers und Thiel, 1995).

Vor diesem Hintergrund gelang es bei Flavi- und Pestiviren rekombinante subgenomische RNA-Moleküle herzustellen, sogenannte "Replikons", die autonom, d.h. ohne Unterstützung durch ein Helfervirus innerhalb einer Wirtszelle replizieren konnten. Bemerkenswerterweise konnte die Deletion beim Pestivirus BVDV den gesamten Bereich der Strukturproteine sowie den NS2-codierenden Bereich des NS2-3 Gens umfassen (Behrens *et al.*, 1998). Ferner war es möglich Replikons mit Reporter- (Chloramphenicol-Acetyltransferase) oder Antibiotikaresistenzgenen zu ergänzen. Bei der Antibiotikumresistenz handelte es sich um das Neomycin-Phosphotransferasegen (NPT), das in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin, auch G418 genannt, (Gibco BRL) zur Selektion der Replikons verwendet wurde (Khromykh und Westaway, 1997). Die Selektion über ein Antibiotikum ermöglicht die Trennung von erfolgreich mit dem Replikon transfizierten Zellen von der großen Masse an Zielzellen, die nach Transfektion kein Replikon beherbergen und deshalb abgetötet werden. Zusätzlich wird der Gefahr vorgebeugt, daß das Replikon die Wirtszellen eventuell beim Wachstum behindert. In diesem Fall könnten die Wirtszellen von den schneller wachsenden nicht transfizierten Zellen verdrängt würden.

Ein Einsatz subgenomischer Replikons bietet den großen Vorteil, die RNA-Replikation völlig isoliert von Zusammenbau und Reifung des Virions untersuchen zu können. Dies ermöglicht eine genaue Kartierung von Proteinen, Motiven und RNA-Sequenzen, die direkt an der RNA-Replikation beteiligt sind. Zusätzlich werden keine der potentiell zytopathogenen HCV-Strukturproteine synthetisiert.

Aus Kartierungsuntersuchungen der HCV-IRES, die von V. Lohmann in unserem Labor durchgeführt wurden, war bekannt, daß die Bereiche von Nukleotid 1-376 und 1-378 nach einer Fusion mit dem NPT-Gen immer noch eine ausreichend hohe IRES-Aktivität vermittelten. Da das Startcodon des HCV-Polyproteins an Position 342 lag, mußte eine Fusion von 12 bzw. 16 Aminosäuren des HCV Core-Proteins mit der Neomycin Phosphotransferase in Kauf genommen werden. Diese Fusion führte zu keiner deutlichen Verringerung der Enzymaktivität der NPT (Lohmann et al., 1999).

Die bicistronischen Replikons setzten sich deshalb aus 2 Varianten der HCV-IRES (Nukleotid 1-376 oder 1-388), dem NPT-Gen und der IRES des Encephalomyocarditis-Virus zusammen, die die Translation einer dahinterliegenden HCV-Sequenz von NS2 oder NS3 bis zum authentischen 3'-Ende vermittelte. Die beiden Varianten wurden gewählt, da im Vorfeld nicht klar war, ob NS2 für die Replikation notwendig war, oder nicht. Sollte es nicht notwendig sein, so wäre die um NS2 verkürzte HCV-Sequenz eher in der Lage zu replizieren. Parallel wurde zu jedem Replikon eine entsprechende Deletionsmutane (Δ) hergestellt, die eine 10 Aminosäuren umfassende Deletion des GDD-Motivs im aktiven Zentrum der NS5B-Polymerase besaß. Der Aufbau der Replikons ist in Abbildung 3-25 dargestellt.

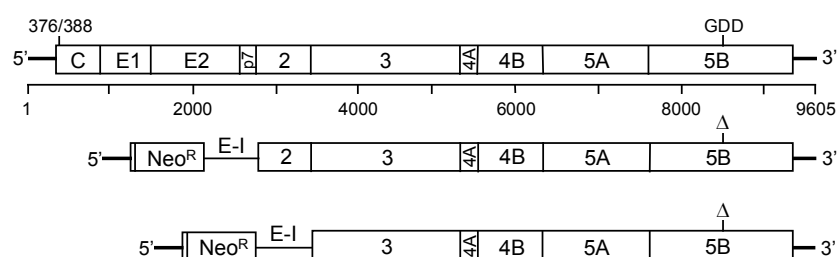


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung der Replikon-Konstrukte. Der obere Teil der Grafik zeigt die Struktur des kompletten HCV-Genoms mit offenem Leseraster sowie 5'- und 3'-NTR (schwarze Linien). Die Position der GDD-Sequenz im aktiven Zentrum der NS5B RNA-Polymerase und die 3'-Grenzen der HCV-IRES, die für die Konstrukte gewählt wurden sind darüber vermerkt. Die Nummern unterhalb des Genoms entsprechen den Nukleotidpositionen der K1-Sequenz. Darunter ist der Aufbau der selektionierbaren Replikons dargestellt, die sich aus der 5'-HCV-IRES, dem Neomycin-Resistenzgen (Neo^R), der EMCV-IRES (E-I) und HCV-Sequenzen vom NS2 oder NS3 bis zum authentischen 3'-Ende zusammensetzen. Δ zeigt die Position der 10 Aminosäuren umfassenden Deletion des GDD-Motivs der NS5B-Polymerase.

3.8 Transfektion der Replikon *in vitro* Transkripte in HuH-7 Zellen

In Zusammenarbeit mit V. Lohmann wurden von den 4 verschiedenen Replikons und den entsprechenden Deletionsmutanten *in vitro* Transkripte hergestellt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Entfernung der Matrizen-DNA gelegt. Eine Integration der Matrizen-DNA in das Genom der transfizierten Zellen hätte unabhängig von einer HCV-Replikation zu einer G418-Resistenz geführt. In 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten konnten zwischen den Replikons mit K1-Genom und den entsprechenden Deletionsmutanten deutliche Unterschiede in Bezug auf die Anzahl resistenter Zellklone beobachtet werden. Bei allen Ansätzen bildeten sich deutlich mehr Zellklone nach Transfektion mit den K1-Replikons als nach Transfektion mit den inaktiven Replikons (Tabelle 3-7).

Alle G418-resistenten Zellklone des ersten Experiments wurden isoliert und vermehrt. Im Laufe dieses Prozesses starben die meisten der Klone ab. Insgesamt überlebten 9 Klone aus Transfektionen mit K1-Konstrukten und ein Klon, der mit einem NS2-3' Δ -Replikon transfiziert war (Klon 8-1). Außer einer verkürzten Teilungszeit und gelegentlich auftretenden, unregelmäßig geformten Zellen konnten keine auffallenden morphologischen Unterschiede zwischen den 9 Klonen und Klon 8-1 bzw. nicht transfizierten HuH-7 Zellen beobachtet werden.

Konstrukt	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	überlebende Klone aus Experiment 1
I ₃₇₆ neo/NS2-3'/K1	12	20	38	1
I ₃₇₆ neo/NS2-3'/ Δ	0	3	8	0
I ₃₇₆ neo/NS3-3'/K1	20	>60	40	2
I ₃₇₆ neo/NS3-3'/ Δ	2	8	18	0
I ₃₈₈ neo/NS2-3'/K1	6	20	25	1
I ₃₈₈ neo/NS2-3'/ Δ	1	10	4	1
I ₃₈₈ neo/NS3-3'/K1	30	15	17	5
I ₃₈₈ neo/NS3-3'/ Δ	1	2	6	0

Tabelle 3-7: Anzahl der G418-resistenten Zellklone, die durch Transfektion von HuH-7 Zellen mit *in vitro* transkribierten Replikon-RNAs gewonnen wurden. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse dreier unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionsexperimente. In der rechten Spalte sind die Klone aus Experiment 1, die Isolierung und Subpassagierung überlebten aufgeführt.

Eine unabdingbare Voraussetzung für ein funktionelles Replikon ist die Fähigkeit, virale RNAs korrekter Größe zu bilden. Um HCV-RNAs in den einzelnen Klonen nachzuweisen, wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und in einem Northern-Blot mit einer plusstrangspezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 3-26). Mit Ausnahme von Klon 8-1 wurden bei allen übrigen Zellklonen RNAs korrekter Länge gefunden. Sie umfaßten ca. 8640 Nukleotide beim NS2-3'

Replikon und ca. 7970 Nukleotide NS3-3' Replikon. Dies ließ darauf schließen, daß die G418-Resistenz durch funktionelle Replikons vermittelt wurde.

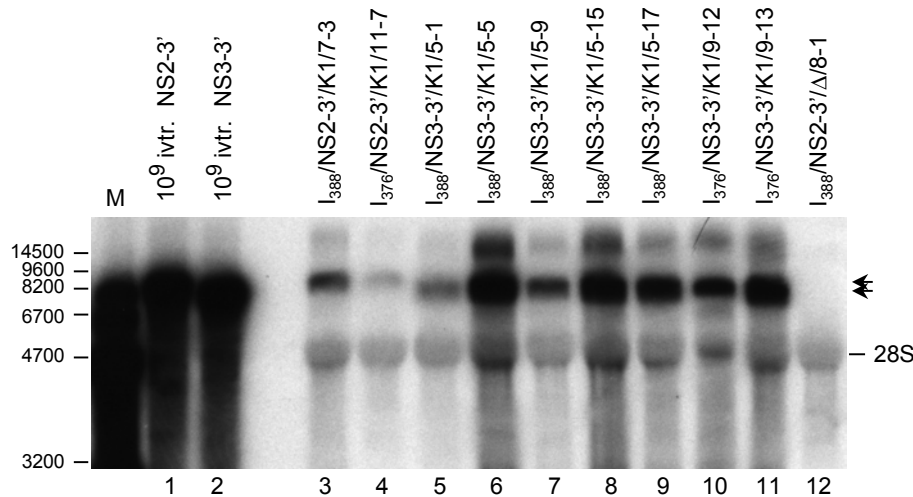


Abbildung 3-26: Nachweis von Plusstrang HCV-RNA in G418-resistenten HuH-7 Zellklonen durch Northern-Blot Analyse. Je 10µg Gesamt-RNA, was einer Ausgangsmenge von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen entsprach, wurde mit einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit einer radioaktiv markierten plusstrangspezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die Sonde entsprach dem gesamten NPT-Gen sowie der HCV-IRES von Nukleotid 376-1. Als Größenmarker authentischer Sequenz dienten je 10^9 *in vitro* Transkripte, die den Replikon-RNAs $I_{388}/NS2-3'/K1$ und $I_{388}/NS3-3'/K1$ entsprachen (Spur 1 und 2). Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S-RNA sind auf der rechten Seite des Gels vermerkt. Die Positionen des RNA-Größenmarkers sind auf der linken Seite des Gels angegeben. M = RNA-Größenmarker. Da die Fragmente des RNA-Markers HCV-Sequenzen enthielten, hybridisierten sie mit der Sonde.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß die G418-Resistenz durch in die Wirtszelle integrierte und unter Kontrolle eines zellulären Promotors transkribierte Plasmid-DNA verursacht wurde, wurde eine Analyse jedes Klons mit einer für das NPT-Gen spezifischen PCR durchgeführt (Abbildung 3-27 A). Mit Ausnahme von Klon 7-3 (Spur 3), der einer Transfektion mit einem NS2-3' Replikon entstammte und Klon 8-1 (Spur 12), der nach Transfektion mit einer Deletionsmutante erhalten wurde, konnte keine NPT-DNA nachgewiesen werden. Dies bestätigte die aus dem Northern Blot gezogene Schlußfolgerung, daß die G418-Resistenz der meisten Klone durch die Replikons bedingt war.

In ergänzenden Experimenten sollten weitere Beweise dafür erbracht werden, daß die G418-Resistenz durch autonom replizierende HCV-RNAs vermittelt wurde. Zur Vereinfachung wurden für diese Untersuchungen die Zellklone 9-13 und 8-1 ausgewählt, wobei Klon 8-1, der integrierte Kopien des NPT-Gens besaß als Negativkontrolle diente. Um die Anwesenheit von NPT-DNA im Klon 9-13 klar auszuschließen, wurde eine analytische PCR mit anschließender Southern-

Hybridisierung durchgeführt (Abbildung 3-27 B). Dabei konnte gezeigt werden, daß sich mit Hilfe der Methode noch 100 Moleküle eines Kontrollplasmids ($I_{376}/NS3-3'/K1$ incl. NPT-Gen) nachweisen ließen. Vor einem Hintergrund von $1\mu\text{g}$ zellulärer Gesamt-RNA des Klons 9-13 konnten noch 1000 Moleküle des Kontrollplasmids detektiert werden. Die Sensitivität des Nachweises lag folglich bei etwa 1000 NPT-Genkopien in ca. 40.000 Zellen. Selbst bei dieser hohen Sensitivität konnte in der zellulären DNA von Klon 9-13 keine NPT-DNA nachgewiesen werden.

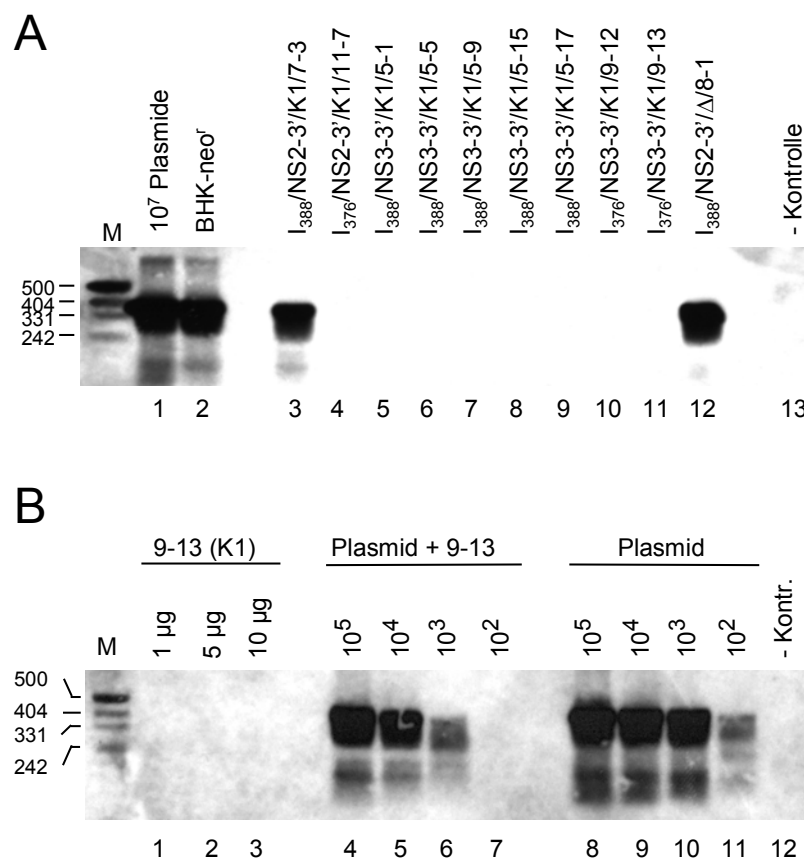


Abbildung 3-27: (A) Nachweis der Abwesenheit integrierter Replikon-DNA bei der Mehrheit der untersuchten Zellklone. Je $1\mu\text{g}$ DNA der HuH-7 Zellklone wurde in einer NPT-Gen spezifischen PCR analysiert. Das entsprach einer Ausgangsmenge von $4-8 \times 10^4$ Zellen je Klon. In der PCR mit den Primern S-NPT und A-NPT wurde ein 379 Bp langes DNA-Fragment aus dem NPT-Gen amplifiziert. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde durch einen Southern-Blot mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde, die dem NPT-Gen entspricht bestätigt. Als Positivkontrollen wurden 10^7 Plasmidmoleküle und $1\mu\text{g}$ DNA einer stabil mit dem NPT-Gen transfizierten BHK-Zelllinie in die PCR eingesetzt (Spur 1 und 2). Eine Negativkontrolle wurde ohne DNA durchgeführt (Spur 13). (B) Charakterisierung des HuH-7 Zellklons 9-13, der die NS3-3'-RNA enthält. Mit Hilfe des unter A beschriebenen PCR-Nachweises wurde die Abwesenheit integrierter NPT-DNA bestätigt. Dabei wurden je 1, 5 oder $10\mu\text{g}$ aus Klon 9-13 isolierte DNA eingesetzt (Spuren 1-3). Die Empfindlichkeit der Methode wurde bestimmt, indem 10^5-10^2 Plasmide ($I_{376}/NS3-3'/K1$) entweder direkt (Spuren 8-12) oder nach Zugabe von je $1\mu\text{g}$ 9-13 DNA (Spuren 4-7) in die PCR eingesetzt wurden. Mit Hilfe eines Southern Blots wurde die Spezifität des amplifizierten DNA-Fragments mit einer NPT-Gen spezifischen Sonde bestätigt. M = DNA-Größenmarker.

Zur Quantifizierung der HCV Plusstrang-RNA-Mengen in den Wirtszellen wurden serielle Verdünnungen von Gesamt-RNA Präparationen mit Hilfe der Northern-Blot Analyse und anschließender Densitometrie mit einem Phosphoimager untersucht (Abbildung 3-28). Dabei wurden ca. 108 Plusstrangkopien pro μg Gesamt-RNA gemessen. Eine humane Zelle enthält zwischen 10-30 pg RNA, womit 1 μg Gesamt-RNA einer Menge von etwa 33.000 – 100000 Zellen entspricht. Bei 108 Plusstrangkopien pro μg Gesamt-RNA ergibt sich somit eine Menge von 1000 – 3000 Replikon-Kopien je Zelle.

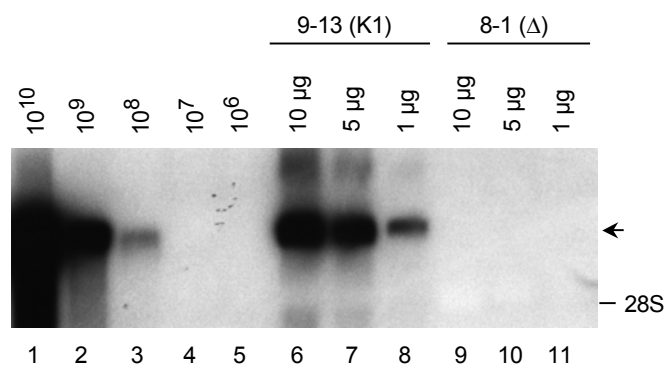


Abbildung 3-28: Quantifizierung der HCV Plusstrang-RNA. 10, 5 oder 1 μg Gesamt-RNA der Zellklone 9-13 und 8-1 (Spuren 6-11) wurden parallel zu einer Verdünnungsreihe analoger *in vitro* Transkripte (Spuren 1-5) mit einer Northern-Hybridisierung analysiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer plusstrangspezifischen RNA-Sonde, die das gesamte NPT-Gen sowie die HCV-IRES umfaßte.

