

**Etablierung einer
PCR-unabhängigen Methode zum Nachweis
des Hepatitis C-Virus
und Studien zur Entwicklung
eines Replikationssystems**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

im Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von

Britta Becker

Oktober 2003

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 18. Dezember 2003

1. Gutachter: Frau Professor Dr. A. Vallbracht

2. Gutachter: Herr Professor Dr. D. Blohm

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entdeckung des Hepatitis C-Virus	1
1.2	Aufbau und Einteilung des HCV	2
1.3	Epidemiologie und Transmission des HCV	3
1.4	Pathogenese des HCV	5
1.5	Extrahepatische Manifestationen und Replikationszyklus des HCV	8
1.6	Die Suche nach einem Zellkultursystem für HCV	8
1.7	Detektion des HCV	9
1.8	Zielsetzung	11
2	MATERIAL	12
2.1	Frischplasmen und Serumproben	12
2.2	Zellen	12
2.3	Zellkulturmedien und -zusätze	12
2.3.1	Grundmedien	12
2.3.2	Wachstumsmedien	13
2.3.3	Erhaltungsmedien	13
2.3.4	Selektionsmedien	13
2.3.5	Einfriermedium	13
2.4	Plasmide	13
2.4.1	p90/HCV FL-long pU	13
2.4.2	pSP64/65	14
2.4.3	pcDNA3/RLI 3'	15
2.4.4	pcDNA3/RLI 3' (-)	15
2.5	Bakterien	15
2.6	Molekularbiologische Software	15
2.7	Nukleotide	16
2.8	Oligonukleotidprimer	16
2.8.1	HCV-spezifische Primer 1	16
2.8.2	HCV-spezifische Primer 2 (Sondenherstellung)	16
2.8.3	HCV-spezifische Primer 3 (Kontrolltranskriptionherstellung)	17
2.8.4	RLI-spezifische Primer	17
2.8.5	pcDNA3-spezifische Primer	17
2.8.6	pSP64/65-spezifischer Primer	18
2.8.7	HAV-spezifische Primer	18
2.8.8	β -Actin-spezifische Primer	18

2.9	Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine	18
2.9.1	Antikörper	18
2.9.2	Enzyme	19
2.9.3	sonstige Proteine	19
2.10	Antibiotika	20
2.11	Standards	20
2.12	Kits	20
2.13	Chemikalienliste	20
2.14	Puffer und Lösungen	23
2.14.1	Gebrauchslösungen	23
2.14.2	Mykoplasmenfärbung	23
2.14.3	Zellvitalitätstest	23
2.14.4	Bakterienkulturen	23
2.14.5	Herstellung kompetenter Bakterien	24
2.14.6	Minipräparation bakterieller Plasmid-DNA	24
2.14.7	Maxipräparation bakterieller Plasmid-DNA	25
2.14.8	Transfektion von Zellen	25
2.14.9	RNA-Isolierung nach der Silica-Methode	26
2.14.10	RNA-Isolierung mit Guanidiniumisothiocyanat	27
2.14.11	DNA-Isolierung	27
2.14.12	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation	27
2.14.13	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.14.14	Dephosphorylierung von DNA	28
2.14.15	Ligation von doppelsträngiger DNA mit der T4-DNA-Ligase	28
2.14.16	Bradford-Assay	28
2.14.17	SDS-PAGE und Western-Blot	29
2.14.18	Hybrid Detection Assay	30
2.15	Verbrauchsmaterialien	31
2.16	Geräte	32
3	METHODEN	34
3.1	Kultivierung von Zellen	34
3.1.1	Kultivierung etablierter Fibroblasten-Zelllinien und FRhK4-Zellen	34
3.1.2	Kultivierung von U937-Zellen	34
3.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
3.3	Bestimmung von Zellzahlen	35
3.4	Mykoplasmen-Nachweis	35
3.5	MTT-Test zur Bestimmung der cytotoxischen G418-Konzentration	36
3.6	Infektion von Zellkulturen mit HCV	36
3.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	37
3.8	Verdünnungstransformation kompetenter Bakterien	37

3.9	Minipräparation bakterieller Plasmid-DNA	38
3.10	Maxipräparation bakterieller Plasmid-DNA	38
3.11	Herstellung infektiöser HCV-RNA über <i>in vitro</i> Transkription	39
3.12	Transfektion von Zellen	39
3.12.1	Transfektion von U937- und FRhK4-Zellen mit HCV-RNA	39
3.12.1.1	DEAE-Dextran Transfektion	39
3.12.1.2	Transfektion mit TransMessenger™ Transfection Reagent	40
3.12.2	Transfektion von U937-Zellen mit pcDNA/RLI 3' und pcDNA/RLI 3' (-)	40
3.12.2.1	Calcium-Phosphat Transfektion	40
3.12.2.2	Transfektion mittels Elektroporation	41
3.12.2.3	Transfektion mit SuperFect® Transfection Reagent	41
3.13	Selektion der transfizierten U937-Zellen	41
3.14	Isolierung von Nukleinsäure	42
3.14.1	HCV-RNA-Extraktion nach der Silica-Methode	42
3.14.2	RNA-Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat	42
3.14.3	Modifizierte RNA-Extraktion mit 5 M Guanidiniumisothiocyanat-Lösung	43
3.14.4	Isolierung von DNA aus Zellen	44
3.14.4.1	Klassische DNA-Isolierung	44
3.14.4.2	Isolierung mit Chelex® 100	44
3.15	Aufreinigung von Nukleinsäuren	44
3.15.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	44
3.15.1.1	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	44
3.15.1.2	Fällung von Nukleinsäuren	45
3.15.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	45
3.15.2.1	Aufreinigung durch Gelelektrophorese in LMP-Agarose	45
3.15.2.2	Aufreinigung mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit	46
3.16	RT-PCR zum Nachweis von RNA	46
3.16.1	Nachweis des Positivstranges von HCV	46
3.16.2	Nachweis des Replikationsintermediates von HCV	47
3.16.3	Nachweis von HAV-RNA	47
3.16.4	Nachweis von RLI-mRNA	47
3.16.5	Nachweis von β -Actin-mRNA	48
3.17	PCR zum Nachweis des RLI auf Genomebene	48
3.18	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.19	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	49
3.20	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	50
3.20.1	DNase-Verdau mit DNase RQ1	50
3.20.1.1	Verdau von zellulären RNA-Extrakten mit DNase RQ1	50
3.20.1.2	Verdau von <i>in vitro</i> transkribierter HCV-RNA mit DNase RQ1	50
3.20.2	Restriktionsenzymspaltung von p90/HCV	50
3.20.2.1	Spaltung des p90/HCV mit Xba I und Not I	50
3.20.2.2	Linearisierung des p90/HCV mit Bsm I	51
3.20.2.3	Spaltung des p90/HCV mit Kpn I und Pin AI (Age I)	51
3.20.3	Linearisierung von pcDNA/RLI 3' und pcDNA/RLI 3' (-)	51

3.21	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	51
3.22	SDS-PAGE und Western-Blot zum Nachweis des RLI	51
3.23	Konstruktion HCV-spezifischer ssDNA-Sonden	52
3.23.1	Ermittlung des geeigneten Bereiches	53
3.23.2	Isolierung der Template-DNA	53
3.23.3	Durchführung einer Run-Off-PCR	53
3.23.4	Kontrolle der Einzelsträngigkeit der Sonden	54
3.24	Konstruktion von HCV-spezifischen Kontrolltranskripten	54
3.24.1	Ermittlung der geeigneten Primer zur Isolierung eines HCV-Inserts aus der 5'NTR/Core-Region des p90/HCV	54
3.24.2	Isolierung des HCV-Inserts aus der 5'NTR/Core-Region mittels PCR	55
3.24.3	Restriktionsenzymspaltung der HCV-Inserts sowie der Plasmide pSP64/65 und Dephosphorylierung der linearisierten Vektoren	55
3.24.4	Ligation der HCV-Inserts in die Vektoren pSP64 und pSP65	56
3.24.5	Transformation und Amplifikation der rekombinanten Plasmide	57
3.24.6	Kontrolle der Orientierung des HCV-Inserts in den rekombinanten Plasmiden	58
3.24.7	Linearisierung der rekombinanten Plasmide und Isolierung der Template-DNA über die PCR	58
3.24.7.1	Linearisierung der rekombinanten Plasmide pSP64/65 ^{rHCV}	59
3.24.7.2	Isolierung der Template-DNA über die PCR	59
3.24.8	Herstellung der Kontrolltranskripte mittels <i>in vitro</i> Transkription	59
3.25	Hybrid-Detection-Assay	59
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Etablierung einer PCR-unabhängigen Methode zum Nachweis des Positiv- und Negativstranges von HCV	61
4.1.1	Herstellung HCV-spezifischer ssDNA-Sonden	61
4.1.1.1	Ermittlung und Isolierung des geeigneten Templates	61
4.1.1.2	Synthese der Negativstrang-spezifischen Sense-Sonde über die Run-Off-PCR	62
4.1.1.3	Synthese der Positivstrang-spezifischen Antisense-Sonde über die Run-Off-PCR	64
4.1.2	Herstellung HCV-spezifischer Kontrolltranskripte	67
4.1.3	Untersuchung der Spezifität und Sensitivität der HCV-spezifischen Sonden	67
4.1.3.1	Überprüfung der Spezifität der HCV-Sense-Sonden	68
4.1.3.2	Überprüfung der Spezifität der HCV-Antisense-Sonden	71
4.1.3.3	Überprüfung der Sensitivität der HCV-spezifischen Sonden	72
4.1.4	Kontrolle der Spezifität und Sensitivität der konstruierten Sonden nach Zusatz von zellulärer bzw. viraler RNA	74
4.2	Studien zur Etablierung eines Replikationssystems für HCV	79
4.2.1	Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis von HCV-RNA	79
4.2.2	Infektion verschiedener Zelllinien mit HCV	81
4.2.2.1	Infektion von Hautfibroblasten mit HCV-Frischplasma	82
4.2.2.2	Infektion von Knochenmarkfibroblasten mit HCV-Frischplasma	82
4.2.2.3	Infektion von FRhK4-Zellen mit HCV-Frischplasma	82
4.2.3	Infektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen mit HCV-Plasma	83