Der eindeutige Nachweis, daß es sich bei den RNAs um autonom replizierende Replikons handelte konnte von V. Lohmann in unserem Labor erbracht werden. Er konnte zeigen, daß die Inkubation der Zellen mit [^3H] Uridin in Anwesenheit von Actinomycin D zu einer selektiven radioaktiven Markierung der HCV-RNA führt. Da die metabolische Markierung der Replikon-RNA nur dann möglich ist, wenn diese in der Zelle neu gebildet wird und das Actinomycin D selektiv die DNA-abhängige RNA-Synthese hemmt, nicht aber die RNA-abhängige Transkription war bewiesen, daß es sich um autonom replizierende HCV-RNAs handelte. Darüberhinaus konnte V. Lohmann die Expression der viralen Antigene NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B in der Replikon-Zelllinie 9-13 mit Hilfe von ^{35}S -Markierung und Immunpräzipitation nachweisen. Des weiteren konnte er mit Hilfe von Immunfluoreszenz zeigen, daß die viralen Proteine im Zytoplasma lokalisiert sind und nicht im Zellkern vorkommen. Diese Verteilung darauf hin, daß auch das HCV im Zytoplasma repliziert, wie dies bei fast allen Plusstrang-RNA Viren der Fall ist.

3.9 Reklonierung des Replikons aus Zelllinie 9-13

Ein weiterer formeller Beweis für Replikation, der noch zu führen war, umfaßte die Reklonierung und Sequenzierung des Replikons aus Zellen der Zelllinie 9-13. Es sollte untersucht werden, ob es innerhalb der Replikon-Sequenz zu Mutationen kommt, denn diese können nur auftreten, wenn eine Replikation stattfindet.

Wie schon bei der Ursprünglichen Klonierung des HCV-Genoms aus Lebergewebe, wurde auch hier das Ziel verfolgt, möglichst lange Fragmente der Sequenz zu amplifizieren und anschließend zu klonieren. Nachdem erste Vorversuche mit dem ursprünglichen Amplifikationsprotokoll (2.8.20) nicht zum erwünschten Ergebnis führten, wurde die RT-PCR in einigen entscheidenden Punkten modifiziert und erweitert (Tellier et al., 1996). Da Grund zu der Annahme bestand, daß aus der RT-Reaktion überführte RNA-Moleküle die Long-distance PCR behindern können, wurde nach Beendigung der RT-Reaktion ein Verdau mit RNase H durchgeführt (1U; 20 min; 37°C), die selektiv RNA in DNA-RNA-Stranghybriden verdaut. Ferner wurde die MgCl₂-Konzentration im PCR-Ansatz auf 3 mM erhöht und ein modifiziertes Temperaturzyklusprotokoll (2' 94°C / (10" 94°C; 1'30" 54°C; 9' 68°C) x 10 / (10" 94°C; 1'30" 54°C; 9' 68°C) +10" pro Zyklus x 30 / 10' 68°C) in einem neuen Thermocyclermode (Gene-Amp 9600, Perkin-Elmer) erprobt. Bei Einsatz der in HCV 5'- und 3'-NTR bindenden Primer S59 und A9486 ermöglichte das neue Protokoll die Amplifikation des gesamten Replikons in einer einzigen Polymerase-Kettenreaktion. Im Rahmen der anschließenden Klonierung konnten 11 Replikon-Klone (genannt 9-13 A-K) isoliert werden.

Die Sequenzanalyse bestätigte, daß es sich bei den amplifizierten Sequenzen um autonom replizierende RNAs handelte, denn alle Klone besaßen eine Reihe verschiedener Mutationen. Neben "stillen" Austauschen wurden zahlreiche Aminosäureaustausche gefunden (Abb. 3-29). Ein Stop-Codon wurde bei Klon A an Nukleotidposition 4073 entdeckt. Klon D besaß eine Insertion eines Cytosin-Nukleotids an Position 8648, die zu einem Wechsel des Leserasters führte. Ein weiterer Leserasterwechsel wurde durch eine Nukleotiddeletion an Position 3732 in Klon G verursacht. Insgesamt wurden 11 Klone sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß Klon D mit Klon I, Klon E mit Klon G und Klon H mit Klon J identisch war (D = I; E = G; H = J). Es standen damit 8 verschiedene Klone zur Verfügung.

Auffällig waren zwei "konservierte" Austausche, die in fast allen resequenzierten Klonen auftraten. Bei 6 von 8 Klonen gab es einen Austausch von C nach T an Nukleotidposition 8486, der zu keinem Austausch auf Aminosäureebene führte. Der zweite Austausch an Position 8991 von Cytosin nach Guanin, der bei allen 8 Klonen vorhanden war, führte jedoch zu einem Wechsel

in der Aminosäuresequenz von Arginin (positiv geladen, hydrophil, basisch) nach Glycin (polar, hydrophil, neutral).

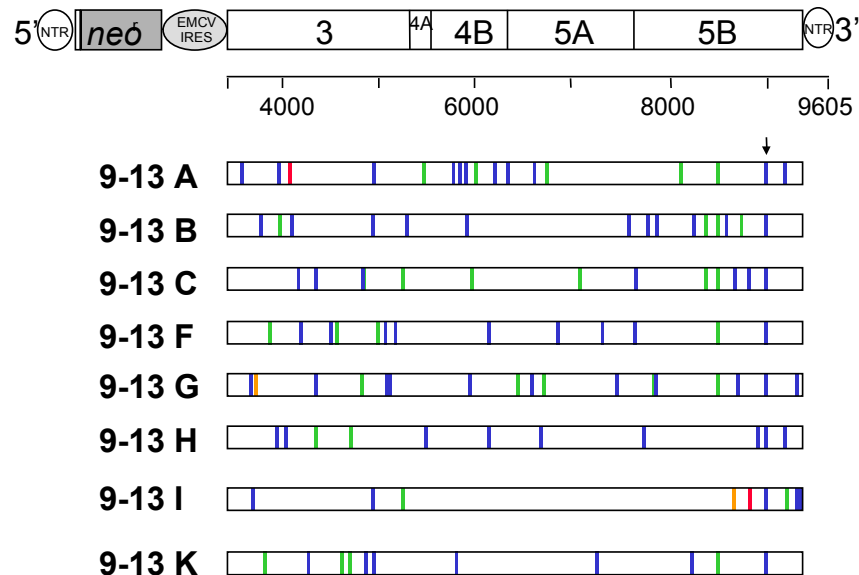


Abbildung 3-29: Schematische Darstellung der reklonierten Sequenzen des Replikon-Zellklons 9-13. Am oberen Rand ist das Ausgangskonstrukt gezeigt, die darunterliegenden Zahlen entsprechen den Nukleotidpositionen des HCV-Genoms. Die Polyproteine von 8 verschiedenen Klonen sind in Form von weißen Balken dargestellt, Abweichungen von der Aminosäuresequenz als vertikale Linien. Dabei gilt folgender Farbcode: Blau = Aminosäureaustausch; Grün = stiller Nukleotidaustausch; Rot = Stopcodon; Orange = Leseraster-Wechsel. Der konservierte Aminosäureaustausch im NS5B ist mit einem Pfeil markiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß in den selektionierten Zelllinien virale Plusstrang-RNA korrekter Größe dauerhaft replizierte. Eine G418-Resistenz auf Grund ins Zellgenom integrierter Replikon-DNA konnte mit einer NPT-Gen spezifischen PCR ausgeschlossen werden. Am Beispiel des Klons 9-13 wurde ferner gezeigt, daß die Replikation der Replikon-RNA nicht durch Actinomycin D gehemmt werden konnte und pro Zelle etwa 1000-3000 Replikon-Kopien vorhanden waren. Des weiteren wurden alle HCV-spezifischen Antigene nachgewiesen, wobei zumindest NS3 und NS5A im Cytoplasma vorkamen. Im Rahmen der Reklonierung konnte das Replikon aus der Zelllinie 9-13 isoliert werden. Eine Sequenzierung ergab, daß es sich tatsächlich um die Sequenz der ursprünglich transfizierten Replikon in vitro RNA handelte. Des weiteren wurden einige Mutationen in der Sequenz nachgewiesen, was als weiteres Indiz einer Replikation gedeutet werden kann.

4 Diskussion

4.1 Strategien für ein HCV-Zellkultursystem

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, ein zellgestütztes Modell für die Replikation des Hepatitis C Virus zu entwickeln. Die erste Möglichkeit ein zellgestütztes Replikationsmodell zu etablieren besteht darin permissive Zellen mit einem Virus zu infizieren. Das Virus könnte sich innerhalb der Wirtszelle in großen Mengen vermehren, worauf diese im günstigsten Fall mit einem lichtmikroskopisch sichtbaren cytopathischen Effekt reagiert (Bsp.: Bakulovirus, Cytomegalovirus). Im Falle des Hepatitis C Virus ergibt sich jedoch das Problem, daß dieses einfache und praktikable Replikationsmodell nicht zur Verfügung steht. Zwar wurden in den letzten Jahren mehrere Zellkultursysteme für das HCV beschrieben, ihr Nutzen ist jedoch sehr begrenzt, da das Virus nur in sehr geringen Mengen repliziert. Im folgenden Abschnitt werden einige dieser Zellkultursysteme vorgestellt, die sowohl auf primären Kulturzellen als auch auf Zelllinien basieren.

So gelang es beispielsweise primäre Schimpansenhepatozyten *in vitro* unter Verwendung von infektiösem Serum mit HCV zu infizieren (Lanford et al., 1994). Dies war auch im Falle primärer humaner Hepatozyten möglich (Fournier et al., 1998). Des weiteren wird die *in vitro* Infektion primärer mononukleärer Blutzellen beschrieben (Zignego et al., 1992).

Auf Zelllinien basierende *in vitro* Kultursysteme für das HCV wurden für humane T- und B-Zelllinien (Shimizu et al., 1992; Shimizu & Yoshikura 1994 (Molt4; HPBMa); Mizutani et al., 1996 (MT-2); Nakajima et al., 1996 (Daudi)), und Hepatozytenzellen (Ikeda et al., 1998 (PH5CH)) beschrieben. In Langzeitkulturen von HPBMa und Daudi-Zellen konnte auch nach über einem Jahr Versuchsdauer infektiöses Virus nachgewiesen werden (Nakajima et al., 1996). Mit Kulturüberstand von seit 58 Tagen HCV-infizierten Daudi-Zellen, gelang es einen Schimpansen mit dem HCV zu infizieren (Shimizu et al., 1998).

Für die bisherigen Schwierigkeiten bei der Etablierung eines effektiven Zellkultursystems können verschiedene Probleme verantwortlich sein. Das Virus repliziert selbst in seinem natürlichen Wirt relativ langsam und erreicht dabei vergleichsweise niedrige Virustiter. Ferner besitzt das Virus ein enges Wirtsspektrum, was auf speziellen Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder wichtigen zellulären Faktoren, die in kultivierten Zellen nicht mehr exprimiert werden, beruhen könnte.

Der Apolipoprotein B-Rezeptor könnte als ein potentieller HCV-Rezeptor dienen, da die Viruspartikel mit Apolipoproteinen assoziiert sind (Thomssen et al., 1992, 1993). Der endgültige Beweis dieser Hypothese ist allerdings bis heute nicht erbracht. Seit kurzem wird das

Oberflächenmolekül CD81 als ein möglicher HCV-Rezeptor diskutiert. CD81 ist ein zur Familie der Tetraspanine gehörendes Oberflächenmolekül, das auf verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, darunter auch auf Hepatozyten und B-Lymphozyten. Das HCV Hüllprotein E2 ist in der Lage an CD81 zu binden. Neutralisierende Antikörper blockieren diese Interaktion (Pileri et al., 1998; Flint et al., 1999).

Ein anderes Konzept eines zellgestützten Modells für die Replikation des Hepatitis C Virus basiert auf der Transfektion potentiell replikationsfähiger RNAs auf Basis eines klonierten HCV-Genoms. Verglichen mit der Strategie, Zelllinien mit Hilfe von HCV-positivem Patientenmaterial zu infizieren, besitzt der Einsatz klonierter Virusgenome eine Reihe von Vorteilen. Das synthetische RNA-Inokulum kann in nahezu unbegrenzter Menge hergestellt werden. Es ist in seiner Sequenz klar definiert und kann nach Belieben manipuliert werden, was eine detaillierte genetische Analyse viraler Funktionen ermöglicht, die kritisch für Replikation und Pathogenese sind. Eine Transfektion von durch *in vitro* Transkription generierten Virusgenomen umgeht eine mögliche Blockade der Virusaufnahme in die Zielzelle durch eventuell fehlende Virusrezeptoren auf der Zelloberfläche, bzw. falsche Ligandenstrukturen auf der Virusoberfläche, da die virale RNA direkt ins Zytoplasma der Zielzelle befördert wird. Dieses Grundprinzip konnte bereits bei einer Reihe verschiedener RNA-Viren erfolgreich angewendet werden, von denen infektiöse cDNA-Klone zur Verfügung stehen (zur Übersicht Boyer und Haenni, 1994). So wurden innerhalb der Familie der *Flaviviridae*, der auch das HCV zugeordnet ist, infektiöse cDNAs für das Gelbfieber Virus (Rice et al., 1989), das Dengue Virus Typ 4 (Lai et al., 1991), das japanische Enzephalitis Virus (Sumiyoshi et al., 1992), das Kunjin Virus (Khromykh und Westaway, 1994) und den Erreger der Frühsommer-Meningoenzephalitis (Mandl *et al.*, 1997) beschrieben. Bei dem am engsten mit dem HCV verwandten Genus der Pestiviren wurden in den letzten Jahren infektiöse Klone für den Erreger der Schweinepest (Moormann et al., 1996; Meyers et al., 1996; Ruggli et al., 1996) und das Bovine Virale Diarrhö Virus (Vassilev *et al.*, 1997) veröffentlicht.

Im Falle des HCV wurden bisher zwei Zellkultursysteme, in denen es nach Transfektion klonierter Vollängengenome zur Virusproduktion kam publiziert (Yoo *et al.*, 1995 und Dash *et al.*, 1997). Allerdings besitzen beide beschriebenen cDNA-Klone kein vollständiges 3'-Ende des HCV-Genoms. Ihnen fehlt die sogenannte „X-Sequenz“ in ihren 3'-NTRs, die für eine Replikation unabdingbar ist (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000). Deshalb werden beide Veröffentlichungen eher skeptisch betrachtet (Fausto, 1997). Bis heute ist für beide Studien

weder eine erfolgreiche Infektion eines Schimpansen mit dem in Zellkultur replizierenden Virus, noch eine Sequenzanalyse der replizierenden Genome veröffentlicht.

Die einzig schlüssigen Beweise für die Infektiosität klonierter HCV-Genome konnten bislang durch Experimente an Schimpansen erzielt werden. Dabei wurden *in-vitro* Transkripte vollständiger cDNAs direkt in die Leber von Versuchstieren injiziert. Das Virus konnte bereits eine Woche nach Inokulation durch RT-PCR im Serum nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden zum Teil erhöhte Alanin-Aminotransferasewerte im Serum sowie eine Serokonversion detektiert (Kolykhalov et al., 1997; Yanagi et al., 1997, 1998). Damit konnte der formelle Beweis erbracht werden, daß das klonierte Genom infektiös ist. Da diese Infektionen auf einem einzigen Ausgangsklon bekannter Sequenz beruhen, sind detaillierte Folgestudien zur genetischen Drift des Virus möglich. Mit dem Einsatz klonierter Genome können für die HCV-Replikation und Pathogenese entscheidende Schritte *in-vivo* untersucht werden. Es ist aber offensichtlich, daß umfangreiche genetische Studien aus ethischen und finanziellen Gründen an Schimpansen nicht durchführbar sind.

4.2 Der Replikationsnachweis

Bei den zuvor angesprochenen Zellkultursystemen verwandter Viren konnte die Infektiosität der cDNAs durch den Nachweis infektiöser Viruspartikel bestätigt werden. Im Falle des HCV stellt die experimentelle Infektion von Schimpansen bis heute den einzig möglichen Nachweis infektiöser HCV-Partikel dar. Die bisher publizierten Zellkultursysteme ermöglichen keine zufriedenstellende Vermehrung der Viren, da die erzielten Mengen keine physikalische, proteinbiochemische oder infektiologische Charakterisierung von Viruspartikeln erlauben. Für den eindeutigen Nachweis einer HCV-Replikation muß deshalb der Minusstrang herangezogen werden, dessen Detektion sich auf die hochempfindliche aber fehleranfällige strangspezifische RT-PCR beschränkt.

Allgemein haftet Experimenten, die sich auf einen Minusstrang-Nachweis in Patientenmaterial oder Zellkultur stützen ein gewisses Maß an Unsicherheit an, wenn nicht gleichzeitig aussagekräftige Negativkontrollen zur Verfügung stehen. Im Falle der strangspezifischen RT-PCR sind Artefakte niemals völlig auszuschließen. Um eine Aussage treffen zu können müssen die Negativkontrollen eine der Probe vergleichbare Menge an RNA-Plusstrang enthalten, sie dürfen aber keinen Minusstrang aufweisen. Kontrollen dieser Art sind bei Untersuchungen von Patientenmaterial oder Infektionstests nicht vorhanden. Die Grenzen dieses Nachweisverfahrens müssen exakt bestimmt werden, bevor eine zuverlässige Aussage getroffen werden kann (Lanford et al., 1994).

4.2.1 Strangspezifische RT-PCR

Die Strangspezifische RT-PCR ermöglicht HCV Plus- oder Minusstrang-RNA selektiv nachzuweisen. Die hohe Sensitivität der Reaktion ist ein ausschlaggebender Faktor beim Nachweis geringer Virusmengen. Damit ergibt sich aber gleichzeitig das Problem, alle in der *in vitro* Transkription eingesetzte Plasmid-DNA soweit wie möglich aus der *in vitro* RNA entfernen zu müssen. Selbst kleinste Mengen HCV-DNA im Transfektionsansatz können zu falsch positiven Ergebnissen in der RT-PCR führen, da die Plasmid-DNA zum einen Minusstränge enthält, zum anderen auch länger in der Zelle verbleibt als RNA. Die Reinheit der transfizierten RNA ist deshalb von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der Transfektionsexperimente. Allerdings vermindert jeder einzelne Reinigungsschritt die Qualität der *in vitro* Transkripte. Die Ausbeute an HCV-Vollängen-RNA kann beispielsweise durch Scherkräfte während einer Phenolextraktion oder geringe RNase-Kontaminationen bei intensiven DNase-Verdaus beeinträchtigt werden. Die unter 2.8.2.2 beschriebene Reinigungsprozedur ist ein Kompromiß der eine ausreichende Reinheit, Integrität und Ausbeute der *in vitro* Transkripte gewährleistet. Eine DNA-Kontamination ist trotzdem nicht völlig auszuschließen. Deshalb muß jedem späteren HCV-Nachweis durch RT-PCR eine entsprechende Kontrollreaktion zugeordnet sein. Ein weiteres Problem der strangspezifischen RT-PCR sind unspezifisch initiierte c-DNAs, die während der reversen Transkription entstehen und in der PCR die Anwesenheit von HCV-Minusstrang vortäuschen können. Ihre Synthese wird durch unspezifisch an die Matrize bindende exogene RNAs oder durch Sekundärstrukturen der Matrizen-RNA ausgelöst (siehe 3.1.1.; Abb 3-3).

Der Bereich, in dem ein spezifischer Minusstrang-Nachweis mit RT-PCR möglich ist, liegt zwischen 3 und 4 log₁₀ Stufen (siehe 3.1.2). Im Falle von Transfektionsexperimenten mit Zellen müssen alle eingesetzten Gesamt-RNA Präparationen so lange in einer Titrationsreihe verdünnt werden, bis dieser spezifische Bereich der Nachweisreaktion erreicht ist. In Folge dessen wird natürlich auch die potentiell vorhandene Menge an HCV-Minusstrang mitverdünnt womit die Wahrscheinlichkeit sie nachzuweisen sinkt. Der hohe Aufwand an Vorversuchen vor dem eigentlichen Minusstrang-Nachweis, und eine sehr begrenzte Menge an Ausgangsmaterial, macht die Methode in dieser Form unattraktiv für die Auswertung umfangreicher Testreihen. Deshalb wurde intensiv darauf hingearbeitet, den Spezifitätsbereich der RT-PCR zu erweitern.

Eine mögliche Strategie ist der unter 3.1.2 beschriebene Einsatz sogenannter „TAG-Primer“ (Lanford et al., 1994; Lohmann, 1997). Der dabei erzielte, relativ geringe Spezifitätsgewinn (0,5-1-log₁₀ Stufe) geht allerdings mit einem deutlichen Verlust an Sensitivität einher (mindestens 2 log₁₀-Stufen). Das Nachweissystem ist ferner empfindlich gegenüber Änderungen der

Reaktionsbedingungen. Dies gilt besonders in Bezug auf die eingesetzte Primermenge. Variationen in Qualität, Art und Menge zellulärer RNA-Präparationen, die ebenfalls einen Einfluß auf die Reaktionsbedingungen haben, lassen sich nicht ausschließen, da unter anderem verschiedene Zelllinien untersucht werden. Alles in allem ist die herkömmliche strangspezifische RT-PCR besser für die Auswertung der durchgeführten RNA-Transfektionsexperimente geeignet.

Ein Ansatzpunkt eine höhere Strangspezifität zu erreichen, ist die Temperatur während der reversen Transkription zu erhöhen. Dafür müssen allerdings neue Enzyme eingesetzt werden, denn die Aktivität der ansonsten verwendeten MMLV-RT läßt über 48°C stark nach. In Betracht kommen dafür die beiden Enzyme rTth und AMV-RT, die bei 72°C und 60°C aktiv sind. Eine weitere Möglichkeit die Spezifität positiv zu beeinflussen, ist mögliche Quellen unspezifischer Initiation von cDNAs in Form kleiner RNA-Moleküle, aus den zellulären RNA-Präparationen zu entfernen. Dies ist mit Hilfe einer speziellen Affinitätssäule zur RNA-Aufreinigung (z. B. RNeasy, Qiagen) möglich, die RNAs erst ab einer Länge von 200 Nukleotiden bindet. Bei einer weiteren Alternative oxidiert man die 3'-OH-Enden der RNAs mit Hilfe von Natriumperjodat (Gunji et al., 1994). Die Ribose wird zum Dialdehyd oxidiert wobei die Ringstruktur der Ribose aufbricht. Damit wäre eine Initiation unspezifischer cDNAs unterbunden, da nur die in die RT eingebrachten Primermoleküle noch über 3'-OH Gruppen verfügen, an denen die cDNA-Synthese beginnen kann.

Bedauerlicherweise ist ein positiver Effekt der alternativen reversen Transkriptasen sowie der beiden RNA-Behandlungen auch nach umfangreichen Untersuchungen in unserem Testsystem nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

Um nach einer Transfektion von *in vitro* RNAs einen Hinweis auf Replikation zu erhalten, gibt es neben dem Minusstrangnachweis auch die Möglichkeit, die Verweildauer viraler Plusstrang-RNA in den transfizierten Zellen zu beobachten. Entsprechende Untersuchungen ergaben, daß die *in vitro* RNA noch mehrere Wochen nach Transfektion in den Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3-23). Zusätzlich sollte eine aussagekräftige Negativkontrolle in Form einer nicht replikationsfähigen Deletionsmutante eingesetzt werden, mit der die potentiell replikationsfähigen Konstrukte verglichen werden können. Betrachtet man die vielen Unwägbarkeiten des strangspezifischen HCV-Nachweises mit RT-PCR so liegt der Schluß nahe, daß die Ergebnisse der vorgestellten RT-PCR-Nachweise nur in der Summe betrachtet werden sollten, bevor eine Aussage getroffen wird. Allerdings begrenzt der dabei notwendige hohe experimentelle und zeitliche Aufwand deutlich die Einsatzmöglichkeiten des Nachweissystems.

Mit Hilfe der RT-PCR können einzelne konkrete Beispielskombinationen von HCV-Konstrukt und Zelllinie untersucht werden. Für umfangreiche Screeningversuche mit mehreren Konstrukten in einer Reihe verschiedener Zelllinien ist die Methode ungeeignet.

Alles in allem muß, verglichen mit anderen Plusstrang-RNA-Viren, eine lange Reihe von Schwierigkeiten überwunden werden, die den Versuch infektiöse Transkripte des HCV nachzuweisen behindert.

- Das HCV repliziert extrem schlecht oder gar nicht in Zellkultur.
- Neben dem Schimpansen steht kein zuverlässiges Nachweissystem für infektiöse HCV-Partikel zur Verfügung.
- Aufgrund der niedrigen Virustiter muß der Virusnachweis mit strangspezifischer RT-PCR durchgeführt werden.
- Replikation muß durch den Nachweis von Minusstrang und dem Vergleich mit einer aussagekräftigen Negativkontrolle bewiesen werden.
- Bei hohen Mengen an Plusstrang treten falsch positive Minusstrang-Signale auf.
- Für eine Transfektion werden großen Menge an Plusstrang-RNA-Inokulum eingesetzt. Infolgedessen muß eine zelluläre Gesamt-RNA-Präparation soweit verdünnt werden, bis der spezifische Bereich der strangspezifischen PCR erreicht ist. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit das HCV nachzuweisen.
- Plasmid-DNA muß mit Hilfe einer aufwendigen Reinigungsprozedur vollständig aus der *in vitro* Transkription entfernt werden. Dies vermindert die Integrität der *in vitro* RNA.

4.3 Die Vollängensequenz NK1 (RB01)

Als erstes wurde die HCV-Vollängensequenz NK1 auf ihre Replikationskompetenz in Zelllinien untersucht. Die mit Hilfe des Konstrukts pBT 1-9428 erhaltenen *in vitro* Transkripte wurden in die Zelllinien BHK-21 und HuH-7 transfiziert. Obwohl der HCV-Plusstrang bis zu 5 Wochen lang detektiert werden konnte, war es nicht möglich den Minusstrang nachzuweisen. Ein Mengenunterschied des Plusstrangs im Vergleich mit der parallel untersuchten Deletionsmutante pBT 1-9428 Δ 5b war ebenfalls nicht nachzuweisen (Tab. 1). Aus den Beobachtungen kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die NK1-Sequenz nicht in der Lage ist in nachweisbaren Mengen in den Zelllinien BHK-21 und HuH-7 zu replizieren.

Als eine mögliche Ursache hierfür wäre denkbar, daß den untersuchten Zelllinien ein für die HCV-Replikation essentieller zellulärer Faktor fehlt. Neben dem fehleranfälligen Nachweissystem können potentielle Fehlerquellen aber auch in der NK1-Sequenz selbst liegen.

Die Sequenz besitzt zwei zusätzliche Guanosin-Moleküle am 5'-Ende, die durch den davorliegenden T7-Promotor in die Sequenz eingebracht wurden. Die Fremdsequenz könnte eine Replikation des Polyproteins behindern. Der wichtigste Punkt betrifft das 3'-Ende der Sequenz. Zeitgleich zu den beschriebenen ersten Transfektionsexperimenten wurde eine zusätzliche, 98 Nukleotide lange, stark konservierte „X-Sequenz“ am 3'-Ende des HCV isoliert (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1995, 1996). Es wurde gezeigt, daß die Sequenz essentiell für die Virusreplikation ist. Außerdem erhöht die „X-Sequenz“ die Translationsrate um den Faktor 3-5 gegenüber einem Virusgenom ohne „X-Sequenz“, indem sie an ein Polypyrimidin-Trakt bindendes Protein bindet, welches wiederum in Kontakt mit der HCV-IRES tritt (Ito *et al.*, 1998). Ein weiterer, schwer einzuschätzender Faktor in Bezug auf die Qualität der NK1-Sequenz betrifft die Klonierungsprozedur des Virusgenoms. Bei der Klonierung vollständiger Genome von Plusstrang RNA-Viren muß generell eine Reihe von Schwierigkeiten überwunden werden. So kann der Gebrauch spezieller *E. coli*-Stämme und „high copy“-Plasmide zur Instabilität der klonierten HCV-Sequenzen führen (Lai *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1996). In der Regel kann das Problem durch den Einsatz rekombinationsdefizienter *E. coli* Stämme (z.B. Sure, DH5 α) und Vektoren mittlerer Kopienzahl (z.B. pBR322 und seine Derivate) gelöst werden. Es ist aber möglich, daß klonierte Virusgenome grundsätzlich instabil in *E. coli* sind. So gelang es Rice und Mitarbeitern (1989) trotz großer Anstrengungen nicht, ein vollständiges Genom des Gelbfieberevirus stabil in *E. coli* zu klonieren. Grund dafür war offenbar eine toxische Wirkung des Kompletengenoms. Im Falle des Japanischen Enzephalitis Virus gelang es zwar mehrere Bakterienklone herzustellen, die ein vollständiges Virusgenom besaßen. Von diesen Klonen war allerdings kein einziger infektiös. Grund dafür war die Entstehung von Mutationen innerhalb der viralen Sequenz während der Passage in *E. coli*-Bakterien, die das virale Genom inaktivieren (Sumiyoshi *et al.*, 1992).

Während der Konstruktion des NK1-Genoms traten keine grundlegenden Probleme auf. Allerdings kann das Auftreten von Punktmutationen nicht ausgeschlossen werden, da das fertige Konstrukt nur in Bezug auf die Integrität des offenen Leserasters durch die Expression des Polyproteins überprüft wurde. Eine Sequenzierung des Genoms fand aufgrund des zu hohen Aufwandes nicht statt. Als Ursache der später beobachteten Replikationsdefizienz sind Rekombinationen und Punktmutationen eher unwahrscheinlich, da mit dem Einsatz rekombinationsdefizienter Bakterienstämme (DH5a, Sure) sowie von Vektoren mittlerer Kopienzahl (die pBR322 Derivate pBT3 und pBT37) ausreichende Sicherheitsmaßnahmen ergriffen wurden.

Auch das HCV selbst kann im Rahmen seiner Genomreplikation zu Fehlern in der Sequenz beitragen, indem seine RNA-abhängige RNA-Polymerase falsche Nukleotide in den neusynthetisierten RNA-Strang einbaut (1.7.6). Ein weiterer Risikofaktor liegt in der Amplifikation der viralen Sequenz in zwei aufeinanderfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen („nested-PCR“). Aufgrund der Fehlerrate der Taq-Polymerase von $2,7 \times 10^{-5}$ (Mutationsfrequenz / Basenpaar / Temperaturzyklus; Bracho *et al.*, 1998) ist das Auftreten von Mutationen im Rahmen der Klonierungs-PCRs wahrscheinlich.

Alles in allem können durch diese Vorgänge Mutationen in das Genom eingeführt werden, die von stillen, d. h. die Aminosäuresequenz nicht verändernden Nukleotidaustauschen, bis zu Verschiebungen im Leseraster oder Stop-Codons innerhalb der Sequenz führen.

Da sich das NK1-Genom aus 11 verschiedenen PCR-Fragmenten zusammensetzt, besteht ferner die Möglichkeit, daß Teilsequenzen verschiedener Quasispezies zusammengefügt wurden, die in dieser Kombination nicht miteinander kompatibel sind.

Die funktionellen Voraussetzungen der HCV-Replikation sind nur in begrenztem Umfang bekannt. Die Prozessierung des Polyproteins und die enzymatische Aktivität der Spaltprodukte (NS3, NS4A, NS5B) des NK1-Genoms wurde soweit wie möglich bestätigt, allerdings gibt es daneben noch HCV-Proteine, deren Funktion weitestgehend unbekannt ist (p7, NS4B, NS5A). Des weiteren könnten die Proteine neben ihren bekannten Aktivitäten noch zusätzliche, unbekanntes besitzen, die gestört sind.

Aufgrund der Vielzahl der zuvor angesprochenen Ursachen von Mutationen ergibt sich das Problem einzelne Nukleotidaustausche innerhalb der NK1-Sequenz zu identifizieren. Ein Vergleich mit einer Konsensussequenz hilft bei der Identifikation von Mutationen. Um isolatspezifische Austausche identifizieren zu können muß eine Konsensussequenz des einzelnen Isolats erstellt werden. Dies gelingt erst mit Hilfe einer Sequenzierung und dem Vergleich mehrerer Klone desselben Isolats.

4.4 Reklonierung des HCV-Genoms

Als Basis für die Erstellung einer Konsensussequenz mußte eine Reihe verschiedener Varianten des Isolats aus Patientenmaterial kloniert werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet PCR-Fehler und Rekombinationen während der Klonierungsprozedur zu minimieren. Eine Maßnahme ist, wie bereits bei der Klonierung des NK1-Genoms praktiziert, der Einsatz von Klonierungsvektoren mit geringer Kopienzahl wie zum Beispiel der pBR322-Derivate pBT und pFK sowie rekombinationsdefizienter Bakterienstämme. Ein weiterer entscheidender Schritt ist die Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktion wie Vent

oder Pfu-Polymerase (Mattila *et al.*, 1991; Lundberg *et al.*, 1991; Cline *et al.*, 1996). Werden reine Korrekturlese-Polymerasen eingesetzt können allerdings eine Reihe von Problemen auftreten (3.4.3 ff). Ausbeute und Reproduzierbarkeit variieren stark, begleitet von einer großen Menge an unspezifischen Nebenprodukten. Diese sind durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion der Polymerase bedingt, die Teile der 3'-Enden von Primermolekülen abdaut und damit die Spezifität der Hybridisierungsreaktion verringert. Des weiteren können nur relativ kurze DNA-Fragmente effektiv amplifiziert werden. Bereits ab einer Grenze von 1-1,5 kb kann dies sehr problematisch sein. Um eine weitestgehend authentische Sequenz zu erhalten sollte sich ein rekloniertes Genom aus möglichst wenigen PCR-Fragmenten zusammensetzen. Deshalb ist es notwendig möglichst lange Fragmente der HCV-Sequenz zu amplifizieren.

Abhilfe bei diesen Problemen schafft erst der Einsatz einer Mischung aus Korrekturlese-Polymerase und Taq-Polymerase in der sogenannten „Long-PCR“ (Barnes *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994). Mit der Kombination beider DNA-Polymerasetypen in Verbindung mit einer Optimierung von Primerdesign, Pufferzusammensetzung, pH-Wert sowie des Temperaturzyklus können Fragmente einer Länge von bis zu 35 kb amplifiziert werden. Beim Einsatz des Polymerase-Mix muß allerdings eine geringere Kopiergenauigkeit in Kauf genommen werden, die aber immer noch etwa zehnfach über der von Taq DNA-Polymerase liegt (Barnes *et al.*, 1994). In Kombination mit der reversen Transkription ist die Long-PCR auch für die Amplifikation von RNA-Viren geeignet. Nach umfangreicher Optimierung gelang es Tellier *et al.* (1996) nahezu das vollständige Genom des HCV vervielfältigen. Diese Methode führte schließlich auch bei der Reklonierung des HCV-Genoms zum Erfolg. Die Grundlage dafür bildeten neben den zuvor angesprochenen Verbesserungen der Methode im Vergleich zur Standard-PCR auch der Einsatz von DMSO zur Destabilisierung von Sekundärstrukturen sowie Lebergewebe als Ausgangsmaterial der RNA-Präparation.

Beim Vergleich der Eigenschaften des Konsensusgenoms K1 mit dem Nicht-Konsensusgenom NK1 kann eine Reihe von Unterschieden beobachtet werden, die Hinweise auf mögliche Fehler bzw. Mutationen im NK1-Genom sind. Durch einen Nukleotidaustausch in der 5' NTR des K1-Genoms wird die Aktivität der HCV-IRES verdoppelt. Der Hintergrund wird bei einem genaueren Blick auf die Sekundärstruktur der HCV 5'-NTR deutlich. Die Mutation von C nach T befindet sich an Position 196 der Nukleotidsequenz des K1-Genoms. Genau an dieser Stelle liegt die apikale Schleife der Haarnadelstruktur von Domäne 3 der HCV-IRES. Mit dieser Mutation wird eine hochkonservierte pyrimidinreiche Region im Bereich von Nukleotid 192-203 (CCTTTCTTGGA) wieder hergestellt. Die Sequenz ist komplementär zu den Basen 461-471 der

humanen 18S rRNA und hat während der Initiation der Translation die Funktion einer Bindungsstelle für die ribosomale 18S Untereinheit (Brown et al., 1992).