4.2.3.1	Überprüfung RLI-positiver FRhK4-Zellklone auf die Insertion des RLI-ORF	83
4.2.3.2	Kontrolle der RLI-Expression auf Transkriptionsebene	84
4.2.3.3	Kontrolle der RLI-Expression auf Translationsebene	85
4.2.3.4	Infektion von FRhK4-Zellen und -Zellklonen mit HCV-Plasma	85
4.2.4	Versuch einer Adaptation des HCV an FRhK4-Zellen	86
4.2.4.1	Versuch einer Adaptation des HCV über Zellpassagen	86
4.2.4.2	Versuch einer Adaptation des HCV über Virus- und Zellpassagen	87
4.2.5	Transfektion von U937-Zellen mit HCV-RNA	89
4.2.5.1	Herstellung RLI-positiver und RLI-negativer U937-Zellklone	89
4.2.5.2	Transfektion RLI-negativer und RLI- positiver U937-Zellklone mit HCV-RNA	90
4.2.5.3	Reinfektion von U937-Zellen	93
4.3	Nachweis von HCV-RNA in transfizierten Zellen über den HDA und die PCR	95
4.3.1	Transfektion von FRhK4-Zellklonen	95
4.3.2	Reinfektion von FRhK4-Zellen	97
4.3.3	Transfektion von U937-Zellklonen	98
4.3.4	Zweite Transfektion von FRhK4-Zellklonen	99
4.3.5	Durchführung einer 14-Stunden-Kinetik	102
5	DISKUSSION	104
5.1	Etablierung eines PCR-unabhängigen Nachweissystems für HCV	105
5.1.1	Konstruktion HCV-spezifischer Sense-Sonden	106
5.1.2	Konstruktion HCV-spezifischer Antisense-Sonden	107
5.1.3	Überprüfung der Spezifität der konstruierten Sonden	108
5.1.4	Überprüfung der Sensitivität der konstruierten Sonden	111
5.2	Studien zur Entwicklung eines <i>in vitro</i> Systems	113
5.2.1	Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis des HCV	114
5.2.2	Infektion von Fibroblasten und FRhK4-Zellen mit HCV	114
5.2.3	Infektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen mit HCV	115
5.2.4	Versuch einer Adaptation des HCV	117
5.2.5	Transfektion von U937-Zellen und -Zellklonen	119
5.3	Nachweis von HCV-RNA über den HDA und/oder die PCR	122
5.3.1	Transfektion von FRhK4-Zellen	122
5.3.2	Transfektion von U937-Zellen	123
5.3.3	Zweite Transfektion von FRhK4-Zellen	124
5.3.4	14-Stunden-Kinetik	126
6	ZUSAMMENFASSUNG	129
7	LITERATURVERZEICHNIS	130

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
a	atto
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CPE	cytopathischer Effekt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
f	femto
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
Geq	Genomäquivalent
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAV	Hepatitis A-Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
HDA	Hybrid-Detection-Assay
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	horseradish peroxidase
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LCPS	luminescence counts per second
LMP	low melting point
μ	mikro

µs	Mikrosekunde
m	milli
M	Molar (mol/L)
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MnCl ₂	Manganchlorid
Mock	nicht infizierte bzw. nicht transfizierte Kontrollzellen
Mol.Bio-H ₂ O	Molekularbiologisches Wasser (RNase- und DNase-frei)
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
n	nano
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nichttranslatierte Region
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
p	piko
p.i.	post infectionem
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
RLI	RNase L-Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase L	Ribonuklease L
rpm	revolutions per minute of rotor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
SSC	standard saline citrate
T	Thymin
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50 %
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
z	zepto

1 EINLEITUNG

Eine akute oder chronische Leberentzündung (Hepatitis) kann einerseits durch Virusinfektionen hervorgerufen werden, andererseits durch Drogenmissbrauch oder als Folge einer Autoimmunerkrankung auftreten.

Bei den viralen Hepatitiden unterscheidet man zwei Gruppen. In die erste Gruppe gehören Viren, bei denen eine Hepatitis kein primäres Merkmal einer Infektion ist, aber im Verlauf einer systemischen Infektion auftreten kann (Begleithepatitis). Dazu gehören beispielsweise das Cytomegalie-Virus, das Epstein-Barr-Virus und das Gelbfieber-Virus. In die zweite Gruppe gehören die sogenannten Hepatitisviren, deren Infektion stets mit einer Leberentzündung einhergeht.

Es sind inzwischen sieben verschiedene Hepatitisviren beschrieben (Hepatitis A- bis G-Virus und das TT-Virus), wobei die bekanntesten Vertreter das Hepatitis A- (HAV), das Hepatitis B- (HBV) und das Hepatitis C-Virus (HCV) darstellen. Die Erreger der Hepatitis A und B wurden Anfang der 70iger Jahre entdeckt, die Identifizierung des Hepatitis C-Virus gelang hingegen erst viele Jahre später.

1.1 Die Entdeckung des Hepatitis C-Virus

Erste Hinweise auf das Hepatitis C-Virus erhielt man Mitte der 70iger Jahre mit der Entwicklung serologischer Testsysteme zum Nachweis des Hepatitis A- und Hepatitis B-Virus. Es zeigte sich, dass etwa 70-90 % der Transfusions-assoziierten Hepatitis-Fälle weder durch HAV noch durch HBV hervorgerufen wurden (Alter et al., 1975; Dienstag et al., 1977; Feinstone et al., 1975). Da die Erreger, die im Verlauf einer systemischen Infektion eine Begleithepatitis auslösen können, ebenfalls ausgeschlossen werden konnten und das Agens dieser sogenannten Non-A- und Non-B-Hepatitis (NANBH) in Schimpansen zu einer chronischen Infektion der Leber führte, verdichteten sich die Hinweise auf ein neues Hepatitis-Virus (Alter et al., 1975; Tabor et al., 1978).

Die endgültige Identifizierung des infektiösen Agens gelang schließlich CHOO et al. im Jahre 1989. Er und seine Mitarbeiter isolierten aus dem Plasma von Schimpansen, die mit dem Erreger der NANBH infiziert waren, die komplette Nukleinsäure und klonierten diese in Bakteriophagen. Ein Screening exprimierter Polypeptide dieser rekombinanten Bakteriophagen mit dem Serum eines chronisch infizierten Patienten einer NANBH führte dann zur Identifizierung eines positiven cDNA-Klons. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Klon von einem exogenen, einzelsträngigen RNA-Genom abstammte und die Autoren waren sich

schließlich sicher, dass es sich bei der RNA um das Genom eines neuen Virus handelte. Sie nannten es das Hepatitis C-Virus, kurz HCV (Choo et al., 1989).

1.2 Aufbau und Einteilung des HCV

Das Hepatitis C-Virus hat einen Durchmesser von etwa 50 nm und besteht aus einem sphärischen Nukleocapsid, das von einer Lipidhülle (Envelope) umgeben ist. Das Virus besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiver Orientierung, mit einer Länge von etwa 9,6 kb. Das Genom enthält eine 5'-nichttranslatierte Region (5'NTR) stromaufwärts eines langen offenen Leserahmens (ORF), gefolgt von einer nichttranslatierten Sequenz am 3' Ende (3'NTR) (Han et al., 1991; Choo et al., 1991; Shimizu et al., 1996; van Regenmortel et al., 1999).

Das große ORF codiert für ein Polyprotein aus 3010-3011 Aminosäuren, das während der Replikation des Virus durch zelluläre Peptidasen und virale Proteasen co- und posttranslational in zehn verschiedene Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten wird (siehe Abb. 1.2-1). Die Strukturproteine liegen dabei im aminoterminalen Bereich des ORF, wobei das Core-Protein (C) und zwei Envelope-Proteine (E1, E2) unterschieden werden (Choo et al., 1991; Han et al., 1991; Lanford et al., 1993; Santolini et al., 1994). Ein weiteres kleines Protein von bislang unbekannter Funktion, das p7, liegt direkt stromabwärts hinter dem E2. Die Nichtstrukturproteine sind im restlichen Bereich des ORF lokalisiert und beinhalten das NS2 (Metalloprotease), das NS3 (Serinprotease, Helikase), das NS4A (Cofaktor für die Proteaseaktivität des NS3), das NS4B (Replikation?), das NS5A (Replikation) sowie das NS5B (RNA-abhängige RNA-Polymerase) (Takamizawa et al., 1991; Tomei et al., 1993; Grakoui et al., 1993; Bartenschlager et al., 1993; Behrens et al., 1996; Hoofnagle, 2002).