Eine andere potentiell positive Veränderung kann im Falle des Hüllproteins E2 beobachtet werden. Hier beinhaltet die Konsensussequenz ein Motiv für eine zusätzliche Glykosylierungsstelle, die den unter Punkt 3.5.3 durchgeführten Untersuchungen nach mit hoher Wahrscheinlichkeit funktionell ist. E2 wird die Initiation der Virusanheftung an die Wirtszelle zugeschrieben, da E2-spezifische Antiseren die Bindung des Virus an Wirtszellen hemmen (Rosa et al., 1996). Es kann spekuliert werden, daß die zusätzliche Glykosylierung die Struktur des E2 in positiver Weise beeinflusst. Ob dies auch in der Realität der Fall ist müssen weitere Experimente klären.

Bei näherer Betrachtung des NS5A der K1-Sequenz ist festzustellen, daß es im Gegensatz zur NK1-Sequenz auch in hyperphosphorylierter Form vorkommt (3.5.4). Die Phosphorylierung von NS5A ist eine Eigenschaft, die bei vielen Mitgliedern der Familie Flaviviridae beobachtet werden kann. Dies läßt auf eine wichtige Rolle im Lebenszyklus dieser Viren schließen (Reed et al., 1997, 1998). Über die Rolle des NS5A in der Replikation kann bisher nur spekuliert werden. In Analogie zu anderen RNA-Viren wäre es möglich daß NS5A in die Regulation der RNA-Replikation involviert ist. Als Beispiel kann hier das VSV (Vesicular Stomatitis Virus) angeführt werden, bei dem die Phosphorylierung des P-Proteins die Voraussetzung für eine RNA-Synthese ist (Barik & Banerjee, 1992).

Obwohl das K1-Genom in vielerlei Hinsicht dem NK1-Genom gegenüber verbessert ist, repliziert die K1-Vollängensequenz nicht in nachweisbaren Mengen in transfizierten Huh-7 Zellen (3.6). Somit stellt sich weiterhin die Frage nach der Ursache der Replikationsdefizienz. Eine einfache Antwort wäre ein bisher nicht entdeckter Fehler in der Sequenz. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die Konsensussequenz aus einer hinreichenden Menge an Sequenzdaten ermittelt wurde und nach ihrer Konstruktion eine Kontrollsequenzierung durchgeführt wurde. Es wäre denkbar, daß es nach der Transfektion zwar zu einer Replikation kommt, diese aber auf so geringem Niveau stattfindet, daß sie mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachzuweisen ist. Es kann ferner spekuliert werden, daß der Hybridomazelllinie Huh-7 ein für die HCV-Replikation wichtiger zellulärer Faktor fehlt, oder die aus der Leber stammende Konsensussequenz nicht weit genug an die Huh-7 Wirtszelle angepaßt ist.

Eine erfolgreich transfizierte Zelle, in der das Genom repliziert und HCV-Proteine synthetisiert werden, ist nicht transfizierten Zellen gegenüber im Nachteil, die keine Virusbestandteile synthetisieren. Deshalb könnten transfizierte Huh-7 Zellen in Zellkultur schnell von nicht

transfizierten Zellen verdrängt werden. Darüberhinaus können HCV-Strukturproteine zytotoxisch wirken (Moradpour et al., 1998), was das Überleben und die Konkurrenzfähigkeit gegenüber nicht transfizierten Zellen weiter in Frage stellt. Eine Strategie, um dieses Problem zu umgehen ist der Einsatz eines positiven Selektionsmarkers zusätzlich zur HCV-Sequenz, wie z.B. einer Antibiotikaresistenz. Damit wäre der Selektionsnachteil positiv transfizierter Zellen in einen Selektionsvorteil verwandelt, zum Preis einer nicht mehr authentischen HCV-Sequenz.

4.5 Selektionierbare Replikons als Alternative zur Transfektion von Vollängen-Genomen

Einen entscheidenden Durchbruch brachte die Konstruktion und Transfektion selektionierbarer Replikons (siehe 3.7). Dieser neue Ansatz basiert auf einer Reihe von Beobachtungen bei verschiedenen Plusstrang-RNA-Viren wie Alpha-, Flavi- und Pestiviren. Diese zeigen unter anderem, daß Strukturproteine für die RNA-Replikation nicht zwingend notwendig sind (Khromykh & Westaway, 1997; Behrens et al., 1998). Der Einsatz der Replikons bietet folgende Vorteile:

- 1.) Ein möglicher zytotoxischer Effekt aufgrund des hohen Expressionsniveaus der Strukturproteine wird vermieden (Moradpour et al., 1998).
- 2.) Geht man des weiteren davon aus, daß kurze RNAs im allgemeinen effizienter replizieren als Vollängengenome, liegt der Schluß nahe die Region der Strukturproteine aus dem klonierten Genom zu entfernen.
- 3.) Es werden nur Zellen selektioniert, in denen die RNA effizient repliziert

Im Rahmen der unter 3.8-3.9 beschriebenen Experimente wird eine Reihe von Beweisen für eine Replikation geführt. Virale Plusstrang-RNA korrekter Größe wird mit Hilfe der Northern-Hybridisierung nachgewiesen. Dabei liegt die Menge an Replikons zwischen 1000 und 3000 pro Zelle. Eine Kontamination des untersuchten Zellklons mit integrierter Plasmid-DNA kann nach einer PCR mit anschließender Southern-Hybridisierung ausgeschlossen werden. Die Unempfindlichkeit der RNA-Plusstrangsynthese gegenüber dem Antibiotikum Actinomycin D, welches selektiv die RNA-Synthese von DNA-Matrizen inhibiert zeigt, daß RNA-Matrizen für die Synthese der RNA-Plusstränge verantwortlich sind. Die Plusstränge konnten ferner metabolisch mit [3H]-Uridin markiert werden, was ihre de novo Synthese beweist. Die viralen Antigene NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B können mit Hilfe von ³⁵S-Markierung und Immunpräzipitation bzw. Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Lohmann et al., 1999). Eine

Reklonierung des Replikons ist außerdem möglich. In der Sequenz der dabei erhaltenen Klone sind Mutationen zu erkennen, bei denen es sich gegebenenfalls um Adaptationen handeln kann.

Werden alle zuvor angeführten Nachweise in Betracht gezogen, so kann am Beispiel des Zellklons 9-13 mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die transfizierte Replikon-Sequenz in der Zelllinie Huh-7 in großen Mengen repliziert.

Betrachtet man alle bisher zur Verfügung stehenden HCV-Zellkultursystemen sind eine Reihe von klaren Vorteilen des neuen, auf subgenomischen Replikons basierenden Zellkultursystems erkennbar. RNA-Replikation und Proteinexpression befinden sich auf einem bisher unerreicht hohen Niveau. Dies erlaubt den Einsatz von alternativen, weit weniger fehleranfälligen und verlässlicheren Nachweismethoden als der PCR, wie z. B. Northern-Blot, Immunpräzipitation oder Immunfluoreszenz. Das Zellkulturssystem basiert auf der Kulturzelllinie Huh-7. Im Gegensatz zu primären Hepatozyten ist die Hepatomzelllinie in nahezu unbegrenzter Menge verfügbar. Die darauf basierende Replikon-Zelllinie 9-13 kann bisher unbegrenzt lang in Kultur gehalten werden, ohne daß die Replikon-Menge in den Zellen sinkt (V. Lohmann, pers. Mitteilung). Primäre Hepatozytenkulturen sind im Gegensatz dazu nur schwer verfügbar, schwerer zu handhaben und sterben nach wenigen Wochen in Kultur ab.

Mit auf klonierten HCV-Sequenzen beruhenden *in vitro* Transkripten konnten bisher lediglich Schimpansen erfolgreich infiziert werden. Als System für weitere detaillierte genetische Analysen sind Schimpansen aufgrund ethisch-moralischen Gründen, mangelnder Verfügbarkeit und Kostengründen ungeeignet. Zwar verfügen die Replikons lediglich über die viralen Funktionen, die für die RNA-Replikation notwendig sind, sie besitzen aber im Vergleich zu Vollängengenomen eine höhere biologische Sicherheit. Experimente mit den Replikons müssen nicht wie bei Vollängensequenzen im S3-Labor durchgeführt werden. An der klar definierten Ausgangssequenz kann nach Belieben gezielt manipuliert werden, um die HCV-Replikation im Detail zu erforschen und Teile der Sequenz zu erkennen, die kritisch für die Pathogenese sind.

In der Sequenzanalyse verschiedener Klone des reklonierten Replikons aus Zellklon 9-13 (siehe 3.9) ist eine Mutation besonders auffällig. An Nukleotidposition 8991 befindet sich in allen untersuchten Klonen ein Austausch, der zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt. Dabei wird die positiv geladene Aminosäure Arginin durch die neutrale Aminosäure Glycin ersetzt. In Anbetracht der Konserviertheit des Austausches in allen reklonierten Klonen ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich um eine Mutation des Replikons handelt, die sich früh ereignet hat und deshalb in allen Nachkommen-RNAs auftritt. Dabei könnte es sich um eine replikationssteigernde adaptive Mutation handeln. Eine endgültige Klärung dieser Frage steht

noch aus. Ein Vergleich der Replikationsraten zweier Sequenzen, die dem reklonierten Replikon entsprechen und sich nur an Position 8991 voneinander unterscheiden kann diese Frage klären.

4.6 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines HCV-Konsensusgenoms und den daraus konstruierten subgenomischen Replikons ein großer Schritt in Richtung auf ein produktives HCV-Zellkultursystem gemacht werden. Die Transfektion subgenomischer, selektionierbarer Replikons in die humane Hepatoma-Zelllinie Huh-7 stellt zur Zeit die einzige Methode dar, über lange Dauer eine hohe und einfach nachweisbare Replikation von HCV-RNA zu erreichen.

Es gibt eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für dieses System. So ist es vorstellbar die Interferon α und Ribavirin-Therapie in Bezug auf ihren Wirkmechanismus sowie die Resistenzmechanismen des Virus näher zu untersuchen.

Außerdem können nun Wirtszellfaktoren definiert werden, welche für die HCV-Replikation unabdingbar sind. Diese sollten in der Zelllinie HuH-7 zu finden sein.

Es wäre ferner denkbar ein sogenanntes „Gene Profiling“ durchzuführen. Dabei werden Gene der Wirtszelle bestimmt, die durch die HCV-Replikation aktiviert bzw. reprimiert werden. Aus diesen Daten ließen sich eventuell Rückschlüsse auf die Pathogenese der HCV-Infektion ziehen.

Mit Hilfe gezielter Mutationen der Replikon-Sequenz könnte die Funktion der viralen Proteine im Rahmen der Replikation weiter untersucht werden („reverse genetics“). So ist beispielsweise über die Funktion des NS5A noch immer wenig bekannt.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer werden sich die Replikons an die Wirtszelllinie anpassen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welche Bereiche des Genoms sich verändern und welche eher konstant bleiben. Zusätzlich bietet sich an die Mutationsrate dieses in vivo-Systems zu bestimmen und mit entsprechenden Daten infizierter Patienten zu vergleichen.

Ein wichtiger Schritt wäre das Spektrum der mit dem Replikon infizierbaren Zelllinien zu erweitern. Als Kandidaten sind dabei alle bisher als potentiell mit HCV infizierbar veröffentlichte Zelllinien zu sehen. Weitere Untersuchungen sollten ferner die Vollängensequenz betreffen. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, ein Replikon zu konstruieren, welches zusätzlich sämtliche Strukturproteine besitzt. Dieses Konstrukt besäße theoretisch alle für die Bildung von Viruspartikeln notwendigen Komponenten. Nach Transfektion dieses Konstrukts könnten innerhalb und außerhalb der Wirtszelle Viruspartikel auftreten und nachgewiesen werden.

Mit den durchgeführten Experimenten konnte hinreichend bewiesen werden, daß die Replikons autonom in HuH-7 Zellen replizieren. Aufgrund der hohen Replikation ermöglicht das System neue bisher nicht durchführbare Ansätze die HCV-Replikation im Detail zu studieren. Da die Replikons alle für die RNA-Vermehrung notwendigen viralen Enzyme exprimieren, die die

Hauptansatzpunkte für antiviral wirkende Pharmazeutika sind, ist damit auch erstmals eine Therapieentwicklung mit Hilfe eines zellgestützten Replikationssystems möglich.

5

Anhang

5.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz des HCV-Konsensusgenoms K1

→ 5'-NTR

GC CAG CCC CCG ATT GGG GGC GAC ACT CCA CCA TAG ATC ACT CCC CTG TGA GGA ACT ACT
 11 20 29 38 47 56

GTC TTC ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT AGT ATG AGT GTC GTG CAG CCT CCA GGA CCC
 68 77 86 95 104 113 122

CCC CTC CCG GGA GAG CCA TAG TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA CCG GAA TTG CCA GGA CGA
 131 140 149 158 167 176 185

CCG GGT CCT TTC TTG GAT CAA CCC GCT CAA TGC CTG GAG ATT TGG GCG TGC CCC CGC GAG ACT
 194 203 212 221 230 239 248

GCT AGC CGA GTA GTG TTG GGT CGC GAA AGG CCT TGT GGT ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG
 257 266 275 284 293 302 311

1 → Core

TGC CCC GGG AGG TCT CGT AGA CCG TGC ACC ATG AGC ACG AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC
 320 329 338 347 356 365 374

12
 Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
 AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTC GGT
 383 392 401 410 419 428 437

32
 Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 GGA GTT TAC CTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCG ACT AGG AAG ACT TCC
 446 455 464 473 482 491 500

54
 Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg
 GAG CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC CAG CCC GAG GGT AGG
 509 518 527 536 545 554 563

75
 Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly
 GCC TGG GCT CAG CCC GGG TAC CCC TGG CCC CTC TAT GGC AAT GAG GGC TTG GGG TGG GCA GGA
 572 581 590 599 608 617 626

96
 Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser
 TGG CTC CTG TCA CCC CGT GGC TCT CGG CCT AGT TGG GGC CCC ACG GAC CCC CGG CGT AGG TCG
 635 644 653 662 671 680 689

117
 Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile
 CGC AAT TTG GGT AAG GTC ATC GAT ACC CTC ACG TGC GGC TTC GCC GAT CTC ATG GGG TAC ATT
 698 707 716 725 734 743 752

138
 Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu
 CCG CTC GTC GGC GCC CCC CTA GGG GGC GCT GCC AGG GCC CTG GCG CAT GGC GTC CGG GTT CTG
 761 770 779 788 797 806 815

159
 Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu
 GAG GAC GGC GTG AAC TAT GCA ACA GGG AAT CTG CCC GGT TGC TCC TTT TCT ATC TTC CTT TTG
 824 833 842 851 860 869 878

180
 Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val
 GCT TTG CTG TCC TGT TTG ACC ATC CCA GCT TCC GCT TAT GAA GTG CGC AAC GTA TCC GGA GTG
 887 896 905 914 923 932 941

I → E1

201
Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ala Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met
TAC CAT GTC ACG AAC GAC TGC TCC AAC GCA AGC ATT GTG TAT GAG GCA GCG GAC ATG ATC ATG
950 959 968 977 986 995 1004

222
His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu
CAT ACC CCC GGG TGC GTG CCC TGC GTT CGG GAG AAC AAC TCC TCC CGC TGC TGG GTA GCG CTC
1013 1022 1031 1040 1049 1058 1067

243
Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp
ACT CCC ACG CTC GCG GCC AGG AAC GCT AGC GTC CCC ACT ACG ACG ATA CGA CGC CAT GTC GAT
1076 1085 1094 1103 1112 1121 1130

264
Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val
TTG CTC GTT GGG GCG GCT CTC TGC TCC GCT ATG TAC GTG GGA GAT CTC TGC GGA TCT GTT
1139 1148 1157 1166 1175 1184 1193

285
Phe Leu Val Ala Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn
TTC CTC GTC GCC CAG CTG TTC ACC TTC TCG CCT CGC CGG CAC GAG ACA GTA CAG GAC TGC AAT
1202 1211 1220 1229 1238 1247 1256

306
Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
TGC TCA ATA TAT CCC GGC CAC GTG ACA GGT CAC CGT ATG GCT TGG GAT ATG ATG ATG AAC TGG
1265 1274 1283 1292 1301 1310 1319

327
Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met
TCA CCT ACA GCA GCC CTA GTG GTA TCG CAG TTA CTC CGG ATC CCA CAA GCT GTC GTG GAT ATG
1328 1337 1346 1355 1364 1373 1382

348
Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
GTG GCG GGG GCC CAT TGG GGA GTC CTA GCG GGC CTT GCC TAC TAT TCC ATG GTG GGG AAC TGG
1391 1400 1409 1418 1427 1436 1445

369
E1 ← | → E2
Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly Gly Thr Tyr Val Thr Gly
GCT AAG GTT CTG ATT GTG ATG CTA CTC TTT GCC GGC GTT GAC GGG GGA ACC TAT GTG ACA GGG
1454 1463 1472 1481 1490 1499 1508

390
Gly Thr Met Ala Lys Asn Thr Leu Gly Ile Thr Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ser Gln Lys
GGG ACG ATG GCC AAA AAC ACC CTC GGG ATT ACG TCC CTC TTT TCA CCC GGG TCA TCC CAG AAA
1517 1526 1535 1544 1553 1562 1571

411
Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
ATC CAG CTT GTA AAC ACC AAC GGC AGC TGG CAC ATC AAC AGG ACT GCC CTG AAC TGC AAT GAC
1580 1589 1598 1607 1616 1625 1634

432
Ser Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys
TCC CTC AAC ACT GGG TTC CTT GCT GCG CTG TTC TAC GTG CAC AAG TTC AAC TCA TCT GGA TGC
1643 1652 1661 1670 1679 1688 1697

453
Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Ser Pro Ile Asp Ala Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr
CCA GAG CGC ATG GCC AGC TGC AGC CCC ATC GAC GCG TTC GCT CAG GGG TGG GGG CCC ATC ACT
1706 1715 1724 1733 1742 1751 1760

474
Tyr Asn Glu Ser His Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys
TAC AAT GAG TCA CAC AGC TCG GAC CAG AGG CCT TAT TGT TGG CAC TAC GCA CCC CGG CCG TGC
1769 1778 1787 1796 1805 1814 1823

495
Gly Ile Val Pro Ala Ala Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val
GGT ATC GTA CCC GCG GCG CAG GTG TGT GGT CCA GTG TAC TGC TTC ACC CCA AGC CCT GTC GTG
1832 1841 1850 1859 1868 1877 1886

516	Val	Gly	Thr	Thr	Asp	Arg	Phe	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Asp	Val
GTG	GGG	ACG	ACC	GAC	CGG	TTC	GGC	GTC	CCT	ACG	TAC	AGT	TGG	GGG	GAG	AAT	GAG	ACG	GAC	GTG	
	1895			1904			1913			1922			1931		1940			1949			
537	Leu	Leu	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	Asn	Trp	Phe	Gly	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser
CTG	CTT	CTT	AAC	AAC	ACG	CGG	CCG	CCG	CAA	GGC	AAC	TGG	TTT	GGC	TGT	ACA	TGG	ATG	AAT	AGC	
	1958			1967			1976			1985			1994		2003			2012			
558	Thr	Gly	Phe	Thr	Lys	Thr	Cys	Gly	Gly	Pro	Pro	Cys	Asn	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Asn	Lys	Thr
ACT	GGG	TTC	ACC	AAG	ACG	TGC	GGG	GGC	CCC	CCG	TGT	AAC	ATC	GGG	GGG	ATC	GGC	AAT	AAA	ACC	
	2021			2030			2039			2048			2057		2066			2075			
579	Leu	Thr	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Thr	Tyr	Thr	Lys	Cys	Gly	Ser
TTG	ACC	TGC	CCC	ACG	GAC	TGC	TTC	CGG	AAG	CAC	CCC	GAG	GCC	ACT	TAC	ACC	AAG	TGT	GGT	TCG	
	2084			2093			2102			2111			2120		2129			2138			
600	Gly	Pro	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Cys	Leu	Val	His	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys
GGG	CCT	TGG	TTG	ACA	CCC	AGA	TGC	TTG	GTC	CAC	TAC	CCA	TAC	AGG	CTT	TGG	CAC	TAC	CCC	TGC	
	2147			2156			2165			2174			2183		2192			2201			
621	Thr	Val	Asn	Phe	Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu	Glu
ACT	GTC	AAC	TTT	ACC	ATC	TTC	AAG	GTT	AGG	ATG	TAC	GTG	GGG	GGA	GTG	GAG	CAC	AGG	CTC	GAA	
	2210			2219			2228			2237			2246		2255			2264			
642	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asn	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu
GCC	GCA	TGC	AAT	TGG	ACT	CGA	GGA	GAG	CGT	TGT	AAC	CTG	GAG	GAC	AGG	GAC	AGA	TCA	GAG	CTT	
	2273			2282			2291			2300			2309		2318			2327			
663	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Glu	Trp	Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro
AGC	CCG	CTG	CTG	CTG	TCT	ACA	ACG	GAG	TGG	CAG	GTA	TTG	CCC	TGT	TCC	TTC	ACC	ACC	CTA	CCG	
	2336			2345			2354			2363			2372		2381			2390			
684	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Val	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly
GCT	CTG	TCC	ACT	GGT	TTG	ATC	CAT	CTC	CAT	CAG	AAC	GTC	GTG	GAC	GTA	CAA	TAC	CTG	TAC	GGT	
	2399			2408			2417			2426			2435		2444			2453			
705	Ile	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Ser	Phe	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu
ATA	GGG	TCG	GCG	GTT	GTC	TCC	TTT	GCA	ATC	AAA	TGG	GAG	TAT	GTC	CTG	TTG	CTC	TTC	CTT	CTT	
	2462			2471			2480			2489			2498		2507			2516			
726	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Leu	Trp	Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala
CTG	GCG	GAC	GCG	CGC	GTC	TGT	GCC	TGC	TTG	TGG	ATG	ATG	CTG	CTG	ATA	GCT	CAA	GCT	GAG	GCC	
	2525			2534			2543			2552			2561		2570			2579			
→ p7																					
747	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Ala	His	Gly	Ile	Leu	Ser
GCC	CTA	GAG	AAC	CTG	GTG	GTC	CTC	AAC	GCG	GCA	TCC	GTG	GCC	GGG	GCG	CAT	GGC	ATT	CTC	TCC	
	2588			2597			2606			2615			2624		2633			2642			
768	Phe	Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Ala	Ala	Trp	Tyr	Ile	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Pro	Gly	Ala	Ala	Tyr
TTC	CTC	GTG	TTC	TTC	TGT	GCT	GCC	TGG	TAC	ATC	AAG	GGC	AGG	CTG	GTC	CCT	GGG	GCG	GCA	TAT	
	2651			2660			2669			2678			2687		2696			2705			
789	Ala	Leu	Tyr	Gly	Val	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg	Ala	Tyr	Ala
GCC	CTC	TAC	GGC	GTA	TGG	CCG	CTA	CTC	CTG	CTC	CTG	CTG	GCG	TTA	CCA	CCA	CGA	GCA	TAC	GCC	
	2714			2723			2732			2741			2750		2759			2768			
810	Met	Asp	Arg	Glu	Met	Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Gly	Ala	Val	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Thr
ATG	GAC	CGG	GAG	ATG	GCA	GCA	TCG	TGC	GGA	GGC	GCG	GTT	TTC	GTA	GGT	CTG	ATA	CTC	TTG	ACC	
	2777			2786			2795			2804			2813		2822			2831			

E2 ← |

p7 ← | → NS2

831	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Lys	Leu	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ile	Trp	Trp	Leu	Gln	Tyr	Phe	Ile	Thr
	TTG	TCA	CCG	CAC	TAT	AAG	CTG	TTC	CTC	GCT	AGG	CTC	ATA	TGG	TGG	TTA	CAA	TAT	TTT	ATC	ACC
		2840		2849		2858		2867		2876		2876		2885		2894					
852	Arg	Ala	Glu	Ala	His	Leu	Gln	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Leu	Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala
	AGG	GCC	GAG	GCA	CAC	TTG	CAA	GTG	TGG	ATC	CCC	CCC	CTC	AAC	GTT	CGG	GGG	GGC	CGC	GAT	GCC
		2903		2912		2921		2921		2930		2939		2948		2957					
873	Val	Ile	Leu	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	His	Pro	Glu	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Lys	Ile	Leu	Leu
	GTC	ATC	CTC	CTC	ACG	TGC	GCG	ATC	CAC	CCA	GAG	CTA	ATC	TTT	ACC	ATC	ACC	AAA	ATC	TTG	CTC
		2966		2975		2984		2993		3002		3011		3020		3029					
894	Ala	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Met	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe	Val	Arg
	GCC	ATA	CTC	GGT	CCA	CTC	ATG	GTG	CTC	CAG	GCT	GGT	ATA	ACC	AAA	GTG	CCG	TAC	TTC	GTG	CGC
		3029		3038		3047		3056		3065		3074		3083							
915	Ala	His	Gly	Leu	Ile	Arg	Ala	Cys	Met	Leu	Val	Arg	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln
	GCA	CAC	GGG	CTC	ATT	CGT	GCA	TGC	ATG	CTG	GTG	CGG	AAG	GTT	GCT	GGG	GGT	CAT	TAT	GTC	CAA
		3092		3101		3110		3119		3128		3137		3146							
936	Met	Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Tyr	Asp	His	Leu	Thr	Pro	Leu
	ATG	GCT	CTC	ATG	AAG	TTG	GCC	GCA	CTG	ACA	GGT	ACG	TAC	GTT	TAT	GAC	CAT	CTC	ACC	CCA	CTG
		3155		3164		3173		3182		3191		3200		3209							
957	Arg	Asp	Trp	Ala	His	Ala	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Val	Phe	Ser
	CGG	GAC	TGG	GCC	CAC	GGC	CTA	CGA	GAC	CTT	GCG	GTG	GCA	GTT	GAG	CCC	GTC	GTC	TTC	TCT	
		3218		3227		3236		3245		3254		3263		3272							
978	Asp	Met	Glu	Thr	Lys	Val	Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Leu
	GAT	ATG	GAG	ACC	AAG	GTT	ATC	ACC	TGG	GGG	GCA	GAC	ACC	GCG	GCG	TGT	GGG	GAC	ATC	ATC	TTG
		3281		3290		3299		3308		3317		3326		3335							
999	Gly	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Glu	Ile	His	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu
	GGC	CTG	CCC	GTC	TCC	GCC	CGC	AGG	GGG	AGG	GAG	ATA	CAT	CTG	GGA	CCG	GCA	GAC	AGC	CTT	GAA
		3344		3353		3362		3371		3380		3389		3398							
1020	NS2 ← → NS3																				
	Gly	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ser	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu
	GGG	CAG	GGG	TGG	CGA	CTC	GCG	CCT	ATT	ACG	GCC	TAC	TCC	CAA	CAG	ACG	CGA	GGC	CTA	CTT	
		3407		3416		3425		3434		3443		3452		3461							
1041	Gly	Cys	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Gly	Arg	Asp	Arg	Asn	Gln	Val	Glu	Gly	Glu	Val	Gln	Val
	GGC	TGC	ATC	ATC	ACT	AGC	CTC	ACA	GGC	CGG	GAC	AGG	AAC	CAG	GTC	GAG	GGG	GAG	GTC	CAA	GTG
		3470		3479		3488		3497		3506		3515		3524							
1062	Val	Ser	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Ala	Thr	Cys	Val	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr
	GTC	TCC	ACC	GCA	ACA	CAA	TCT	TTC	CTG	GCG	ACC	TGC	GTC	AAT	GGC	ATG	TGG	ACT	GTC	TAT	
		3533		3542		3551		3560		3569		3578		3587							
1083	His	Gly	Ala	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Ile	Thr	Gln	Met	Tyr	Thr	Asn
	CAT	GGT	GCC	GGC	TCA	AAG	ACC	CTT	GCC	GGC	CCA	AAG	GGC	CCA	ATC	ACC	CAA	ATG	TAC	ACC	AAT
		3596		3605		3614		3623		3632		3641		3650							
1104	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Cys	Thr
	GTG	GAC	CAG	GAC	CTC	GTC	GGC	TGG	CAA	GCG	CCC	CCC	GGG	GCG	CGT	TCC	TTG	ACA	CCA	TGC	ACC
		3659		3668		3677		3686		3695		3704		3713							
1125	Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg	Arg	Arg
	TGC	GGC	AGC	TCG	GAC	CTT	TAC	TTG	GTC	ACG	AGG	CAT	GCC	GAT	GTC	ATT	CCG	GTG	CGC	CGG	CGG
		3722		3731		3740		3749		3758		3767		3776							

1146
 Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly
 GGC GAC AGC AGG GGG AGC CTA CTC TCC CCC AGG CCC GTC TCC TAC TTG AAG GGC TCT TCG GGC
 3785 3794 3803 3812 3821 3830 3839

1167
 Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg
 GGT CCA CTG CTC TGC CCC TCG GGG CAC GCT GTG GGC ATC TTT CCG GCT GCC GTG TGC ACC CGA
 3848 3857 3866 3875 3884 3893 3902

1188
 Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro
 GGG GTT GCG AAG GCG GTG GAC TTT GTA CCC GTC GAG TCT ATG GAA ACC ACT ATG CGG TCC CCG
 3911 3920 3929 3938 3947 3956 3965

1209
 Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala Val Pro Gln Thr Phe Gln Val Ala His Leu His
 GTC TTC ACG GAC AAC TCG TCC CCT CCG GCC GTA CCG CAG ACA TTC CAG GTG GCC CAT CTA CAC
 3974 3983 3992 4001 4010 4019 4028

1230
 Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys
 GCC CCT ACT GGT AGC GGC AAG AGC ACT AAG GTG CCG GCT GCG TAT GCA GCC CAA GGG TAT AAG
 4037 4046 4055 4064 4073 4082 4091

1251
 Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala
 GTG CTT GTC CTG AAC CCG TCC GTC GCC GCC ACC CTA GGT TTC GGG GCG TAT ATG TCT AAG GCA
 4100 4109 4118 4127 4136 4145 4154

1272
 His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Ile Thr
 CAT GGT ATC GAC CCT AAC ATC AGA ACC GGG GTA AGG ACC ATC ACC ACG GGT GCC CCC ATC ACG
 4163 4172 4181 4190 4199 4208 4217

1293
 Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 TAC TCC ACC TAT GGC AAG TTT CTT GCC GAC GGT GGT TGC TCT GGG GGC GCC TAT GAC ATC ATA
 4226 4235 4244 4253 4262 4271 4280

1314
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp
 ATA TGT GAT GAG TGC CAC TCA ACT GAC TCG ACC ACT ATC CTG GGC ATC GGC ACA GTC CTG GAC
 4289 4298 4307 4316 4325 4334 4343

1335
 Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val
 CAA GCG GAG ACG GCT GGA GCG CGA CTC GTC GTG CTC GCC ACC GCT ACG CCT CCG GGA TCG GTC
 4352 4361 4370 4379 4388 4397 4406

1356
 Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Ser Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr
 ACC GTG CCA CAT CCA AAC ATC GAG GAG GTG GCT CTG TCC AGC ACT GGA GAA ATC CCC TTT TAT
 4415 4424 4433 4442 4451 4460 4469

1377
 Gly Lys Ala Ile Pro Ile Glu Thr Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys
 GGC AAA GCC ATC CCC ATC GAG ACC ATC AAG GGG GGG AGG CAC CTC ATT TTC TGC CAT TCC AAG
 4478 4487 4496 4505 4514 4523 4532

1398
 Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser Gly Leu Gly Leu Asn Ala Val Ala Tyr Tyr
 AAG AAA TGT GAT GAG CTC GCC GCG AAG CTG TCC GGC CTC GGA CTC AAT GCT GTA GCA TAT TAC
 4541 4550 4559 4568 4577 4586 4595

1419
 Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Ile Val Val Ala Thr Asp Ala
 CGG GGC CTT GAT GTA TCC GTC ATA CCA ACT AGC GGA GAC GTC ATT GTC GTA GCA ACG GAC GCT
 4604 4613 4622 4631 4640 4649 4658

1440
 Leu Met Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln
 CTA ATG ACG GGC TTT ACC GGC GAT TTC GAC TCA GTG ATC GAC TGC AAT ACA TGT GTC ACC CAG
 4667 4676 4685 4694 4703 4712 4721

1461
 Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala
 ACA GTC GAC TTC AGC CTG GAC CCG ACC TTC ACC ATT GAG ACG ACG ACC GTG CCA CAA GAC GCG
 4730 4739 4748 4757 4766 4775 4784

1482
 Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Arg Met Gly Ile Tyr Arg Phe Val
 GTG TCA CGC TCG CAG CGG CGA GGC AGG ACT GGT AGG GGC AGG ATG GGC ATT TAC AGG TTT GTG
 4793 4802 4811 4820 4829 4838 4847

1503
 Thr Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala
 ACT CCA GGA GAA CGG CCC TCG GGC ATG TTC GAT TCC TCG GTT CTG TGC GAG TGC TAT GAC GCG
 4856 4865 4874 4883 4892 4901 4910

1524
 Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Ser Val Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn
 GGC TGT GCT TGG TAC GAG CTC ACG CCC GCC GAG ACC TCA GTT AGG TTG CGG GCT TAC CTA AAC
 4919 4928 4937 4946 4955 4964 4973

1545
 Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu
 ACA CCA GGG TTG CCC GTC TGC CAG GAC CAT CTG GAG TTC TGG GAG AGC GTC PTT ACA GGC CTC
 4982 4991 5000 5009 5018 5027 5036

1566
 Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr Leu
 ACC CAC ATA GAC GCC CAT TTC TTG TCC CAG ACT AAG CAG GCA GGA GAC AAC TTC CCC TAC CTG
 5045 5054 5063 5072 5081 5090 5099

1587
 Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met
 GTA GCA TAC CAG GCT ACG GTG TGC GCC AGG GCT CAG GCT CCA CCT CCA TCG TGG GAC CAA ATG
 5108 5117 5126 5135 5144 5153 5162

1608
 Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu
 TGG AAG TGT CTC ATA CGG CTA AAG CCT ACG CTG CAC GGG CCA ACG CCC CTG CTG TAT AGG CTG
 5171 5180 5189 5198 5207 5216 5225

1629
 Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr Thr Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met
 GGA GCC GTT CAA AAC GAG GTT ACT ACC ACA CAC CCC ATA ACC AAA TAC ATC ATG GCA TGC ATG
 5234 5243 5252 5261 5270 5279 5288

1650 **NS3 ← | → NS4A**
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu
 TCG GCT GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTG GTA GGC GGA GTC CTA GCA GCT CTG
 5297 5306 5315 5324 5333 5342 5351

1671
 Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Lys
 GCC GCG TAT TGC CTG ACA ACA GGC AGC GTG GTC ATT GTG GGC AGG ATC ATC TTG TCC GGA AAG
 5360 5369 5378 5387 5396 5405 5414

1692 **NS4A ← | →**
 Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala
 CCG GCC ATC ATT CCC GAC AGG GAA GTC CTT TAC CGG GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC GCC
 5423 5432 5441 5450 5459 5468 5477

1713 **NS4B**
 Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Ile
 TCA CAC CTC CCT TAC ATC GAA CAG GGA ATG CAG CTC GCC GAA CAA TTC AAA CAG AAG GCA ATC
 5486 5495 5504 5513 5522 5531 5540

1734
 Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp
 GGG TTG CTG CAA ACA GCC ACC AAG CAA GCG GAG GCT GCT GCT CCC GTG GTG GAA TCC AAG TGG
 5549 5558 5567 5576 5585 5594 5603

1755
 Arg Thr Leu Glu Ala Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu
 CGG ACC CTC GAA GCC TTC TGG GCG AAG CAT ATG TGG AAT TTC ATC AGC GGG ATA CAA TAT TTA
 5612 5621 5630 5639 5648 5657 5666

1776

Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ser
 GCA GGC TTG TCC ACT CTG CCT GGC AAC CCC GCG ATA GCA TCA CTG ATG GCA TTC ACA GCC TCT
 5675 5684 5693 5702 5711 5720 5729

1797

Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln His Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala
 ATC ACC AGC CCG CTC ACC ACC CAA CAT ACC CTC CTG TTT AAC ATC CTG GGG GGA TGG GTG GCC
 5738 5747 5756 5765 5774 5783 5792

1818

Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala
 GCC CAA CTT GCT CCT CCC AGC GCT GCT TCT GCT TTC GTA GGC GCC GGC ATC GCT GGA GCG GCT
 5801 5810 5819 5828 5837 5846 5855

1839

Val Gly Ser Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val
 GTT GGC AGC ATA GGC CTT GGG AAG GTG CTT GTG GAT ATT TTG GCA GGT TAT GGA GCA GGG GTG
 5864 5873 5882 5891 5900 5909 5918

1860

Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val
 GCA GGC GCG CTC GTG GCC TTT AAG GTC ATG AGC GGC GAG ATG CCC TCC ACC GAG GAC CTG GTT
 5927 5936 5945 5954 5963 5972 5981

1881

Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile
 AAC CTA CTC CCT GCT ATC CTC TCC CCT GGC GCC CTA GTC GTC GGG GTC GTG TGC GCA GCG ATA
 5990 5999 6008 6017 6026 6035 6044

1902

Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe
 CTG CGT CGG CAC GTG GGC CCA GGG GAG GGG GCT TGG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCG TTC
 6053 6062 6071 6080 6089 6098 6107