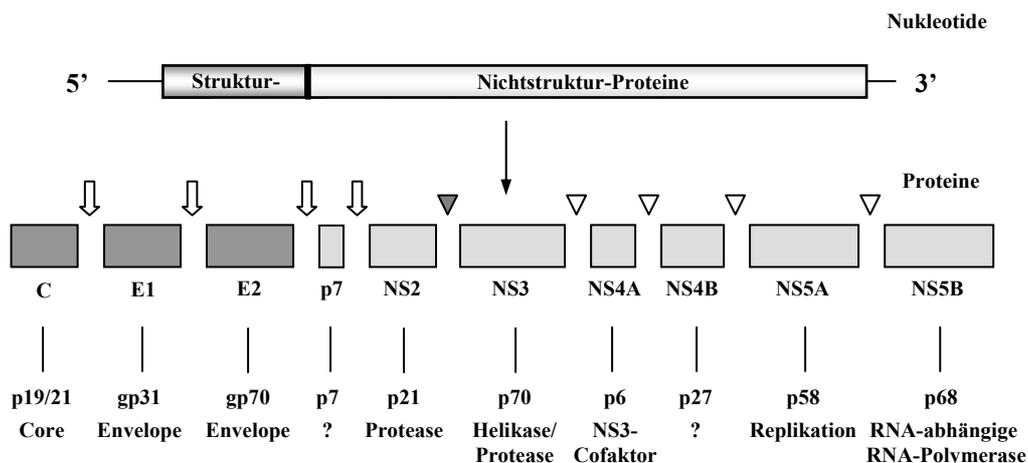


Abb. 1.2-1: Genomorganisation und Polyprotein-Prozessierung des Hepatitis C-Virus, modifiziert nach Fields und Hoofnagle (Fields, 2001; Hoofnagle, 2002). Das HCV-Genom ist etwa 9,6 kb groß und besteht aus nicht-translatierten Bereichen am 5'- und 3'-Ende sowie einem großen offenen Leserahmen (ORF). Der ORF des HCV wird in ein Polyprotein translatiert, das durch zelluläre Signalpeptidasen (↓) und virale Enzyme co- und posttranslational in die einzelnen Proteine gespalten wird. Bei den viralen Enzymen handelt es sich um die NS2-3 Metalloproteinase (▽) und die NS3 Serinprotease (▽). (p: Protein; gp: Glykoprotein)

Das 5'NTR des HCV-Genoms ist 341 Nukleotide lang und die am stärksten konservierte Region zwischen den verschiedenen HCV-Isolaten. Es bildet ausgeprägte Sekundärstrukturen aus und enthält die *internal ribosomal entry site* (IRES), die für die Initiation der Translation essentiell ist (Han et al., 1991; Bukh et al., 1992; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993; Ali & Siddiqui, 1995).

Das 3'NTR ist sehr komplex und durchschnittlich ca. 250 nt lang. Es besteht aus einer variablen Region mit etwa 50 nt, gefolgt von einem Poly-Pyrimidin-Trakt mit durchschnittlich 100 nt und einer hoch konservierten terminalen Region mit einer Länge von ungefähr 98 nt (Kolykhalov et al., 1996; Tanaka et al., 1996). Sowohl der Poly-U/UC-Trakt als auch die konservierte Region am Ende des 3'NTR sind dabei offenbar essentiell für die Replikation des HCV (Yanagi et al., 1999; Kolykhalov et al., 2000).

Wie Sequenzanalysen zeigten, ist das HCV sehr eng mit den Flavi- und Pestiviren verwandt (Miller & Purcell, 1990; Choo et al., 1991; Han et al., 1991). Aufgrund seiner Genomorganisation wurde das Virus aber der Familie *Flaviviridae* zugeordnet, wo das HCV wegen seiner geringen Sequenzhomologie zu den anderen Mitgliedern letztlich den eigenen Genus *Hepacivirus* erhielt (van Regenmortel et al., 1999).

Bedingt durch die bemerkenswerte Sequenzdiversität zwischen den verschiedenen Isolaten des HCV werden mittlerweile sechs Genotypen unterschieden, deren Genomsequenzen zwischen 25 % und 35 % voneinander abweichen (Davis, 1999; van Regenmortel et al., 1999). Zwischenzeitlich gab es auch Berichte über die Genotypen 7-11. Nach intensiven genetischen Analysen, wurden diese aber dem Genotyp 3 bzw. 6 zugeordnet (van Regenmortel et al., 1999). Die insgesamt sechs Genotypen werden wiederum in über 90 Subtypen unterteilt, wobei sich die Isolate eines Subtyps in etwa 5-25 % der Genomsequenzen unterscheiden (Davis, 1999; van Regenmortel et al., 1999; Hoofnagle, 2002). Neben den verschiedenen Subtypen des HCV treten zusätzlich noch sogenannte Mikrovarianten auf, die aufgrund ihrer äußerst geringen Sequenzheterogenität von 1-2 % als Quasispezies bezeichnet werden (Martell et al., 1992; Simmonds, 1995; Davis, 1999).

1.3 Epidemiologie und Transmission des HCV

Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 170 Millionen Menschen (3 % der Weltbevölkerung) mit HCV infiziert, mit einer hohen Prävalenz in Japan, Afrika, dem mittleren Osten und Süd-Ost-Asien. Die Zahl der Hepatitis C-Virussträger in Deutschland beträgt unge-

fähr 450.000, das entspricht einer Durchseuchung der Gesamtbevölkerung von ca. 0,6 %, wobei jährlich etwa 6000 Neuinfektionen hinzukommen (Schreier & Höhne, 2001; RKI, 2002). Die geographische Verteilung der einzelnen Genotypen ist insgesamt sehr unterschiedlich. In Deutschland sind z.B. die Subtypen 1a/1b und 3a am häufigsten vertreten (Goeser et al., 1995; Theilmann et al., 1995). In Afrika oder Ägypten findet man hingegen hauptsächlich den Genotyp 4 (Dusheiko et al., 1994; Mellor et al., 1995).

Der Hauptübertragungsweg des Hepatitis C-Virus ist parenteral durch das Eindringen von Blut eines infizierten Patienten in die Blutbahn oder das Gewebe des Empfängers. Dabei spielt die Übertragung des Virus via Bluttransfusionen in Europa und Nordamerika aufgrund starker Sicherheitsmaßnahmen und einer mittlerweile guten Labordiagnostik heutzutage nur noch eine untergeordnete Rolle (Schreiber et al., 1996; Di Bisceglie, 1998; Schreier & Höhne, 2001). An erster Stelle der Transmission steht hier vielmehr der Nadel- bzw. Spritzenaustausch bei den intravenös Drogenabhängigen, die inzwischen eine HCV-Durchseuchungsrate von etwa 80 % aufweisen (Di Bisceglie, 1998; Schreier & Höhne, 2001). Weitere parenterale Risikofaktoren sind Nadelstich-Verletzungen, Tätowierungen, das Piercing und die Akupunktur (Di Bisceglie, 1998; RKI, 2002). Außerdem kann HCV auch vertikal von der Mutter auf das ungeborene Kind übertragen werden. Das Risiko liegt hier bei bis zu 5 % und ist abhängig von der Viruslast im Blut der Mutter (Ohto et al., 1994; Di Bisceglie, 1998; Schreier & Höhne, 2001). Bei Frauen mit einer HIV-Coinfektion ist die Gefahr einer HCV-Transmission sogar noch größer und liegt bei ungefähr 36 % (Zanetti et al., 1995). Eine sexuelle Übertragung des HCV zwischen Ehepartnern wurde ebenfalls beschrieben, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit 1-3 % recht gering ist (Brettler et al., 1992; Hallam et al., 1993; Schreier & Höhne, 2001).

Obwohl das HCV-Genom auch in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Schweiß, Tränen und Muttermilch nachgewiesen wurde, ist eine Infektion über diesen Weg eher unwahrscheinlich, kann aber beim heutigen Stand des Wissens nicht komplett ausgeschlossen werden (Schreier & Höhne, 2001; RKI, 2002).

Problematisch für die Bewertung von Übertragungsrisiken bleibt sicherlich der Umstand, dass bei nahezu 40 % der chronisch HCV-infizierten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose nicht mehr nachvollziehbar war, was ursächlich zur Infektion geführt hat (Fields, 2001). D.h. es ist unklar, ob es sich in der Anamnese um nicht erfasste Ereignisse wie Piercing oder ähnliches handelte, oder ob möglicherweise ein unbekannter Übertragungsweg vorliegt.

1.4 Pathogenese des HCV

Nach dem Eindringen des HCV erfolgt die Dissemination des Virus über die Blutbahn zur Leber. Dort angekommen nutzt das Virus dann einen noch unbekanntem Oberflächenrezeptor, um in die Hepatozyten zu gelangen. Als Kandidaten für einen putativen Rezeptor wurden DC-SIGN, L-SIGN, das Oberflächenprotein CD81 und der Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R), beschrieben (Pileri et al., 1998; Flint et al., 1999; Gardner et al., 2003; Pöhlmann et al., 2003).

Etwa 1-2 Wochen nach der Infektion ist schließlich erstmals die virale RNA im Serum des Patienten nachweisbar (Hoofnagle, 2002; Pawlotsky, 2002) und etwa 4-12 Wochen (2-26 Wochen) nach der Infektion kann eine Entzündung der Leber durch eine Erhöhung des Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT)-Levels manifestiert werden (NIH, 2002).

Die Mehrzahl der Neuinfektionen verlaufen in der Regel mild und führen nur selten zu Symptomen, wie Appetitlosigkeit, Übelkeit und Müdigkeit. Nur etwa 10 % der Patienten mit einer akuten Hepatitis C-Infektion entwickeln eine Gelbsucht und in extrem seltenen Fällen kommt es zu einem fulminanten Verlauf (van der Poel et al., 1994; Farci et al., 1996; Vento et al., 1998; Farci et al., 1999; Hoofnagle, 2002).

Etwa 70-80 % der akut HCV-infizierten Patienten entwickeln eine chronische Infektion, was durch die Persistenz der HCV-RNA im Serum dokumentiert wird (Alter et al., 1990; Villano et al., 1999; Schreier & Höhne, 2001; Hoofnagle, 2002). Dabei wird die chronisch persistierende von der chronisch aktiven Hepatitis unterschieden. Die chronisch persistierende Infektion ist mit einer leichten Leberentzündung assoziiert. In der Regel bestehen aber kaum gesundheitliche Beschwerden. Bei der chronisch aktiven Form kommt es hingegen zu einem schleichenden Verlust der Leberfunktion, wobei für die Zerstörung der Hepatozyten vermutlich die Effektorzellen des Immunsystems von entscheidender Bedeutung sind (Koziel et al., 1992; Alter et al., 1992; van der Poel et al., 1994; Ballardini et al., 1995; Missale et al., 1996; Di Bisceglie, 1998). Über einen langen Zeitraum hinweg (oft mehr als 20 Jahre) geht die chronisch aktive Infektion in etwa 20-30 % der Fälle in eine Leberzirrhose über (NIH, 2002). Bei Patienten mit einem starken Alkoholkonsum oder einer bestehenden HIV/HBV-Coinfektion ist das Risiko der Ausbildung einer Leberzirrhose sogar noch deutlich höher (Peters & Terrault, 2002; Thomas, 2002). Im fortgeschrittenen Stadium der Zirrhose kommt es schließlich zu einem vollständigen Versagen der Leberfunktion und die Erkrankung endet mit dem Tod des Patienten, wenn keine Organtransplantation vorgenommen wird.

Eine chronische HCV-Infektion ist außerdem mit der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms assoziiert (HCC) (Colombo et al., 1989; Kew et al., 1990). Die Inzidenz des HCC ist aber sehr schwierig zu bestimmen und liegt bei Patienten mit einer Leberzirrhose bei etwa 1-4 % (Di Bisceglie, 1998).

Der Mechanismus der Persistenz einer HCV-Infektion ist bisher nicht geklärt. Eine große Rolle könnte hier die Sequenzvariabilität der beiden Envelope-Proteine spielen. Das E2-Protein enthält beispielsweise zwei hypervariable Regionen (HVR1 und HVR2), von denen die HVR1 Epitope besitzt, die für die Induktion neutralisierender Antikörper gegen HCV verantwortlich sind (Weiner et al., 1992; Zibert et al., 1995; Lechner et al., 1998). Mutationen in diesem Bereich könnten somit zur Entstehung von Quasispezies führen. Gerät dann eine Mikrovariante unter den Selektionsdruck des Immunsystems, könnte sich eine andere Variante zum dominanten Subtyp entwickeln (Farci et al., 1994; Alter, 1995; Suzuki et al., 1999; Ray et al., 1999; Farci et al., 2000).

Außerdem kann das HCV scheinbar gezielt Einfluss auf die zellvermittelte Cytotoxizität des Immunsystems nehmen. YOU sowie MARUSAWA und seine Kollegen fanden z.B. heraus, dass das HCV Core-Protein die Fas- und TNF- α -vermittelte Apoptose in humanen Hepatozyten über die Aktivierung von NF- κ B inhibiert (Marusawa et al., 1999; You et al., 1999). Im Gegensatz dazu induziert vermutlich das Core-Protein in humanen T-Zellen eine Apoptose über den Fas-Pathway, so dass wichtige Effektorzellen des Immunsystems nicht mehr zur Verfügung stehen (Hahn et al., 2000; Toubi et al., 2001).

Ein weiterer Grund für die Persistenz des HCV könnte darin bestehen, dass die viralen Proteine E2 und NS5A die Proteinkinase R (PKR) hemmen (Gale et al., 1997; Gale et al., 1999; Taylor et al., 1999). Die PKR ist, neben der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2-5AS), eine wichtige Komponente des Interferonsystems und für den Aufbau eines antiviralen Status von entscheidender Bedeutung (siehe Abb. 1.4-1). Sie wird bei der primären Infektion einer Zelle, zusammen mit der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2-5AS), durch doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) aktiviert (Memet et al., 1991; Jacobs & Langland, 1996; Goodbourn et al., 2000).

Sowohl die PKR als auch die 2-5AS führen zur lokalen Hemmung der Proteinsynthese, wodurch die Virusreplikation blockiert und eventuell eine Apoptose der infizierten Zelle ausgelöst wird (Lee & Esteban, 1994; Diaz-Guerra et al., 1997). Die aktivierte PKR induziert dabei die Inhibition der Translation über die Phosphorylierung des Translations-Initiations-Faktors

eIF-2a. Im 2'-5'-Oligoadenylatsystem kommt es hingegen durch die aktivierte 2-5AS zunächst zur Veresterung mehrerer Moleküle ATP, wobei die entstandenen 2'-5'-Oligoadenylate (2-5A) wiederum eine Endoribonuklease L (RNase L) aktivieren, die schließlich einzelsträngige RNA, inklusive messenger und ribosomaler RNA, degradiert (siehe Abb. 1.4-1) (Player & Torrence, 1998; Bisbal et al., 2000; Goodbourn et al., 2000).

Gleichzeitig wird durch die aktivierte PKR über den Transkriptionsfaktor NF-κB die Expression von Typ-I-Interferonen induziert. Das gebildete Interferon wird in das extrazelluläre Milieu abgegeben, bindet an die entsprechenden Rezeptoren der benachbarten Zellen und führt dort über intrazelluläre Signalkaskaden zur Expression von Interferon induzierten Genen, zu denen u.a. wiederum die PKR und die 2-5AS gehören. D.h. der konstitutive Level der Proteine wird in den umliegenden Zellen erhöht und der antivirale Status aufgebaut (siehe Abb. 1.4-1) (Goodbourn et al., 2000).

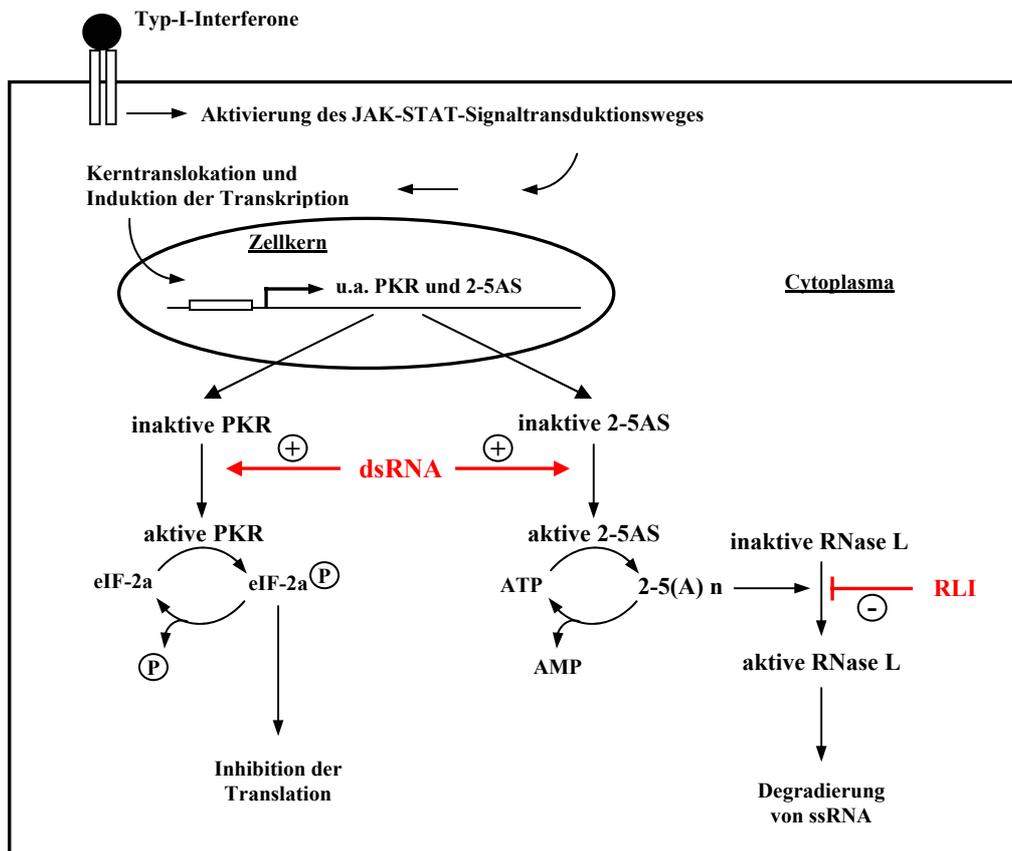


Abb. 1.4-1: Das Interferonsystem und die Induktion eines antiviralen Status. Die Bindung von Typ-I-Interferon an Rezeptoren auf der Zellmembran induziert u.a. die Expression der antiviral wirkenden Proteinkinase R (PKR) und der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2-5AS), wodurch der konstitutiv vorhandene Level der Proteine im Cytoplasma einer Zelle erhöht wird. Kommt es dann zu einer Virusinfektion der Zelle, werden beide Proteine durch dsRNA aktiviert und führen lokal zu einer Inhibition der Proteinsynthese. Zu den Komponenten des 2'-5'-Oligoadenylatsystems gehört auch ein RNase L Inhibitor (RLI), der durch eine direkte Bindung an die RNase L ihre Aktivierung über das 2'-5'-Oligoadenylat (2-5A) verhindern kann. (⊕: Aktivierung; ⊖: Inhibition; Ⓟ: Phosphorylierung)

Mit der Hemmung der PKR durch die viralen Proteine E2 und NS5A könnte also die Induktion eines antiviralen Status empfindlich gestört werden und eine HCV-Replikation trotz der Anwesenheit von Interferon und viraler dsRNA stattfinden (Bartenschlager & Lohmann, 2000).

1.5 Extrahepatische Manifestationen und Replikationszyklus des HCV

Das primäre Targetorgan für die Replikation des HCV ist die Leber. Dies konnten zahlreiche Studien an infizierten Patienten und experimentell infizierten Schimpansen belegen (Weiner et al., 1990; Navas et al., 1994; Lanford et al., 1995; Zibert et al., 1995; Yanagi et al., 1997; Mellor et al., 1998; Chang et al., 2000). Zusätzlich gibt es aber auch viele Hinweise auf extrahepatische Manifestationen des Hepatitis C-Virus. Das Replikationsintermediat des HCV wurde z.B. in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) HCV-infizierter Patienten detektiert (Bouffard et al., 1992; Wang et al., 1992; Muller et al., 1993; Moldvay et al., 1994; Muratori et al., 1996; Lerat et al., 1998). Außerdem konnte HCV-Negativstrang-RNA auch in den Lymphknoten, dem Pankreas, im Knochenmark, der Schilddrüse, der Milz und der Nebenniere nachgewiesen werden (Galli et al., 1995; Zehender et al., 1995; Sansonno et al., 1996a; Laskus et al., 1998; Laskus et al., 2000; Radkowski et al., 2000).