1923

Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg
 GCT TCG CGG GGT AAC CAC GTC TCC CCC ACG CAC TAT GTG CCT GAG AGC GAC GCT GCA GCA CGT
 6116 6125 6134 6143 6152 6161 6170

1944

Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile
 GTC ACT CAG ATC CTC TCT TCT ACC ATC ACT CAG CTG CTG AAG AGG CTT CAC CAG TGG ATC
 6179 6188 6197 6206 6215 6224 6233

1965 **NS4B** ← | → **NS5A**

Asn Glu Asp Cys Ser Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys
 AAC GAG GAC TGC TCC ACG CCA TGC TCC GGC TCG TGG CTA AGA GAT GTT TGG GAT TGG ATA TGC
 6242 6251 6260 6269 6278 6287 6296

1986

Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro Arg Leu Pro Gly Val
 ACG GTG TTG ACT GAT TTC AAG ACC TGG CTC CAG TCC AAG CTC CTG CCG CGA TTG CCG GGA GTC
 6305 6314 6323 6332 6341 6350 6359

2007

Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr
 CCC TTC TTC TCA TGT CAA CGT GGG TAC AAG GGA GTC TGG CGG GGC GAC GGC ATC ATG CAA ACC
 6368 6377 6386 6395 6404 6413 6422

2028

Thr Cys Pro Cys Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly
 ACC TGC CCA TGT GGA GCA CAG ATC ACC GGA CAT GTG AAA AAC GGT TCC ATG AGG ATC GTG GGG
 6431 6440 6449 6458 6467 6476 6485

2049

Pro Arg Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro
 CCT AGG ACC TGT AGT AAC ACG TGG CAT GGA ACA TTC CCC ATT AAC CCG GCG TAC ACC ACG GGC CCC
 6494 6503 6512 6521 6530 6539 6548

2070

Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr
 TGC ACG CCC TCC CCG GCG CCA AAT TAT TCT AGG GCG CTG TGG CGG GTG GCT GCT GAG GAG TAC
 6557 6566 6575 6584 6593 6602 6611

2091
Val Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys
GTG GAG GTT ACG CGG GTG GGG GAT TTC CAC TAC GTG ACG GGC ATG ACC ACT GAC AAC GTA AAG
6620 6629 6638 6647 6656 6665 6674

2112
Cys Pro Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg
TGC CCG TGT CAG GTT CCG GCC CCC GAA TTC TTC ACA GAA GTG GAT GGG GTG CGG TTG CAC AGG
6683 6692 6701 6710 6719 6728 6737

2133
Tyr Ala Pro Ala Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Thr Phe Leu Val Gly Leu Asn Gln
TAC GCT CCA GCG TGC AAA CCC CTC CTA CGG GAG GAG GTC ACA TTC CTG GTC GGG CTC AAT CAA
6746 6755 6764 6773 6782 6791 6800

2154
Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met
TAC CTG GTT GGG TCA CAG CTC CCA TGC GAG CCC GAA CCG GAC GTA GCA GTG CTC ACT TCC ATG
6809 6818 6827 6836 6845 6854 6863

2175
Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro
CTC ACC GAC CCC TCC CAC ATT ACG GCG GAG ACG GCT AAG CGT AGG CTG GCC AGG GGA TCT CCC
6872 6881 6890 6899 6908 6917 6926

2196
Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr
CCC TCC TTG GCC AGC TCA TCA GCT AGC CAG CTG TCT GCG CCT TCC TTG AAG GCA ACA TGC ACT
6935 6944 6953 6962 6971 6980 6989

2217
Thr Arg His Asp Ser Pro Asp Ala Asp Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met
ACC CGT CAT GAC TCC CCG GAC GCT GAC CTC ATC GAG GCC AAC CTC CTG TGG CGG CAG GAG ATG
6998 7007 7016 7025 7034 7043 7052

2238
Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Glu Pro
GGC GGG AAC ATC ACC CGC GTG GAG TCA GAA AAT AAG GTA GTA ATT TTG GAC TCT TTC GAG CCG
7061 7070 7079 7088 7097 7106 7115

2259
Leu Gln Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Arg Ser Arg
CTC CAA GCG GAG GAG GAT GAG AGG GAA GTA TCC GTT CCG GCG GAG ATC CTG CGG AGG TCC AGG
7124 7133 7142 7151 7160 7169 7178

2280
Lys Phe Pro Arg Ala Met Pro Ile Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser
AAA TTC CCT CGA GCG ATG CCC ATA TGG GCA CGC CCG GAT TAC AAC CCT CCA CTG TTA GAG TCC
7187 7196 7205 7214 7223 7232 7241

2301
Trp Lys Asp Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Ala Lys Ala
TGG AAG GAC CCG GAC TAC GTC CCT CCA GTG GTA CAC GGG TGT CCA TTG CCG CCT GCC AAG GCC
7250 7259 7268 7277 7286 7295 7304

2322
Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Ser Glu Ser Thr Val Ser Ser
CCT CCG ATA CCA CCT CCA CGG AGG AAG AGG ACG GTT GTC CTG TCA GAA TCT ACC GTG TCT TCT
7313 7322 7331 7340 7349 7358 7367

2343
Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly Ser Ser Glu Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly
GCC TTG GCG GAG CTC GCC ACA AAG ACC TTC GGC AGC TCC GAA TCG TCG GCC GTC GAC AGC GGC
7376 7385 7394 7403 7412 7421 7430

2364
Thr Ala Thr Ala Ser Pro Asp Gln Pro Ser Asp Asp Gly Asp Ala Gly Ser Asp Val Glu Ser
ACG GCA ACG GCC TCT CCT GAC CAG CCC TCC GAC GAC GGC GAC GCG GGA TCC GAC GTT GAG TCG
7439 7448 7457 7466 7475 7484 7493

2385
Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp
TAC TCC TCC ATG CCC CCC CTT GAG GGG GAG CCG GGG GAT CCC GAT CTC AGC GAC GGG TCT TGG
7502 7511 7520 7529 7538 7547 7556

NS5A ← | → NS5B

2406
 Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr
 TCT ACC GTA AGC GAG GAG GCT AGT GAG GAC GTC GTC TGC TGC TCG ATG TCC TAC ACA TGG ACA
 7565 7574 7583 7592 7601 7610 7619

2427
 Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Thr Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn
 GGC GCC CTG ATC ACG CCA TGC GCT GCG GAG GAA ACC AAG CTG CCC ATC AAT GCA CTG AGC AAC
 7628 7637 7646 7655 7664 7673 7682

2448
 Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Ser Leu Arg Gln
 TCT TTG CTC CGT CAC CAC AAC TTG GTC TAT GCT ACA ACA TCT CGC AGC GCA AGC CTG CGG CAG
 7691 7700 7709 7718 7727 7736 7745

2469
 Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu
 AAG AAG GTC ACC TTT GAC AGA CTG CAG GTC CTG GAC GAC CAC TAC CGG GAC GTG CTC AAG GAG
 7754 7763 7772 7781 7790 7799 7808

2490
 Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val Lys Ala Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu
 ATG AAG GCG AAG GCG TCC ACA GTT AAG GCT AAA CTT CTA TCC GTG GAG GAA GCC TGT AAG CTG
 7817 7826 7835 7844 7853 7862 7871

2511
 Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn Leu Ser
 ACG CCC CCA CAT TCG GCC AGA TCT AAA TTT GGC TAT GGG GCA AAG GAC GTC CGG AAC CTA TCC
 7880 7889 7898 7907 7916 7925 7934

2532
 Ser Lys Ala Val Asn His Ile Arg Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Thr Glu Thr Pro
 AGC AAG GCC GTT AAC CAC ATC CGC TCC GTG TGG AAG GAC TTG CTG GAA GAC ACT GAG ACA CCA
 7943 7952 7961 7970 7979 7988 7997

2553
 Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg
 ATT GAC ACC ACC ATC ATG GCA AAA AAT GAG GTT TTC TGC GTC CAA CCA GAG AAG GGG GGC CGC
 8006 8015 8024 8033 8042 8051 8060

2574
 Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu
 AAG CCA GCT CGC CTT ATC GTA TTC CCA GAT TTG GGG GTT CGT GTG TGC GAG AAA ATG GCC CTT
 8069 8078 8087 8096 8105 8114 8123

2595
 Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser
 TAC GAT GTG GTC TCC ACC CTC CCT CAG GCC GTG ATG GGC TCT TCA TAC GGA TTC CAA TAC TCT
 8132 8141 8150 8159 8168 8177 8186

2616
 Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn Ala Trp Lys Ala Lys Lys Cys Pro Met Gly Phe
 CCT GGA CAG CGG GTC GAG TTC CTG GTG AAT GCC TGG AAA GCG AAG AAA TGC CCT ATG GGC TTC
 8195 8204 8213 8222 8231 8240 8249

2637
 Ala Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser
 GCA TAT GAC ACC CGC TGT TTT GAC TCA ACG GTC ACT GAG AAT GAC ATC CGT GTT GAG GAG TCA
 8258 8267 8276 8285 8294 8303 8312

2658
 Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Arg Ser Leu Thr Glu Arg
 ATC TAC CAA TGT TGT GAC TTG GCC CCC GAA GCC AGA CAG GCC ATA AGG TCG CTC ACA GAG CGG
 8321 8330 8339 8348 8357 8366 8375

2679
 Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg
 CTT TAC ATC GGG GGC CCC CTG ACT AAT TCT AAA GGG CAG AAC TGC GGC TAT CGC CGG TGC CGC
 8384 8393 8402 8411 8420 8429 8438

2700
 Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ala Ala
 GCG AGC GGT GTA CTG ACG ACC AGC TGC GGT AAT ACC CTC ACA TGT TAC TTG AAG GCC GCT GCG
 8447 8456 8465 8474 8483 8492 8501

2721
Ala Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val
GCC TGT CGA GCT GCG AAG CTC CAG GAC TGC ACG ATG CTC GTA TGC GGA GAC GAC CTT GTC GTT
8510 8519 8528 8537 8546 8555 8564

2742
Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Glu Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met
ATC TGT GAA AGC GCG GGG ACC CAA GAG GAC GAG GCG AGC CTA CGG GCC TTC ACG GAG GCT ATG
8573 8582 8591 8600 8609 8618 8627

2763
Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Lys Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr
ACT AGA TAC TCT GCC CCC CCT GGG GAC CCG CCC AAA CCA GAA TAC GAC TTG GAG TTG ATA ACA
8636 8645 8654 8663 8672 8681 8690

2784
Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr
TCA TGC TCC TCC AAT GTG TCA GTC GCG CAC GAT GCA TCT GGC AAA AGG GTG TAC TAT CTC ACC
8699 8708 8717 8726 8735 8744 8753

2805
Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn
CGT GAC CCC ACC ACC CCC CTT GCG CGG GCT GCG TGG GAG ACA GCT AGA CAC ACT CCA GTC AAT
8762 8771 8780 8789 8798 8807 8816

2826
Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Tyr Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr
TCC TGG CTA GGC AAC ATC ATC ATG TAT GCG CCC ACC TTG TGG GCA AGG ATG ATC CTG ATG ACT
8825 8834 8843 8852 8861 8870 8879

2847
His Phe Phe Ser Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln Ile Tyr
CAT TTC TTC TCC ATC CTT CTA GCT CAG GAA CAA CTT GAA AAA GCC CTA GAT TGT CAG ATC TAC
8888 8897 8906 8915 8924 8933 8942

2868
Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu
GGG GCC TGT TAC TCC ATT GAG CCA CTT GAC CTA CCT CAG ATC ATT CAA CGA CTC CAT GGC CTT
8951 8960 8969 8978 8987 8996 9005

2889
Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg
AGC GCA TTT TCA CTC CAT AGT TAC TCT CCA GGT GAG ATC AAT AGG GTG GCT TCA TGC CTC AGG
9014 9023 9032 9041 9050 9059 9068

2910
Lys Leu Gly Val Pro Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg Leu
AAA CTT GGG GTA CCG CCC TTG CGA GTC TGG AGA CAT CGG GCC AGA AGT GTC CGC GCT AGG CTA
9077 9086 9095 9104 9113 9122 9131

2931
Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr
CTG TCC CAG GGG GGG AGG GCT GCC ACT TGT GGC AAG TAC CTC TTC AAC TGG GCA GTA AGG ACC
9140 9149 9158 9167 9176 9185 9194

2952
Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala Ser Gln Leu Asp Leu Ser Ser Trp Phe Val Ala
AAG CTC AAA CTC ACT CCA ATC CCG GCT GCG TCC CAG TTG GAT TTA TCC AGC TGG TTC GTT GCT
9203 9212 9221 9230 9239 9248 9257

2973
Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Trp
GGT TAC AGC GGG GGA GAC ATA TAT CAC AGC CTG TCT CGT GCC CGA CCC CGC TGG TTC ATG TGG
9266 9275 9284 9293 9302 9311 9320

2994
Cys Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg stp
TGC CTA CTC CTA CTT TCT GTA GGG GTA GGC ATC TAT CTA CTC CCC AAC CGA TGA ACG GGG AGC
9329 9338 9347 9356 9365 9374 9383

TAA ACA CTC CAG GCC AAT AGG CCA TCC TGT TTT TTT CCC TTT TTT TTT TTC TTT TTT TTT TTT
9392 9401 9410 9419 9428 9437 9446

NS5B ← → 3'-NTR

TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCT CCT TTT TTT TTC CTC TTT TTT TCC TTT TCT TTC CTT TGG
 9455 9464 9473 9482 9491 9500 9509

TGG CTC CAT CTT AGC CCT AGT CAC GGC TAG CTG TGA AAG GTC CGT GAG CCG CTT GAC TGC AGA
 9518 9527 9536 9545 9554 9563 9572

GAG TGC TGA TAC TGG CCT CTC TGC AGA TCA AGT (9605)
 9581 9590 9599

5.2 Plasmidkonstrukte

Name	Datum	Klonierung	Beschreibung
pBT37	31.05.95	PCR-Produkt (T3/T7 Primer auf pBluescript II SK) ungerichtet in pBR322 (EcoRI/NruI geschnitten; Klenow)	Ausgangsvektor zur Klonierung des Vollängengenoms RB01
pBT3	31.05.95	PCR-Produkt: T3/T7 Primer auf pBluescript II SK (HindIII geschnitten) ungerichtet in pBR322 (EcoRI/NruI geschnitten; Klenow)	wie pBT37; Polylinker von T7 Promoter bis HindIII; HindIII Schnittstelle deletiert
pBT 4713-3' DraI	31.05.95	pATA 4713-3'DraI (Sall/SpeI geschnitten) in pBT37 (Sall/SpeI geschnitten)	hintere Hälfte von HCV mit 3'DraI-Ende in pBT kloniert; HCV-Sequenz von pATA 4713-3'DraI ist nicht ausreichend charakterisiert
pBT 4713-9428 DraI	14.06.95	pATA 254-9369 (NcoI/SalI geschnitten) in pBT4713-3'DraI (NcoI/SalI geschnitten)	Austausch der hinteren Hälfte von HCV gegen die bekannte RB01 Sequenz; 3'DraI-Ende bleibt erhalten
pBT 4713-9428 DraI Δ5b	14.06.95	pATA T7 1-3'Δ5b (NcoI/SalI geschnitten) in pBT4713-3'DraI (NcoI/SalI geschnitten)	wie pBT4713-9428DraI mit Biosicherheitsmutation im NS5b
pBT 1-2545	14.06.95	pATA T7 1-2545 (EcoRI/SpeI geschnitten) in pBT3 (EcoRI/SpeI geschnitten)	5'-Teil von RB01 in pBT kloniert; Insert bringt den T7 Promoter mit
pBT 1-9369	26.06.95	pATA 254-9369 (MluI/SpeI geschnitten) in pBT1-2545 (MluI/SpeI geschnitten)	Verlängerung der RB01-Sequenz in 3'-Richtung
pBT 1-9428	6.07.95	pBT4713-9428DraI (Sall/SpeI geschnitten) in pBT1-9369 (Sall/SpeI geschnitten)	RB01-„Wildtyp“ Vollängengenom in pBT
pBT 1-9428 Δ5b	6.07.95	pBT4713-9428DraIΔ5b (Sall/SpeI geschnitten) in pBT1-9369 (Sall/SpeI geschnitten)	RB01-„Wildtyp“ Vollängengenom in pBT mit Biosicherheitsmutation im NS5B
5/8	28.04.97	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1	vordere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
5/26	28.04.97	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1	vordere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
5/29	28.04.97	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1	vordere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
3/1	15.08.96	Long-PCR-Fragment (Klenow, phosphoryliert) in pBluescript II SK (SmaI geschnitten, dephosphoryliert)	hintere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
3/7	15.08.96	Long-PCR-Fragment (Klenow, phosphoryliert) in pBluescript II SK (SmaI geschnitten, dephosphoryliert)	hintere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
3/13	15.08.96	Long-PCR-Fragment (Klenow, phosphoryliert) in pBluescript II SK (SmaI geschnitten, dephosphoryliert)	hintere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert
3/18	15.08.96	Long-PCR-Fragment (Klenow, phosphoryliert) in pBluescript II SK (SmaI geschnitten, dephosphoryliert)	hintere Hälfte des HCV-Genoms aus Leber-RNA kloniert