Die Replikation des HCV findet im Cytoplasma der infizierten Zelle statt, wobei in Analogie zu den Flavi- und Pestiviren nach dem Virusentry und dem Uncoating eine Minusstrang-RNA (Negativstrang/Replikationsintermediat) produziert wird, die als Template für die Synthese neuer Plusstränge dient. Die Plusstränge dienen dann wiederum als Matrize für die Translation des Polyproteins oder werden in die heranreifenden Viruspartikel eingebaut (Bartenschlager & Lohmann, 2000; Gowans, 2000). Die genauen molekularen Mechanismen der HCV-Replikation, inklusive der Genomreplikation und der Virusmorphogenese sind jedoch unbekannt.

1.6 Die Suche nach einem Zellkultursystem für HCV

Auf der Suche nach einem Zellkultursystem für das Hepatitis C-Virus wurden bislang sehr unterschiedliche Ansätze verfolgt. KOLYKHALOV und YANAGI konstruierten beispielsweise im Jahre 1997 erstmals einen cDNA-Klon, der das komplette Genom des HCV trug. Sie zeigten, dass die transkribierte RNA dieser Klone nach einer intrahepatischen Inokulation der Nukleinsäure in Schimpansen zur Replikation von HCV und zu einer Erkrankung der Tiere führte (Kolykhalov et al., 1997; Yanagi et al., 1997). Somit war es nun möglich, infektiöse HCV-

RNA in größeren Mengen herzustellen und für die Identifizierung und Optimierung eines *in vitro* Systems zu verwenden.

LOHMANN und seine Mitarbeiter verfolgten hingegen eine andere Strategie. Sie konstruierten sogenannte HCV-Replikons, die neben dem 3'- und 5'-NTR sowie den viralen Nichtstrukturproteinen des Hepatitis C-Virus auch die effiziente IRES-Sequenz des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) und ein Neomycinresistenzgen enthielten. Anschließend transfizierten sie eine humane Hepatomzelllinie (Huh7-Zellen) mit der transkribierten RNA dieser Replikons und selektionierten die erfolgreich transfizierten Zellen über die Antibiotikaresistenz (Lohmann et al., 1999). Mit diesem Verfahren konnten die Autoren tatsächlich Zellklone isolieren, in denen eine größere Menge an HCV-RNA detektiert werden konnte. Dennoch war die Anzahl der infizierten Zellklone und damit der Anteil an permissiven Zellen sehr gering. Aufgrund der Tatsache, dass die verwendeten Replikons zudem nicht das komplette Genom enthielten und somit eine Produktion infektiöser Virionen ausblieb, waren mit diesem System letztlich nur eingeschränkt Untersuchungen zur Replikation des HCV möglich.

Obwohl es zudem gelungen ist, Hepatozyten (Lanford et al., 1994; Yoo et al., 1995), Lymphozyten (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1993; Mizutani et al., 1996; Nakajima et al., 1996) sowie PBMCs (Cribier et al., 1995) experimentell mit dem Hepatitis C-Virus zu infizieren, steht für das Hepatitis C-Virus bis heute kein Zellkultursystem zur Verfügung, dass mit einer erhöhten Produktion infektiöser Virionen verbunden ist.

1.7 Detektion des HCV

Aufgrund eines fehlenden Zellkultursystems und der äußerst geringen Replikation des HCV in den bisher beschriebenen Systemen, kann der Nachweis des Virus nur über sehr sensitive Methoden erfolgen.

Für die klinische Labordiagnostik stehen mittlerweile eine Reihe kommerziell erhältlicher Testsysteme zur Verfügung. Die initiale Untersuchung einer Serumprobe auf HCV beginnt dabei in der Regel mit dem Nachweis HCV-spezifischer Antikörper über einen Enzym-Immuno-Assay (EIA). Eine im EIA reaktive Probe wird daraufhin in einem Rekombinanten-Immunoblot-Assay (RIBA) überprüft. Sind beide serologischen Testverfahren positiv, schließt sich der Nachweis der HCV-RNA an, um eine endgültige Diagnose stellen zu können. Dabei kann der Nachweis der viralen RNA in akkreditierten Laboratorien entweder über

eine validierte hausinterne PCR oder mit einem kommerziellen Kit erfolgen (Pawlotsky, 2002; persönliche Mitteilung von Christian Dieterich, Oberarzt im Institut für Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus St. Joseph-Stift, Bremen; persönliche Mitteilung von Reinhard Frodl, Labor Dr. Gärtner & Partner, Abt. Molekularbiologie, Weingarten).

In der Grundlagenforschung erfolgt die Detektion der HCV-RNA häufig ebenfalls über eine hausinterne PCR oder die *in situ* Hybridisierung. Das große Problem hierbei ist aber die fehlende Standardisierung der Methoden und damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Allein bei der *in situ* Hybridisierung weichen die Versuchsprotokolle in den unterschiedlichen Arbeitsgruppen stark voneinander ab.

Beim Nachweis des Virus über die RT-PCR ist die Situation ähnlich. Es sind mittlerweile unzählige hausinterne PCR beschrieben, die in ihrer Durchführung ebenfalls variieren. Besonders umstritten sind hierbei auch heute noch die Ergebnisse zur Detektion des Replikationsintermediates von HCV über die strangspezifische PCR, die häufig für den direkten Nachweis einer Virusreplikation zum Einsatz kommt. Durch eine falsche Bindung des eingesetzten Primers, ein Random-Priming von kleinen zellulären Nukleinsäuren oder ein Selfpriming der Sekundärstruktur des 5'NTR von HCV während der reversen Transkription, kann es immer wieder zum Auftreten von falsch positiven Ergebnissen kommen (Willems et al., 1993; McGuinness et al., 1994; Lanford et al., 1994; Lerat et al., 1996).

Um dieses Problem zu minimieren, wurden u.a. sogenannte Tagged-Primer für die RT verwendet (Lanford et al., 1994; Mellor et al., 1998). Sie enthielten am 5'-Ende eine einzigartige Sequenz, die weder im humanen noch im viralen Genom enthalten war und in der PCR als Target für den komplementären Primer diente.

Eine weitere Methode, eine hohe Strangspezifität zu gewährleisten, ist die Durchführung der RT-PCR mit der Tth-Polymerase, die sowohl reverse Transkriptase- als auch DNA-Polymerase-Aktivität besitzt. Die Thermostabilität des Enzyms erlaubt eine reverse Transkription von RNA bei extrem hohen Temperaturen (70°C) und gewährleistet so die Strangspezifität durch die erhöhte Stringenz des Annealings zwischen dem Template und dem Primer (Lanford et al., 1995; Sangar & Carroll, 1998; Craggs et al., 2001).

Da aber weder mit den Tagged-Primern noch bei der Verwendung der Tth-Polymerase ein Fehl- bzw. Selfpriming mit 100 %iger Sicherheit ausgeschlossen werden kann, gibt es bislang keine Methode, die von allen Arbeitsgruppen allgemein akzeptiert und einheitlich genutzt

wird. Zur Verifizierung der Resultate sollten somit möglichst immer zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz kommen (Gowans, 2000).

1.8 Zielsetzung

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten beim Nachweis des HCV war es ein Ziel dieser Arbeit, ein zuverlässiges, PCR-unabhängiges Nachweissystem speziell für die Detektion des Negativstranges von HCV zu entwickeln, das als alternative Methode zur PCR in der Grundlagenforschung angewendet werden kann und eine gute Standardisierung in der Durchführung ermöglicht. Die neue Methode sollte dabei auf dem Prinzip des Hybrid-Detection-Assays basieren, bei dem die virale RNA mit einzelsträngigen DNA-Sonden hybridisiert und mit einem anti-DNA:RNA-Hybridantikörper detektiert wird.

Eine weitere Intention dieser Arbeit war es, ein *in vitro* System für HCV zu etablieren, das mit einer erhöhten Produktion infektiöser Virionen verbunden sein sollte. Wie wichtig die Etablierung eines Zellkultursystems für HCV ist, belegt u.a. die Tatsache, dass ein Kleintiermodell für HCV bislang nicht existiert und Schimpansen als *in vivo* System aus ethischen und finanziellen Gründen nur begrenzt zur Verfügung stehen.

2 MATERIAL

2.1 Frischplasmen und Serumproben

HCV-positive Frischplasmen

- HCV Nr. 1-3: Frischplasmen HCV-positiver Patienten, zur Verfügung gestellt von Dr. Schönermarck und Dr. Lehmann [Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Springe].
- HCV Nr. 4: HCV-positives Frischplasma, das von einem chronisch HCV-infizierten Patienten gespendet wurde.
- HCV Nr. 5: HCV1b-positive Serumprobe [4×10^4 Geq/mL], zur Verfügung gestellt von Ph.D. Dr. Klaus-Hinrich Heermann [Georg-August-Universität, Medizinische Mikrobiologie, Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Göttingen].

Zwei HCV-negative Frischplasmen, zur Verfügung gestellt von Dr. Schönermarck und Dr. Lehmann [Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Springe].

2.2 Zellen

- U937-Zellen: Transformierte humane Monoblasten eines AML-Patienten, zur Verfügung gestellt von der Medizinischen Hochschule in Hannover.
- FRhK4-Zellen: Fetale Rhesusaffen Nierenzellen [CBER/FDA, Abteilung für Virologie, Bethesda, Maryland (USA)].
- HFS-10-Zellen: Humane Lungenfibroblasten, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Vallbracht.
- KMF-Zellen: Humane Knochenmarkfibroblasten, isoliert aus dem Femurkopf (Gradlowsky, 1995).

2.3 Zellkulturmedien und -zusätze

2.3.1 Grundmedien

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

9,9 g DMEM-Trockenpulver (D 3916, Sigma) und 3,7 g Natriumbicarbonat pro L Aqua dest. (pH 7,6), versetzt mit 100 U/mL Penicillin sowie 100 U/mL Streptomycin. Das DMEM wurde für die Kultivierung von Fibroblasten und FRhK4-Zellen verwendet.

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

17,7 g IMDM-Trockenpulver (I 7633, Sigma) und 3,024 g Natriumbicarbonat pro L Aqua dest. (pH 7,0), versetzt mit 100 U/mL Penicillin sowie 100 U/mL Streptomycin. Das IMEM wurde für die Kultivierung der U937-Zellen verwendet.

2.3.2 Wachstumsmedien

Grundmedien mit 10 % (v/v) FCS.

2.3.3 Erhaltungsmedien

Für FRhK4-Zellen wurde das Grundmedium mit 1 % (v/v) FCS, für HFS-10-, KMF- und U937-Zellen mit 10 % FCS verwendet. Das Erhaltungsmedium für die verwendeten FRhK4-Zellklone enthielt zusätzlich 1 % Fungizone.

2.3.4 Selektionsmedien

Für FRhK4-Zellklone wurde das Wachstums- und Erhaltungsmedium mit 600 µg/mL G418 Sulfat eingesetzt, für U937-Zellklone Erhaltungsmedium mit 700 µg/mL G418 Sulfat.

2.3.5 Einfriermedium

10 % DMSO in FCS.

2.4 Plasmide

2.4.1 p90/HCV FL-long pU

Das Plasmid wurde von Ph.D. C. M. Rice [Washington University in St. Louis, School of Medicine, Department of Molecular Microbiology, Washington] zur Verfügung gestellt. Es leitet sich vom Vektor pBR322 ab und enthält, unter der Kontrolle eines T7-Promotors, die komplette Konsensus cDNA-Sequenz des HCV-Isolates H77 (Kolykhalov et al., 1997; Major et al., 1999). Als Selektionsmarker dient ein Tetracyclin-Resistenzgen (siehe Abb. 2.4-1).

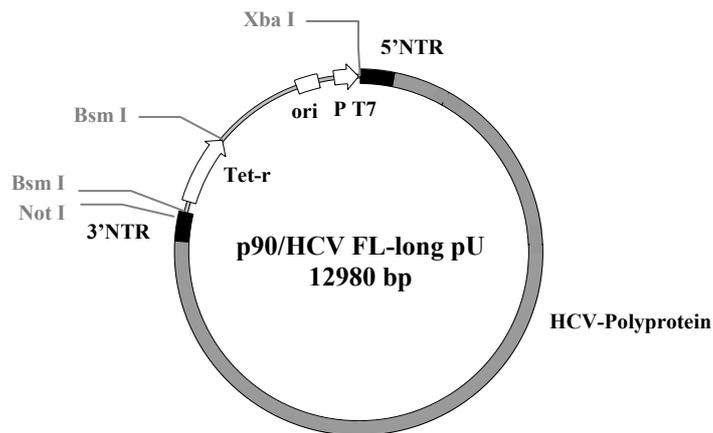


Abb. 2.4-1: Plasmidkarte von p90/HCV FL-long pU

2.4.2 pSP64/65

Die Plasmide pSP64 und pSP65 (Roche) besitzen jeweils eine multiple Klonierungsstelle, die unter der Kontrolle des SP6 Promotors steht. Der Polylinker des Plasmides pSP65 ist dabei im Vergleich zum pSP64 in entgegengesetzter Richtung inkloniert. Als Selektionsmarker dient in beiden Plasmiden ein Ampicillin-Resistenzgen (siehe Abb. 2.4-2).

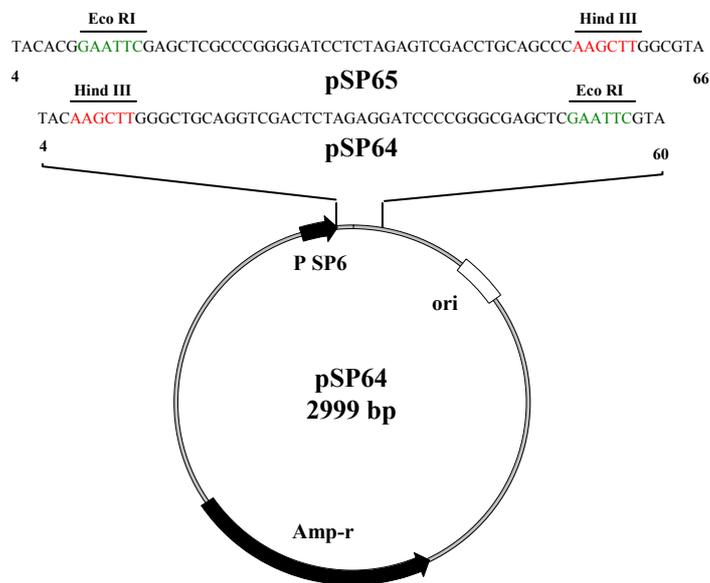


Abb. 2.4-2: Plasmidkarte von pSP64/65

2.4.3 pcDNA3/RLI 3'

Dieses Plasmid ist abgeleitet von pcDNA3 (Invitrogen) und enthält neben den Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgenen die cDNA-Sequenz des RLI unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (siehe Abb. 2.4-3) (Bisbal et al., 1995; Martinand et al., 1999).

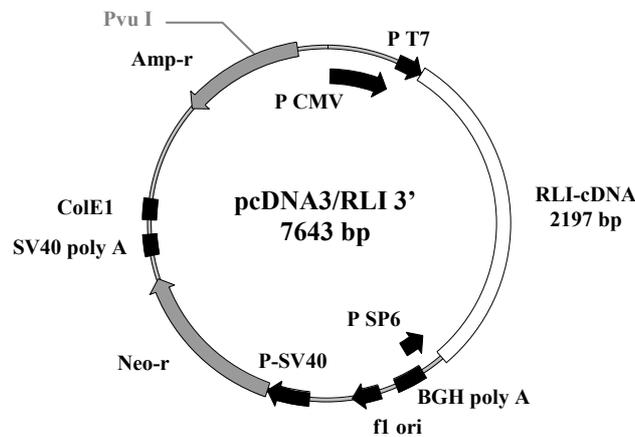


Abb. 2.4-3: Plasmidkarte von pcDNA3/RLI 3'

2.4.4 pcDNA3/RLI 3' (-)

Das Plasmid pcDNA/RLI 3'(-) leitet sich vom pcDNA3/RLI 3' ab. Die cDNA-Sequenz des RLI wurde durch Restriktionsspaltung entfernt (Gotter, 1999).

2.5 Bakterien

Escherichia coli Stämme: HB101 [10^5 CFU/mL] und C600 [10^6 CFU/mL] (GL BioTech)
SuRE[®] Competent Cells [10^5 CFU/mL] (Stratagene)

2.6 Molekularbiologische Software

Sequenzrecherche

Entrez am NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

Sequenz- und Sondenvergleich

Blast am NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

GeneDoc <http://www.edu/biomed/genedoc>

Fasta am EBI <http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>

Sonden- und Primerdesign

Primer 3 http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

2.7 Nukleotide

Desoxynucleosid Triphosphat Set Roche

Nucleosid Triphosphat Set Roche

2.8 Oligonukleotidprimer**2.8.1 HCV-spezifische Primer 1 (Schmidt et al., 1995) MWG Biotech**

HCV-S1 (outer): Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 342 - nt 361
5'-GAG GTT TAG GAT TCG TGC TC-3'

HCV-S2 (outer): Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 25 - nt 46
5'-CTC CAC CCA ATG AAT CAC TCC C-3'

HCV-S1N (inner): Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 89 - nt 108
5'-CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC-3'

HCV-S2N (inner): Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 320 - nt 339
5'-GAT GCA CGG TCT ACG AGA CC-3'

2.8.2 HCV-spezifische Primer 2 (Sondenherstellung) MWG Biotech

Sonde HCV-s: Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 161 - nt 180
5'-GAG TAC ACC GGA ATT GCC AG-3'
⇒ 5' Biotin-markiert

Sonde HCV-as: Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 489 - nt 508
5'-GAC CGC TCG GAA GTC TTC CT-3'
⇒ 5' Biotin-markiert

SHCV AS/588: Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 571 - nt 588
5'-AAG GGT ACC CGG GCT GAG-3'
⇒ 5' Biotin-markiert

2.8.3 HCV-spezifische Primer 3 (Kontrolltranskriptionherstellung) MWG Biotech

- HCV trans-s: Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 59 - nt 78
mit Hind III Schnittstelle (rot markiert)
5'-TGA **AGC TTT** GTC TTC ACG CAG AAA GCG T-3'
- HCV trans-as: Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 689 - nt 708
mit Eco RI Schnittstelle (grün markiert)
5'-TGG **AAT TCT** GAC CTT ACC CAA ATT GCG C-3'
- HCV trans-s-P: Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 59 - nt 78
mit Hind III Schnittstelle (rot markiert)
5'-AT GCA **AGC TTT** GTC TTC ACG CAG AAA GCG T-3'
⇒ 5' Phosphat-markiert
- HCV trans-as-P: Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 689 - nt 708
mit Eco RI Schnittstelle (grün markiert)
5'-GC CGG **AAT TCT** GAC CTT ACC CAA ATT GCG C-3'
⇒ 5' Phosphat-markiert

2.8.4 RLI-spezifische Primer (Gotter, 1999) MWG Biotech

- RLI-1-s: Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 433 - nt 458
5'-ACT TAT TTC CGT GGA TCT GAA TTA C-3'
- RLI-1-as : Antisense-Primer [100 pmol/μL]; nt 1433 - nt 1458
5'-ATC AAT TAA ATA GAC ATC AGC AGG T-3'

2.8.5 pcDNA3-spezifische Primer MWG Biotech

- RLI Tausch-s: Sense-Primer [100 pmol/μL]; nt 501 - nt 526 (Gotter, 1999)
spezifisch für CMV-Enhancerregion des Plasmides pcDNA3/RLI 3'
und pcDNA3/RLI 3'(-)
5'-CCT ATT GAC GTC AAT GAC GGT AAA TG-3'