Name	Datum	Klonierung	Beschreibung
pFK	30.6.97	Primer pFK MCS up mit pFK MCS low hybridisiert; gerichtet in pBR322 (EcoRI/StyI geschnitten)	Ausgangsvektor zur Klonierung des Konsensusgenoms
pFK 709-1968	6.8.97	3'er Ligation: Überlapp-PCR (ClaI/BglII geschnitten) und pATA 254-9369 (BglII/NotI geschnitten) in pFK (ClaI/NotI geschnitten)	Leu→Ile Austausch an Position 137 in RB01-Sequenz
pFK 709-4725 Rev1+2	12.8.97	3'er Ligation: Stappert-Mutagenese S1918tag1, S1998G→S, S2112A→T, A2969 auf H01 Klon 29 (NotI/BamHI geschnitten) und H01 Klon 29 (BamHI/SalI geschnitten) in pFK709-1968 (NotI/SalI geschnitten)	Gly→Ser Austausch an Position 557 und Ala→Thr Austausch an Position 595 in H01 Klon 29
pFK 1-709	20.8.97	PCR-Produkt (S-T7-Hind/A900 auf pAT1-2545; HindIII/ClaI geschnitten) in pFK (HindIII/ClaI geschnitten)	Generierung des 5'-Endes der Konsensussequenz; Insert bringt T7-Promoter mit
pFK 1-4725Rev1+2	3.9.97	pFK1-709 (HindIII/ClaI geschnitten) in pFK709-4725Rev1+2 (HindIII/ClaI geschnitten)	Einfügen des 5'-Endes und des T7-Promoters in die Konsensussequenz
pFK 709-4725 Rev3+4 (3786G→S; 4192S→G)	27.8.97	3'er Ligation: Kombi-PCR (S2529; A4837; A3804G→S; S3780 G→S; A4215S→G; S4192S→G auf pFK pFK709-4725Rev1+2; BamHI/SalI verdaut) und pFK709-4725Rev1+2 (NotI/BamHI verdaut) in pFK709-1968 (NotI/SalI verdaut)	Gly→Ser Austausch an Position 1151 und Ser→Gly Austausch an Position 1288 in H01 Klon 29
pBSK 3'/13 (5765P→L; 5985T→I)	30.6.97	Stappert-Mutagenese (S5280tag1, 5765P→L, 5985T→I; A6641 auf pBSK 3'/13; SphI/MluI geschnitten) in Kon 3'/13 (SphI/MluI geschnitten)	Pro→Leu Austausch an Position 1812 und Thr→Ile an Position 1886 zum Angleich an die Konsensussequenz
pTM 5ab rev+3'UTR (7478G→E; 8170ΔScal)	09.07.97	Stappert-Mutagenese (S7310tag1, S7478G→E, S8170ΔScal auf pTM5ab rev+3'UTR; SacI/BglII geschnitten) und PCR-Produkt (S8788/3'rev antisense auf pTM5ab rev+3'UTR; BglII/SpeI geschnitten) in pTM5ab rev+3'UTR (SacI/SpeI geschnitten)	Gly→Glu Austausch an Position 2383 und Deletion der Scal Schnittstelle; Einfügen des 3'Scal-Endes
pFK 4725-9604/A	29.07.97	pBSK 3'/13 (5765P→L; 5985T→I) (SalI/EcoRI geschnitten) und pTM5abrev+3'UTR (7478G→E; 8170ΔScal) (EcoRI/SpeI geschnitten) in pFK (SalI/SpeI)	NS 5b ist revertiert und entspricht nicht der Konsensussequenz
pFK 1-9604 /A	15.09.97	pFK709-4725Rev3+4 (SfiI/SalI geschnitten) und pFK4725-9604 /A (SalI/SpeI geschnitten) in pFK1-4725Rev1+2 (SfiI/SpeI geschnitten)	Konsensusgenom; Ausnahme: NS5b ist revertierte Sequenz
pFK 4725-7890/8935-9604	22.09.97	Klon 3'/7 (BlnI/BglII) verdaut in pFK4725-9604/A (BlnI/BglII verdaut → Deletion 6900-7890)	Zwischenkonstrukt für Vollängen-Konsensusgenom; (V. Lohmann)
pFK 4725-9604/B	24.09.97	Stappert-Mutagenese (Klon 3'/18; → Deletion der Scal Schnittstelle; BglII verdaut); in pFK4725-7890/8935-9604 (BglII verdaut)	Herstellung der Konsensussequenz; Elimination einer störenden Scal Schnittstelle; (V. Lohmann)
pFK 1-9604/B	29.09.97	3'er Ligation: pFK4725-9604/A (SalI/EcoRI verdaut) und pFK4725-9604/B (EcoRI/SpeI verdaut) in pFK 1-4725 (SalI/SpeI verdaut)	Vollängenkonstrukt mit Konsensussequenz in NS5b und Scal Schnittstelle am 3'-Ende; Mutation in 5'NTR; (V. Lohmann)
pFK K1	30.10.97	Stappert-Mutagenese (ST7HindIII / A278Konsensus, HindIII/NruI verdaut) in pFK1-9604/B (HindIII/NruI verdaut)	fertiges Konsensusgenom; Angleichung der 5'NTR an Position 196 (C→T); (V. Lohmann)
pFK I ₃₈₈ /NS3-3'/K1	10.07.98	pFK 1-376/Luc/EMCV3420-9605 (PmeI/SpeI geschnitten; EMCV und 3420-9605) in pFK 1-388/Neo/EMCV3420-9605 K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-388; NS3-3'; Konsensussequenz ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₈₈ /NS3-3'/Δ	10.07.98	pFK 1-376/Luc/EMCV3420-9605 Δ5B (PmeI/SpeI geschnitten; EMCV und 3420-9605) in pFK 1-388/Neo/EMCV3420-9605 K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-388; NS3-3'; Deletionsmutante ; (V. Lohmann)

Name	Datum	Klonierung	Beschreibung
pFK I ₃₈₈ /NS2-3'/K1	10.07.98	pFK 1-376/Luc/EMCV2755-9605 (PmeI/SpeI geschnitten; EMCV und 2755-9605) in pFK 1-388/Neo/EMCV3420-9605 K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-388; NS2-3'; Konsensussequenz ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₈₈ /NS2-3'/Δ	10.07.98	pFK 1-376/Luc/EMCV2755-9605 Δ5B (PmeI/SpeI geschnitten; EMCV und 2755-9605) in pFK 1-388/Neo/EMCV3420-9605 K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-388; NS2-3'; Deletionsmutante ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₇₆ /NS3-3'/K1	10.07.98	PCR-Fragment (S-Neo-AscI/A-Luc-PmeI auf pTetOFF; AscI/PmeI geschnitten) in pFK 1-376/Ubi-Neo/EMCV3420-9605 K1 (AscI/PmeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-376; NS3-3'; Konsensussequenz ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₇₆ /NS3-3'/Δ	10.07.98	PmeI/SpeI-Fragment aus pFK1-376/Luc/EMCV3420-9605 Δ5B (EMCV und 3420-9605) in pFK I ₃₇₆ /NS3-3'/K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-376; NS3-3'; Deletionsmutante ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₇₆ /NS2-3'/K1	10.07.98	PmeI/SpeI-Fragment aus pFK 1-376/Ubi-Luc/EMCV2755-9605 K1 (EMCV und 2755-9605) in pFK I ₃₇₆ /NS3-3'/K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-376; NS2-3'; Konsensussequenz ; (V. Lohmann)
pFK I ₃₇₆ /NS2-3'/Δ	10.07.98	PmeI/SpeI-Fragment aus pFK 1-376/Ubi-Luc/EMCV2755-9605 Δ5B (EMCV und 2755-9605) in pFK I ₃₇₆ /NS3-3'/K1 (PmeI/SpeI geschnitten)	selektionierbares Replikon; IRES 1-376; NS2-3'; Deletionsmutante ; (V. Lohmann)
9-13 A	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 B	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 C	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 F	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 G	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 H	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 I	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
9-13 K	30.11.98	T/A-Klonierung; Long-PCR-Fragment direkt in pCR2.1 ligiert.	Reklonierung des Replikons aus zellulärer Gesamt-RNA.
pBac 3465-4009	25.10.95	PCR-Produkt (S3465NcoI/A4009SpeI auf pTM3348-9369; EcoRI/NotI geschnitten) ungerichtet in pBacPAK9 (EcoRI/NotI geschnitten; Klenow)	Einfügen einer NcoI und SpeI Schnittstelle, um HCV-Sequenzen inklonieren zu können
pBac 3465-4009II	08.01.96	pBac3465-4009 BamHI/EcoRI geschnitten; Klenow; religiert	Entfernen der EcoRI Schnittstelle aus dem Polylinker
pBac 3420-4009	08.11.95	pTM3420-4009 (NcoI/SpeI geschnitten) in pBac3465-4009 (NcoI/SpeI geschnitten)	NS3 in pBac-Vektor
pBac 7599-9369	08.11.95	3'er Ligation; PCR Produkt (S7599NcoI/A8255 auf pATA 254-9369; NcoI/BstEII geschnitten) und pATA 254-9369 (NcoI/BstEII geschnitten) in pBac3465-4009 (NcoI/SpeI geschnitten)	NS5b in pBac-Vektor
pBac 330-4009	09.02.96	3'er Ligation; pTM330-9369 (NcoI/BglII geschnitten) und pATA 254-9369 (BglII/SfiI geschnitten) in pBac3465-4009II (NcoI/SfiI geschnitten)	Core bis Beginn von NS3 in pBac-Vektor
pBac 330-9428Rev	09.02.96	3'er Ligation; pATA 254-9369 (SfiI/EcoRI geschnitten) und pTM6257-9428Rev (EcoRI/SpeI geschnitten) in pBac330-4009 (SfiI/SpeI geschnitten)	komplettes HCV-Leseraster mit revertiertem NS5b in pBac-Vektor
pBac 2767-9428Rev	09.02.96	3'er Ligation; pATA 254-9369 (NcoI/EcoRI geschnitten) und pTM6257-9428Rev (EcoRI/SpeI geschnitten) in pBac330-4009II (NcoI/SpeI geschnitten)	NS2 bis NS5b mit revertiertem NS5b in pBac-Vektor

Name	Datum	Klonierung	Beschreibung
pBac N	29.03.96	hybridisierte Oligonukleotide BacN-His-up und BacN-His-low in pBac3465-4009 (BamHI/NcoI geschnitten)	ermöglicht Expression aminoterminal 6xHis fusionierter Proteine durch Einfügen eines NcoI/SpeI-Fragments
pBac C	29.03.96	hybridisierte Oligonukleotide BacC-His-up und BacC-His-low in pBac3465-4009II (SpeI/PacI geschnitten)	ermöglicht Expression carboxyterminal 6xHis fusionierter Proteine durch Einfügen eines SpeI/PacI -Fragments

5.3 Abkürzungen

2-ME:	2-Mercaptoethanol
AS:	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BVDV:	„Bovine Viral Diarrhea Virus“; Erreger der bovinen Virusdiarrhoe
CSFV:	„Classical Swine Fever Virus“; Erreger der Schweinepest
DMEM:	„Dulbeccos minimal essential medium“
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm:	„disintegrations per minute“; Zerfälle pro Minute
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCV:	Encephalomyocarditis Virus
Endo H:	Endoglykosidase H
EtOH	Ethanol
FCS:	Fötales Kälberserum
HCV:	Hepatitis C Virus
Hepes:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IRES:	interne Ribosomen Eintrittsstelle
kB:	Kilobasen
kD:	Kilodalton
LMA:	„low melting agarose“; Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt
M-MLV:	Maus-Moloney Leukämie Virus
MOPS:	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
NaAc:	Natriumacetat
NaPPi	tetra-Natriumpyrophosphat

NPT	Neomycin-Phosphotransferase
Nt.:	Nukleotid
NTP:	Ribonukleosidtriphosphat
NTR:	Nichttranslatierte Region
PAA:	Polyacrylamid
PCR:	„polymerase chain reaction“; Polymerase Kettenreaktion
PFU:	„plaque forming units“; plaquebildende Einheiten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK:	Polynukleotid Kinase
RaRP:	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	reverse Transkriptase
RT-PCR:	reverse Transkription mit angeschlossener Polymerase Kettenreaktion
SDS:	„sodium-dodecyl-sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
TCA:	„trichloro acetic acid“ Trichloressigsäure
Temed:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN:	über Nacht
UpM:	Umdrehungen pro Minute
Vol.:	Volumen
VV:	Vaccinia Virus
YFV:	„Yellow Fever Virus“, Erreger des Gelbfiebers
□:	Antiserum

6 Literatur

- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. and Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12766-12771.
- Asabe, S. I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1997). The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J. Virol.* **71**, 790-796.
- Barik, S. & Banerjee, A. K. (1992). Sequential phosphorylation of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus by cellular and viral protein kinases is essential for transcription activation. *J. Virol.* **66**, 1109-1118.
- Bartenschlager, R. (1997a). Molecular targets in inhibition of hepatitis C virus replication. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **8(4)**, 281-301.
- Bartenschlager, R. (1997b). Candidate Targets for Hepatitis C Virus-Specific Antiviral Therapy. *Intervirology* **40**, 378-393.
- Bartenschlager, R. (1999). The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J. Viral Hepat.* **6**, 165-81.
- Bartenschlager, R., Ahlborn Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. (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., Ahlborn Laake, L., Mous, J., and Jacobsen, H. (1994). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* **68**, 5045-5055.
- Bartenschlager, R., and Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **81**, 1631-1648.
- Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G. and Tautz, N. (1998). Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J. Virol.* **72**, 2364-2372.
- Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* **15**, 12-22.
- Boyer, J.C., and Haenni, A.-L. (1994). Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* **198**, 415-426.
- Bracho, M. A., Moya, A. and Barrio, E. (1998). Contribution of Taq polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J. Gen. Virol.* **79**, 2921-2928.
- Bradley, D. W. (1993). Introduction: The diversity of human hepatitis viruses. *Sem. in Virol.* **4**, 269-271.
- Bradley, D., McCaustland, K., Krawczynski, K., Spelbring, J., Humphrey, C., and Cook, E. H. (1991). Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII-derived isolate in sucrose. *J. Med. Virol.* **34**, 206-208.
- Brown, E. A., Hangchun, Z., Li-Hua, P., and Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5041-5045.
- Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R. H. (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.
- Chen, C. M., You, L. R., Hwang, L. H. and Lee, Y. H. (1997). Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor. *J. Virol.* **71**, 9417-9426.
- Chen, P. J., Lin, M. H., Tai, K. F., Liu, P. C., Lin, C. J., and Chen, D. S. (1992). The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA. *Virology* **188**, 102-113.
- Cheng, S., Chang, S. Y., Gravitt, P. and Respass, R. (1994). Long PCR. *Nature* **369**, 684-685.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.

- Choo, S. H., So, H. S., Cho, J. M., and Ryu, W. S. (1995). Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J. Gen. Virol.* **76**, 2337-2341.
- Cline, J., Braman, J. C., and Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Collett, M. (1992). Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 145-154.
- Cuthbert, J. A. (1994). Hepatitis C: progress and problems. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 505-532.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* **1**, 695-698.
- Dash, S., Halim, A. B., Hiramatsu, N. and Gerber, M. A. (1997). Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *American Journal of Pathology* **151**, 363-73.
- Davis, G. L., Balart, L. A., Schiff, E. R., Lindsay, K., Bodenheimer, H. C. Jr., Perrillo, R. P., Carey, W., Jacobson, I. M., Payne, J., Dienstag, J. L., Van Thiel, D. H., Tamburro, C., Lewkowitch, J., Alberth, J., Meschewitz, C., Ortego, T. J., Gibas, A. und The Hepatitis International Therapy Group. (1989). Treatment of chronic hepatitis C with recombinant alpha-interferon. A multicentre randomized, controlled trial. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *J. Hepatol.* **11** (Suppl 1), 31-35.
- Deka, N., Sharma, M. D., and Mukerjee, R. (1994). Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J. Virol.* **68**, 7810-7815.
- Di Bisceglie, A. M., Shindo, M., Fong, T. L., Fried, M. W., Swain, M. G., Bergasa, N. V., Axiotis, C. A., Waggoner, J. G., Park, Y., and Hoofnagle, J. H. (1992). A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* **16**, 649-654.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic. Acids. Res.* **16**, 6127-6145.
- Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J. Virol.* **68**, 6147-6160.
- Eckart, M. R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M., and Choo, Q. L. (1993). The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 399-406.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, T., and Thiel, H. J. (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135.
- Elroy-Stein, O., Fuerst, E.R., and Moss, B., (1989). Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6126-6130.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., *et al.* (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J. Clin. Invest.* **96**, 224-230.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., *et al.* (1996). Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N. Engl. J. Med.* **334**, 77-81.
- Erker, J. C., Simons, J. N., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Chalmers, M. L., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1996). Molecular cloning and characterization of a GB virus C isolate from a patient with non-A-E hepatitis. *J. Gen. Virol.* **77**, 2713-2720.
- Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* **68**, 3753-3760.
- Fausto, N. (1997). Replication of hepatitis C virus in tissue culture. A potential breakthrough in need of confirmation. *American Journal of Pathology* **151**, 361.
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. and Holland, P. V. (1975). Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N. Engl. J. Med.* **292**, 767-770.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., and Purcelli, R.H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* **182**, 1026-1028.

- Flint, M., Maidens, C., Loomis, P. L., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. and Mc Keating, J. A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virol.* **73**, 6235-6244.
- Fournier, C., Sureau, C., Coste, J., Ducos, J., Pageaux, J., Larrey, D., Domergue, J. and Maurel, P. (1998). *J. Gen. Virol.* **79**, 2367-2374.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., and Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8122-8126.
- Fukushi, S., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Oya, A., and Katayama, K. (1997). The sequence element of the internal ribosome entry site and a 25-kilodalton cellular protein contribute to efficient internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **71**, 1662-1666.
- Gale, M. J., Blakely, S. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R. and Katze, M. G. (1998). Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanism of kinase regulation. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 2431-2443.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993b). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10583-10587.
- Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993a). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J. Virol.* **67**, 1385-1395.
- Gretch, D.R., Polyak, S.J., Wilson, J.J., Carithers JR., R.L., Perkins, J.D., and Corey, L. (1996) Tracking hepatitis C virus quasispecies major and minor variants in symptomatic and asymptomatic liver transplant recipients. *J Virol* **70**, 7622-7631.
- Gunji, T., Kato, N., Hijikata, M., Hayashi, K., Saitoh, S. and Shimotohno, K. (1994). Specific detection of positive and negative stranded hepatitis C viral RNA using chemical RNA modification. *Arch. Virol.* **134**, 293-302.
- Gwack, Y., Kim, D. W., Han, J. H., and Choe, J. (1996). Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**, 654-659.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and Shimotohno, K. (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., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1993b). Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J. Virol.* **67**, 4665-4675.
- Hijikata, M., Shimizu, Y. K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J. W., Alter, H. J., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1993a). Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J. Virol.* **67**, 1953-1958.
- Hirowatari, Y., Hijikata, M., Tanji, Y., Nyunoya, H., Mizushima, H., Kimura, K., Tanaka, T., Kato, N., and Shimotohno, K. (1993). Two proteinase activities in HCV polypeptide expressed in insect cells using baculovirus vector. *Arch. Virol.* **133**, 349-356.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Houghton, M. (1996). Hepatitis C viruses. In: *Virology* B.N. Fields, P.M. Knipe, P.M. Howley et al. (eds). Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1035-1058.
- Ikeda, M., Sugiyama, K., Mizutani, T., Tanaka, T., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K. und Kato, N. (1998). Human hepatocyte clonal cell lines that support persistent replication of hepatitis C virus. *Virus Res.* **56**, 157-167.
- Inchauspe, G., Zebedee, S., Lee, D. H., Sugitani, M., Nasoff, M., and Prince, A. M. (1991). Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10292-10296.
- Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K., and Yasui, K. (1996). Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J. Gen. Virol.* **77**, 1043-1054.

- Ito, T., Tahara, S. M. and Lai, M. C. (1998). The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J. Virol.* **72**, 8789-8796.
- Jang, S. K., Krüsslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.* **62**, 2636-2643.
- Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Ishikawa, T., Takayanagi, M., and Higashi, Y. (1993). A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **105**, 507-512.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 320-326.
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., and Shimotohno, K. (1990). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9524-9528.
- Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1994). Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **68**, 4776-4784.
- Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S., and Shimotohno, K. (1993). Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J. Virol.* **67**, 3923-3930.
- Kedzierski, W. und Porter, J.C. (1991). A novel non-enzymatic procedure for removing DNA Template from RNA transcription mixtures. *BioTechniques* **10**, 210-214.
- Khromykh, A. A. and Westaway, E. G. (1994). Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol.* **68**, 4580-4588.
- Khromykh, A. A. and Westaway, E. G. (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J. Virol.* **71**, 1497-1505.
- Kim, D. W., Gwack, Y., Han, J. H., and Choe, J. (1995). C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 160-166.
- Koch, J. O. and Bartenschlager, R. (1999). Modulation of Hepatitis C Virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A and NS4B. *J. Virol.* **73**, 7138-7146.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol.* **70**, 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (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., Agapov, E.V., Blight, K.J., Mihalik, K., Feinstone, S.M., and Rice, C.M., (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-574.
- Koskinas, J., Tibbs, C., Saleh, M. G., Pereira, L. M., McFarlane, I. G., and Williams, R. (1995). Effects of ribavirin on intrahepatic and extrahepatic expression of hepatitis C virus in interferon nonresponsive patients. *J. Med. Virol.* **45**, 29-34.
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., Tegtmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J. R., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**, 362-364.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, C. J., Zhao, B. T., Hori, H., and Bray, M. (1991). Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 5139-5143.
- Lai, M. Y., Kao, J. H., Yang, P. M., Wang, J. T., Chen, P. J., Chan, K. W., Chu, J. S., and Chen, D. S. (1996). Long-term efficacy of ribavirin plus interferon alfa in the treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **111**, 1307-1312.

- Lanford, R. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R., and Fuerst, T. R. (1994). Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology* **202**, 606-614.
- Leary, T. P., Muerhoff, A. S., Simons, J. N., Pilot Matias, T. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Dawson, G. J., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1996). Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J. Med. Virol.* **48**, 60-67.
- Lemon, S.M. and Robertson, B. H. (1993). Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Sem. in Virol.* **4**, 285-295.
- Lerat, H., Berby, F., Trabaud, M. A., Vidalin, O., Major, M., Trépo, C. and Inchauspé, G. (1996). Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J. Clin. Invest.* **97**; 845-851.
- Lin, C., Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., McCourt, D. W., and Rice, C. M. (1994a). 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.
- Lin, C., Pragai, B. M., Grakoui, A., Xu, J., and Rice, C. M. (1994b). Hepatitis C virus NS3 serine proteinase: trans-cleavage requirements and processing kinetics. *J. Virol.* **68**, 8147-8157.
- Linnen, J., Wages, J. ,Jr., Zhang Keck, Z. Y., Fry, K. E., Krawczynski, K. Z., Alter, H., Koonin, E., Gallagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, J. W., Young, L., Piatak, M. ,Jr., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J. C., Morris, T., Hyams, K. C., Ismay, S., Lifson, J. D., Kim, J. P. (1996). Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* **271**, 505-508.
- Lohmann, V. (1997). Untersuchungen zur Partikelmorphogenese und Replikation des Hepatitis C Virus auf Basis klonierter Vollängengenome. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.*
- Lohmann, V., Koch, J. O., and Bartenschlager, R. (1996). Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J. Hepatol.* **24 (2 Suppl.)**, 11-19.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **71**, 8416-8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L. und Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. and Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA-Polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Major, M. E. und Feinstone, S. M. (1997). The Molecular Virology of Hepatitis C. *Hepatology* **25**, 1527-1538.
- Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I., and Okayama, H. (1994). Production of nonstructural proteins of hepatitis C virus requires a putative viral protease encoded by NS3. *Virology* **198**, 636-644.
- Mandl, C.W., Ecker, M., Holzmann, H., Kunz, C., and Heinz, F.X. (1997). Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus european subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol.* **78**, 1049-1057.
- Marcellin, P., Boyer, N., Giostra, E., Degott, C., Courouce, A. M., Degos, F., Coppere, H., Cales, P., Couzigou, P., and Benhamou, J. P. (1991). Recombinant human alpha-interferon in patients with chronic non-A, non-B hepatitis: a multicenter randomized controlled trial from France. *Hepatology* **13**, 393-397.
- Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225-3229.
- Mast, E. E. and Alter, M. J. (1993). Epidemiology of viral Hepatitis: an overview. *Sem. in Virol.* **4**, 273-283.
- Matsumoto, M., Hsieh, T. Y., Zhu, N., Van Arsdale, T., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Gorbalenya A. E., Lo S.Y., Ou, J.H., Ware, C. F., et al. (1997). Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J. Virol.* **71**, 1301-1309.
- Matsumoto, M., Hwang, S. B., Jeng, K. S., Zhu, N., and Lai, M. M. (1996). Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* **218**, 43-51.

- Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T. and Pitkanen, K. (1991). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4967-4973.
- McOmish, F., Yap, P. L., Dow, B. C., Follett, E. A., Seed, C., Keller, A. J., Cobain, T. J., Krusius, T., Kolho, E., Naukkarinen, R., and et al. (1994). Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 884-892.
- Meyers, G. and Thiel, H. J. (1995). Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.* **69**, 3683-3689.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. J., and Kummerer, B. M. (1996). Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**, 8606-8613.
- Miyamoto, H., Okamoto, H., Sato, K., Tanaka, T., and Mishiro, S. (1992). Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* **73**, 715-718.
- Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1994). Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J. Virol.* **68**, 6215-6222.
- Mizutani, T., Kato, N., Saito, S., Ikeda, M., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996). Characterization of hepatitis C virus replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line, MT-2. *J. Virol.* **70**, 7219-7223.
- Moormann, R. J., van Gennip, H. G., Miedema, G. K., Hulst, M. M., and van Rijn, P. A. (1996). Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* **70**, 763-770.
- Moradpour, D., Wakita, T., Wands, J. R., and Blum, H. E. (1998). Tightly regulated expression of the entire hepatitis C virus structural region in continuous human cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 920-924.
- Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsujanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998). The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine* **4**, 1065-1067.
- Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Pilot Matias, T. J., Dawson, G. J., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Schlauder, G. G., Desai, S. M., and Mushahwar, I. K. (1995). Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J. Virol.* **69**, 5621-5630.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). *Cancer Res.* **42**, 3858.
- Neddermann, P., Clementi, A. and De Francesco, R. (1999). Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B and NS5A encoded on the same polyprotein. *J. Virol.* **73**, 9984-9991.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-940.
- Prince, A. M., Brotman, B., Grady, G. F., Kuhns, W. J., Hazzi, C., Levine, R. W. and Millian, S. J. (1974). Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet* **ii**, 241-246.
- Ralston, R., Thudium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hall, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M., and Choo, Q. L. (1993). Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* **67**, 6753-6761.
- Reed, K. E., Gorbalenya, A. E., and Rice, C. M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **72**, 6199-6206.
- Reed, K. E., Xu, J., and Rice, C. M. (1997). Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vivo and in vitro: properties of the NS5A-associated kinase. *J. Virol.* **71**, 7187-7197.
- Reichard, O., Yun, Z. B., Sonnerborg, A., and Weiland, O. (1993). Hepatitis C viral RNA titers in serum prior to, during, and after oral treatment with ribavirin for chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* **41**, 99-102.

- Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E., and Bradley, D. W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* **247**, 1335-1339.
- Rice, C.M. (1996). Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Virology* B.N. Fields, P.M. Knipe, P.M. Howley et al. (eds). Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, pp.931-959.
- Rice, C.M., Grakoui, A., Galler, R., and Chambers, T.J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* **1**, 285-296.
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., and Strauss, J.H. (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **229**, 726-733.
- Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van de Straten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S. M. and Spann, W. (1995). Almost the entire 5' nontranslated region of hepatitis C virus is required for cap independent translation. *FEBS Lett.* **365**, 115-119.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., and Verme, G. (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* **18**, 997-1003.
- Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y. N., Choo, Q. L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M. and Abrignani, S. (1996). A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: Cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* **93**, 1759-1763.
- Ruggli, N., Tratschin, J. D., Mittelholzer, C., and Hofmann, M. A. (1996). Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol.* **70**, 3478-3487.
- Santolini, E., Migliaccio, G., and La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* **68**, 3631-3641.
- Selby, M. J., Choo, Q. L., Berger, K., Kuo, G., Glazer, E., Eckart, M., Lee, C., Chien, D., Kuo, C., and Houghton, M. (1993). Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J. Gen. Virol.* **74**, 1103-1113.
- Shimizu, Y. K. and Yoshikura, H. (1994). Multicycle infection of hepatitis C virus in cell culture and inhibition by alpha and beta interferons. *J. Virol.* **68**, 8406-8408.
- Shimizu, Y. K. Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D. C., Purcell, R. H. and Yoshikura, H. (1998). Infection of a chimpanzee with hepatitis C virus grown in cell culture. *J. Gen. Virol.* **79**, 1383-1386.
- Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1992). Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5477-5481.
- Sidhu, M. K., Liao, M. J. and Rashidbaigi, A. (1996). Dimethyl sulfoxide improves RNA amplification. *BioTechniques* **21**, 44-47.
- Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., and Urdea, M. S. (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.
- Stappert, J., Wirsching, J., and Kemler, R. (1992). A PCR method for introducing mutations into cloned DNA by joining an internal primer to a tagged flanking primer. *Nucleic Acids Res.* **20**, 624.
- Sumiyoshi, H., Hoke, C. H., and Trent, D. W. (1992). Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J. Virol.* **66**, 5425-5431.
- Suzich, J. A., Tamura, J. K., Palmer Hill, F., Warrenner, P., Grakoui, A., Rice, C. M., Feinstone, S. M., and Collett, M. S. (1993). Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J. Virol.* **67**, 6152-6158.
- Tai, C. L., Chi, W. K., Chen, D. S., and Hwang, L. H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* **70**, 8477-8484.
- Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., and Okayama, H. (1991). Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J. Virol.* **65**, 1105-1113.

- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., and Shimotohno, K. (1995). A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 744-749.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J. Virol.* **70**, 3307-3312.
- Taniguchi, S., Okamoto, H., Sakamoto, M., Kojima, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Munekata, E., Muchmore, E. E., Peterson, D. A., and Mishiro, S. (1993). A structurally flexible and antigenically variable N-terminal domain of the hepatitis C virus E2/NS1 protein: implication for an escape from antibody. *Virology* **195**, 297-301.
- Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T., and Shimotohno, K. (1995a). Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J. Virol.* **69**, 1575-1581.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., and Shimotohno, K. (1995b). Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *J. Virol.* **69**, 3980-3986.
- Taylor, D. R., Shi, S.T., Romano, P. R., Barber, G. N. and Lai, M. C. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 Protein. *Science* **285**, 107-110.
- Tellier, R., Bukh, J., Emerson, S. U., Miller, R. H. and Purcell, R. H. (1996). Long PCR and its application to hepatitis viruses: amplification of hepatitis A, hepatitis B, and hepatitis C virus genomes. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3085-3091.
- Thomssen, R., Bonk, S., and Thiele, A. (1993). Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* **182**, 329-334.
- Thomssen, R., Bonk, S., Propfe, C., Heermann, K. H., Kochel, H. G., and Uy, A. (1992). Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* **181**, 293-300.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., and La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J. Virol.* **67**, 4017-4026.
- Tsukiyama-Kohara, K., Izuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **66**, 1476-1483.
- Tsukiyama-Kohara, K., Izuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **66**, 1476-1483.
- Vassilev, V. B., Collett, M. S., and Donis, R. O. (1997). Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J. Virol.* **71**, 471-478.
- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*. **1**, 526-537.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **67**, 3338-3344.
- Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J. Virol.* **67**, 3338-3344.
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K. and Bonino, F. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180**, 842-848.
- Weiner, A.J., Geysen, H.M., Christopherson, C., Hall, J.E., Mason, T.J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C.D., Crawford, K.A., Brunetto, M., Barr, P.J., Miyamura, T., McHutchinson, J., and Houghton, M. (1992) Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3468-3472.
- Whetter, L. E., Day, S. P., Elroy Stein, O., Brown, E. A., and Lemon, S. M. (1994). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J. Virol.* **68**, 5253-5263.
- Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yorihuzi, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T., et al. (1996). Genetic organisation and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* **223**, 255-261.
- Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U., and Bukh, J. (1997). Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8738-8743.

- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. and Bukh, J. (1999). In vitro 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.
- Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1998). Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. *Virology* **244**, 161-172.
- 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 Han, J. H. (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.
- Zignego, A. L., Macchia, D., Monti, M., Thiers, V., Mazzetti, M., Foschi, M., Maggi, E., Romagnani, S., Gentilini, P. and Brechot, C. (1992). Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **15**, 382-386.

7 Lebenslauf

8 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen:

Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A. and Bartenschlager, R. (2000). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *submitted*.

Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J.O. and Bartenschlager, R. (2000). Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* **3**,167-74.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.O. Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.

Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J.O. and Bartenschlager, R. (1998). Biochemical and kinetic analyses of NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. (1998). *Virology* **249**, 108-118.

Lohmann, V., Körner, F., Herian, U. and Bartenschlager, R. (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **71**, 8416-8428.

Poster:

Körner, F., Lohmann, V., Koch, J.O. and Bartenschlager, R. (1998). Molecular cloning and characterization of a hepatitis C virus genotype 1b consensus genome. *5th international meeting on hepatitis C virus and related viruses - molecular virology and pathogenesis*, Venedig, Italien.

9 Zusammenfassung

Das Hepatitis C Virus (HCV) ist der Haupterreger der parenteral übertragenen non-A non-B Hepatitis. Das zur Familie der Flaviviridae gehörende Virus besitzt ein Plusstrang-RNA Genom, das eine Länge von etwa 9600 Nukleotiden hat. Es kodiert ein ca. 3000 Aminosäuren langes Polyprotein, das co- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in mindestens 10 funktionelle Untereinheiten gespalten wird.

Seit jeher wird die Erforschung der Biologie des HCV durch das Fehlen eines praktikablen Tiermodells sowie eines effizienten und verlässlichen Zellkultursystems behindert. Zwar gibt es mehrere Berichte, wonach das HCV in verschiedenen Zelllinien repliziert, in allen Fällen ist die Replikation jedoch so gering, daß mit diesen Systemen ein Studium der HCV-Replikation nicht möglich ist. Als Alternative dazu sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkultursystem auf der Basis der Transfektion klonierter vollständiger HCV-Genome etabliert werden.

Zu diesem Zweck wurde ein HCV-Vollängengenom aus 11 Teilfragmenten rekonstituiert, die mit Hilfe einer konventionellen RT-PCR aus dem Serum eines HCV positiven Patienten amplifiziert wurden. Davon hergestellte in vitro Plusstrang-RNAs erwiesen sich jedoch nach Transfektion in Leberzelllinien als nicht replikationskompetent. Da die Replikationsdefizienz des klonierten Genoms am wahrscheinlichsten auf inaktivierende Mutationen zurückzuführen war, wurde das Genom mit Hilfe einer hinsichtlich Fehlerfreiheit und Produktlänge optimierten RT-PCR aus Lebergewebe rekloniert. Es gelang das fast vollständige virale Genom in Form von nur zwei Teilstücken aus der Leber desselben Patienten zu amplifizieren. Mit Hilfe eines Vergleichs mehrerer Klone jedes Fragments wurde eine isolatspezifische Konsensussequenz bestimmt, auf deren Basis das Konsensusgenom K1 konstruiert wurde. Zur Charakterisierung dieses K1-Genoms wurde das gesamte virale Polyprotein in BHK-21 Zellen exprimiert und seine korrekte Prozessierung bestätigt. Ein Vergleich von K1 mit dem vorherigen Nicht-Konsensusgenom ergab, daß die IRES-Aktivität des K1-Genoms ca. zweifach erhöht war, daß das E2-Protein eine zusätzliche funktionelle Glykosylierungsstelle hatte und daß das NS5A-Protein hyperphosphoryliert war, womit die Funktionalität des Genoms gezeigt war. In vitro Vollängen-RNAs des K1 Genoms wurden in HuH-7 Zellen transfiziert. Auch in diesem Fall ergab eine Analyse mit strangspezifischer RT-PCR keinen Hinweis auf Replikation. Da diese Methode nicht geeignet war, eine geringe Replikation bzw. eine Replikation in nur wenigen Zellen nachzuweisen, wurden subgenomische RNA-Moleküle hergestellt, sogenannte selektionierbare Replikons. Diese bestanden aus: 5'NTR, Neomycin-Resistenzgen, EMCV-IRES, NS2-NS5B, 3'NTR. Nach Transfektion in HuH-7 Zellen und G418-Selektion konnten 9 Zellklone isoliert werden, von denen 8 HCV-Plusstrang-RNA korrekter Größe besaßen. Eine G418-Resistenz dieser Zellen auf Grund ins Zellgenom integrierter Replikon-DNA konnte mit Hilfe einer *Neomycin-Phosphotransferase*-spezifischen PCR ausgeschlossen werden. Am Beispiel des Klons 9-13 konnte ferner gezeigt werden, daß die Replikation der Replikon-RNA nicht durch Actinomycin D gehemmt wurde. Im Rahmen der Reklonierung konnte das Replikon in einer einzigen „long distance RT-PCR“ aus der Zelllinie 9-13 amplifiziert werden. Eine Sequenzierung von 8 Klonen ergab, daß es sich tatsächlich um die Sequenz der ursprünglich transfizierten Replikon in vitro-RNA handelte. Des Weiteren wurde eine Reihe von Mutationen in der HCV-Sequenz nachgewiesen, wobei ein konservierter Austausch an Position 8991 in allen 8 analysierten Klonen auftrat. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um eine replikationssteigernde adaptive Mutation handelt.

Mit den durchgeführten Experimenten konnte hinreichend bewiesen werden, daß die Replikons autonom in HuH-7 Zellen replizieren. Aufgrund der hohen Replikation ermöglicht das System neue bisher nicht durchführbare Ansätze die HCV-Replikation im Detail zu studieren. Da die Replikons alle für die RNA-Vermehrung notwendigen viralen Enzyme kodieren, die die Hauptansatzpunkte für antiviral wirkende Pharmazeutika sind, ist damit auch erstmals eine Therapieentwicklung mit Hilfe eines zellgestützten Replikationssystems möglich.