- RLI Tausch-as : Antisense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 995 - nt 1020 (Gotter, 1999)
spezifisch für SP6-Promotorregion der Plasmide pcDNA3/RLI 3'
und pcDNA3/RLI 3'(-)
5'-TAG CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TA-3'
- RLI-P-CMV: Sense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 697 - nt 716
spezifisch für CMV-Promotorregion der Plasmide pcDNA3/RLI 3'
und pcDNA3/RLI 3'(-)
5'-CGT GTA CGG TGG GAG GTC TA-3'

2.8.6 pSP64/65-spezifischer Primer MWG Biotech

- AD 3 Sense-Primer [89 pmol/ μ L]; nt 2971 - nt 2987 im pSP64
5'-CAT ACA CAT ACG ATT TA-3'

2.8.7 HAV-spezifische Primer (Wünschmann, 1998) MWG Biotech

- HAV-VP3 3' Sense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 1470 - nt 1493
5'-GGT TGG TTA ACA TGA TGA GAA ATG
AAT TTA GGG TC-3'

- HAV-VP3 5' Antisense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 2184 - nt 2207
5'-CGC CGG AAT TCT ATT GTG TAG TAA
CAT CCA TAG CAT G-3'

2.8.8 β -Actin-spezifische Primer (Wünschmann, 1998) MWG Biotech

- β -Actin-s: Sense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 751 - nt 774
5'-AGA AGA GCT ACG AGC TGC CTG ACG-3'
- β -Actin-as: Antisense-Primer [100 pmol/ μ L]; nt 1107 - nt 1131
5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC-3'

2.9 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine

2.9.1 Antikörper

- Anti-DNA:RNA-Hybrid-Antikörper, AP-konjugiert Digene Corporation
- Anti-Kaninchen-IgG (Ziege), HRP-konjugiert DAKO
- Anti-RLI-IgG (Kaninchen); zur Verfügung gestellt von C. Bisbal,
Inst. de Genetique Moleculaire, Montpellier, Frankreich

Anti- β -Actin-IgG (Ziege)	Santa Cruz
Anti-Ziege-IgG (Esel), HRP-konjugiert	Santa Cruz

2.9.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm	Roche
mit 10 x Dephosphorylierungspuffer	Roche
Trypsin mit Na-EDTA (0,2 g/L)	Sigma
RNase A Typ III-A (DNase frei)	Sigma
Expand TM Reverse Transkriptase mit 5 x Puffer	Roche
Taq DNA-Polymerase mit 10 x PCR-Puffer	Eppendorf
Tth-Polymerase mit 10 x Tth-Puffer	Roche
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
T7-Polymerase	Roche
mit 5 x Transkriptionspuffer	Promega
SP6-Polymerase	Roche
mit 5 x Transkriptionspuffer	Promega
DNase RQ1 mit 10 x DNase-Puffer	Promega
Bsm I mit Restriktionspuffer H	Roche
Eco RI mit Restriktionspuffer H	Roche
Hind III mit Restriktionspuffer B	Roche
Kpn I mit Restriktionspuffer L	Roche
Not I mit Restriktionspuffer H	Roche
Pin AI (Age I) mit Restriktionspuffer B	Roche
Pvu I mit Restriktionspuffer H	Roche
Sma I mit Restriktionspuffer A	Roche
Stu I mit Restriktionspuffer B	Roche
Xba I mit Restriktionspuffer H	Roche

2.9.3 sonstige Proteine

FCS	Gibco BRL
RNasin [®] Ribonuklease-Inhibitor	Promega
BSA (Fraktion V)	Roche
Ovalbumin	Sigma

Leupeptin	Sigma
Pepstatin	Sigma
Aprotinin	Sigma
PMSF	Sigma

2.10 Antibiotika

Penicillin [10.000 U/mL]	Sigma
Streptomycin [10.000 µg/mL]	Sigma
Fungizone (Amphotericin B)	Gibco BRL
G418-Sulfat	Invitrogen
Ampicillin	Serva
Chloramphenicol	Merck

2.11 Standards

DNA-Längenstandard "1 kb-DNA-Leiter"	Invitrogen
Prestained MultiMark™	Novex

2.12 Kits

Mycoplasma Detection Kit	Roche
SuperFect® Transfection Reagent	Qiagen
TransMessenger™ Transfection Reagent	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
CDP-Star (ready-to-use)	Tropix
Emerald II™	Tropix
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Western Blotting Luminol Reagenz	Santa Cruz

2.13 Chemikalienliste

2-Mercaptoethanol	Merck
Aceton	Merck
Acrylamid	Pharmacia Biotech
Agarose	BMA und Bio-Rad
Ammoniumpersulfat	Serva

Bacto-Agar	Difco
(Methylen)-Bisacrylamid	Pharmacia Biotech
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Cäsiumchlorid	Serva
Chloroform	Fluka
DAPI	Sigma
DEAE-Dextran	Sigma
DEPC	Sigma
Desoxycholat	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de Haen
DMSO	Merck
Dithiothreitol	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
(Diethyl)-Ether	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Evans Blue	Sigma
Ficoll Histopaque [®] -1077	Sigma
Ficoll [®] 400	Serva
Formamid	Fluka
Glucose	Janssen Chimica
Glycerol	Riedel-de Haen
Glycin	Riedel-de Haen
Guanidiniumisothiocyanat	Roth
Harnstoff	Serva
HEPES	Acros
Immersionsöl	Zeiss
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Fluka
Kaliumacetat	Riedel-de Haen
Kaliumchlorid	Riedel-de Haen
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen

LMP-Agarose	Roche
Magnesiumchlorid	Roche
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haen
Methanol	Fluka
Methionin	Sigma
Milchpulver	Saliter
Manganchlorid	Roche
Molekularbiologisches Wasser (RNase frei)	Eppendorf
Morpholinopropansulfonsäure	Sigma
Methythiazoldiphenyltetrazoliumbromid	Sigma
Natriumacetat	Riedel-de Haen
Natriumchlorid	Fluka
Natriumcitrat-2-Hydrate	Riedel-de Haen
Natriumdodecylsulfat	Pharmacia Biotech
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
N-Lauroyl-Sarcosin (Sarkosyl)	Sigma
Nonidet P-40	Sigma
Phenol (H ₂ O-gesättigt)	Roth
Phenol (TE-gesättigt)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure	Fluka
Silica	Sigma
Sucrose	Serva
TEMED	Pharmacia Biotech
Tris-Base	Sigma
Triton [®] X-100	Sigma
Trypan-Blau	Sigma
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid	Merck
Yeast Extract	Difco

2.14 Puffer und Lösungen

2.14.1 Gebrauchslösungen

PBS (pH 7,2)	140	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	6,5	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄

RNase-freies H₂O 0,1 % (v/v) DEPC in H₂O, über Nacht gerührt
und anschließend zweimal autoklaviert - oder Verwendung
von molekularbiologischem Wasser (Mol.Bio-H₂O)

2.14.2 Mykoplasmenfärbung

DAPI-Stock	1	µg/mL	DAPI in PBS
DAPI-Lösung	DAPI-Stock	1:1000	in H ₂ O
Carnoy's Fixierer	25	% (v/v)	Eisessig in Methanol

2.14.3 Zellvitalitätstest

MTT-Lösung 5 mg/mL MTT in PBS
⇒ steril filtrieren und bei 4°C lichtgeschützt lagern

Solubilisierungslösung 10 % (w/v) SDS in 0,01 N HCl

2.14.4 Bakterienkulturen

LB-Medium (pH 7,0)	5	g	Hefeextrakt
	8	g	NaCl
	10	g	Trypton
	1	mL	1 N NaOH

ad 1 L mit Aqua dest. und autoklavieren

LB-Agar LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agaranteil

LB⁺⁺-Medium LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl

Ampicillin-Stocklösung	50 mg/mL Ampicillin in sterilem Aqua dest. unter Zugabe von NaOH lösen und mit HCl pH 7,3 einstellen ⇒ steril filtrieren und bei -20 °C lagern
Tetracyclin-Stocklösung	5 mg/mL Tetracyclin in 70 %igem Ethanol lösen und im Dunkeln bei -20 °C lagern

Chloramphenicol-Stocklösung: 34 mg/mL in Ethanol

2.14.5 Herstellung kompetenter Bakterien

TfB I-Lösung (pH 5,8)	30	mM	Kaliumacetat
	50	mM	MnCl ₂
	10	mM	CaCl ₂
	100	mM	RbCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerol
TfB II-Lösung	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	MOPS
	10	mM	RbCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerol

2.14.6 Minipräparation bakterieller Plasmid-DNA

Lösung 1 (pH 8,0)	50	mM	Glucose
	10	mM	EDTA
	10	mM	Tris-Base
	⇒ vor Gebrauch 2 mg/mL Lysozym zugeben		
Lösung 2	0,2	M	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
	⇒ vor Gebrauch frisch ansetzen		
Lösung 3 (pH 4,8)	3	M	Natriumacetat

2.14.7 Maxipräparation bakterieller Plasmid-DNA

STET-Puffer	50	mM	Tris-Base (pH 8,0)
	50	mM	EDTA (pH 8,0)
	8	% (w/v)	Sucrose
	5	% (v/v)	Triton [®] X-100
	⇒ vor Gebrauch frisch ansetzen		
TES	50	mM	Tris-Base (pH 8,0)
	50	mM	NaCl
	5	mM	EDTA (pH 8,0)
Lysozym-Lösung	20 mg/mL Lysozym in 20 mM Tris-Base (pH 8,0)		
Sarkosyl-Lösung	1 % (w/v) Sarkosyl in 20 mM Tris-Base (pH 8,0)		
Ethidiumbromid-Lösung	20 mg/mL Ethidiumbromid in 20 mM Tris-Base (pH 8,0)		
Cäsiumchlorid-Lösung	50 g Cäsiumchlorid in 65 mL 20 mM Tris-Base (pH 8,0) (Refraktionsindex: 1,3865)		
NaCl-gesättigtes Iso- propanol	Isopropanol ausschütteln in 10 mM Tris-Base/1 mM EDTA (pH 8,0) gesättigt mit NaCl		

2.14.8 Transfektion von Zellen

Transfektion mit der DEAE-Dextran-Methode

TD-Lösung (pH 7,4)	140	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	0,7	mM	Na ₂ HPO ₄
	25	mM	Tris-Base
TS-Lösung	100	mL	TD-Lösung
	+ 0,5	mL	MgCl ₂ [0,5 mM]
	+ 0,5	mL	CaCl ₂ [0,5 mM]

DEAE-Dextran 10 mg/mL in Aqua dest. lösen und steril filtrieren

Calcium-Phosphat Transfektion

(alle Lösungen bei 4°C lagern und kalt verwenden)

TE-Puffer (pH 7,8)	10	mM	Tris-Base
	1	mM	EDTA

2 x HBS (pH 7,13)	280	mM	NaCl
	50	mM	HEPES
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄

2 M CaCl-Lösung

Glycerolschocklösung 15 % Glycerol (v/v) in 1 x HBS

2.14.9 RNA-Isolierung nach der Silica-Methode(alle Lösungen mit Mol.Bio-H₂O ansetzen)

RSB-Lösung	10	mM	Tris-Base (pH 7,5)
	10	mM	NaCl
	1	% (v/v)	Nonidet P-40

Lysepuffer	5	M	Guanidiniumthiocyanat
	50	mM	Tris-Base (pH 6,5)
	20	mM	EDTA (pH 8,0)
	1,2	% (v/v)	Triton X-100

Waschpuffer	4,5	M	Guanidiniumthiocyanat
	50	mM	Tris-Base (pH 6,5)

Silica-Matrix 30 g Silica in 250 mL H₂O aufschwemmen und 24 h inkubieren. Überstand abnehmen, Sediment mit H₂O resuspendieren und erneut 6 h inkubieren. Silica-Sediment mit 300 µL HCl versehen, mischen, autoklavieren und bei 4°C im Dunkeln lagern.

70 % (v/v) Ethanol (-20°C)

Aceton

2.14.10 RNA-Isolierung mit Guanidiniumisothiocyanat

(alle Lösungen mit Mol.Bio-H₂O ansetzen)

Lösung D (pH 7,0)	4	M	Guanidiniumisothiocyanat
	25	mM	Natriumcitrat
	0,5	% (w/v)	N-Lauroyl-Sarcosin
	+ 100	mM	2-Mercaptoethanol (vor Gebrauch zugeben)

Lösung D* (pH 7,0)	5	M	Guanidiniumisothiocyanat
	31,25	mM	Natriumcitrat
	0,625	% (w/v)	N-Lauroyl-Sarcosin
	+ 125	mM	2-Mercaptoethanol (vor Gebrauch zugeben)

Phenol (H₂O-gesättigt; pH 4,5)

Chloroform/Isoamylalkohol (49:1)

1 M Natriumacetatlösung (4°C, pH 4,0)

Isopropanol (-20°C)

75 % (v/v) Ethanol (-20°C)

2.14.11 DNA-Isolierung

TE-Puffer	10	mM	Tris-Base
	1	mM	EDTA (pH 7,8)

RNase A-Stocklösung [10 mg/mL]

20 % (w/v) Sarcosyllösung

10 % (w/v) Chelexlösung

2.14.12 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation

(für RNA-Aufreinigung: alle Lösungen mit Mol.Bio-H₂O ansetzen)

Phenol (H₂O-gesättigt; pH 4,5)

Phenol (TE-gesättigt; pH 7,5)

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

3 M Natriumacetatlösung (4°C, pH 4,8)

Ethanol abs. (-20°C)

70 % (v/v) Ethanol (-20°C)

2.14.13 Agarose-Gelelektrophorese(für RNA-Auftrennung: alle Lösungen mit DEPC-H₂O ansetzen)

50 x TAE-Puffer (pH 7,8)	2	M	Tris-Base
	0,25	M	Natriumacetat
	0,05	M	EDTA
Probenpuffer	40	% (w/v)	Sucrose
	0,1	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	1	mM	EDTA (pH 8,0)
Denaturierender Probenpuffer	6	mM	EDTA (pH 8,0)
	300	mM	NaOH
	18	% (w/v)	Ficoll (Typ 400)
	0,15	% (v/v)	Bromphenolblau
	0,25	% (w/v)	Xylen Cyanol
DNA-Größenstandard	60	μL	1 kb-DNA-Leiter
	40	μL	10 x TAE-Puffer
	300	μL	Aqua dest.
	100	μL	Probenpuffer
	⇒ 10 min bei 56°C inkubieren und bei -20°C lagern		
Ethidiumbromidlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid in 20 mM Tris-Base (pH 8,0)		
3 % (v/v) H ₂ O ₂ -Lösung			

2.14.14 Dephosphorylierung von DNA

100 mM EGTA (pH 8,0)

2.14.15 Ligation von doppelsträngiger DNA mit der T4-DNA-Ligase

500 μg/mL BSA

2.14.16 Bradford-AssayBradford-Reagenz 1:5 mit H₂O verdünnt und filtriert

2.14.17 SDS-PAGE und Western-Blot

RITA-Puffer	10	mM	Tris-Base (pH 7,5)
	150	mM	NaCl
	2	mM	Methionin
	0,1	% (w/v)	SDS
	0,02	% (w/v)	NaN ₃
	1	% (w/v)	Na-Desoxycholat
	1	% (v/v)	Nonidet P 40
	1	mg/mL	Ovalbumin
	frisch zugeben:	1	mM
	3	g/mL	Aprotinin
	0,5	µg/mL	Leupeptin
	0,5	µg/mL	Pepstatin
4 x Lower Tris	1,5	M	Tris-Base (pH 8,8)
	0,4	% (w/v)	SDS
4 x Upper Tris	0,5	M	Tris-Base (pH 6,8)
	0,4	% (w/v)	SDS
Protein-Probenpuffer	62,5	mM	Upper Tris
	40	% (w/v)	Sucrose
	12	% (w/v)	SDS
	0,025	% (w/v)	Bromphenolblau
	8	% (v/v)	2-Mercaptoethanol
Acrylamid-Stammlösung	29	% (w/v)	Acrylamid
	1	% (w/v)	Bisacrylamid
10 x Elektrophoresepuffer	250	mM	Tris-Base
	1,88	M	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS

Blottingpuffer	25	mM	Tris
	188	mM	Glycin
	20	% (v/v)	Methanol
Renaturierungspuffer	10	mM	Tris-Base (pH 7,0)
	50	mM	NaCl
	4	M	Harnstoff
	0,1	mM	DTT
TBS	10	mM	Tris-Base (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
TTBS	10	mM	Tris-Base (pH 8,0)
	150	mM	NaCl
	0,05	% (w/v)	Tween-20
Blockierungslösung	10 % (w/v) Milchpulver in TTBS		
Sättigungspuffer	3 % (w/v) Milchpulver in TTBS		
Strippingpuffer	62,5	mM	Tris-Base (pH 6,8)
	2 %	(w/v)	SDS
	100	mM	2-Mercaptoethanol
	⇒ vor Gebrauch frisch ansetzen		

10 %ige (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

0,1 %ige (w/v) SDS-Lösung

0,1 %ige (w/v) Bromphenolblaulösung

2.14.18 Hybrid Detection Assay

(alle Lösungen mit Mol.Bio-H₂O ansetzen)

6 x SSC	0,9	M	NaCl
	90	mM	Natriumcitrat

100 x Denhardt'sche Lösung	2	% (w/v) BSA (Fraktion V)	
	2	% (w/v) Polyvinylpyrrolidon	
	2	% (w/v) Ficoll (Typ 400)	
	=> in 6 x SSC lösen		
20 x SSCPE (pH 7,2)	3	M	NaCl
	300	mM	Natriumcitrat
	260	mM	KH ₂ PO ₄
	25	mM	EDTA
Hybridisierungspuffer	50	% (v/v)	Formamid
	1	% (v/v)	100 x Denhardt'sche Lösung
	25	% (v/v)	20 x SSCPE
Waschpuffer	150	mM	NaCl
	50	mM	Tris-Base (pH 7,5)
	0,05	% (v/v)	Tween-20
Substratlösung	40	% (v/v)	CDP-Star
	10	% (v/v)	Tropix Emerald

2.15 Verbrauchsmaterialien

Chamber Slides	Nunc
Combitips	Eppendorf
Deckgläser	Omnilab
Dialyseschläuche	Gibco BRL
Einmalküvetten	Plastibrand
Einmalpipetten	Jürgens
Falkonröhrchen	Greiner
Filterpapier	Whatman
Glasobjektträger	Omnilab
Kanülen	Braun
Kryoröhrchen	Nunc
Nitrocellulosemembran (Immobilon TM PVDF)	Millipore

Pasteurpipetten	Brand
PCR-Reaktionsgefäße (RNase/DNase frei)	Biozym
Pipettenspitzen	Eppendorf
Quick-Seal-Röhrchen	Beckmann
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Reaktionsgefäße (RNase, DNase frei)	Eppendorf
Röntgenfilme (X-OMAT™ AR)	Kodak
Safe Seal-Tips	Nerbe Plus
Sofortbilder 667 Filmpack	Polaroid
StreptaWell 96-Well-Mikrotiterplatten	Roche
Zellkulturgefäße	Nunc

2.16 Geräte

Abbe Refraktometer	Optronic
Agarose-Gelkammern horizontal	Bio-Rad
Analysenwaage	Sartorius
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Blot-Kammer	Hofer
Eismaschine	Scotsman
ELISA-Reader E _{max} mit Software SOFTmax [®] Pro	Molecular Devices
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mit Kamera und Software Color View-Analysis	Zeiss Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Assistent
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus
Gefrierschrank (-20°C)	Kirsch
Glaspipetten	Jürgens
Kühl-Tischzentrifuge 5403	Eppendorf
Lumineszenz-Counter 1450 Micro [®] TriLux	Wallac
Microprocessor pH-Meter PH 537	WTW
Mikroskop Ortholux II	Leitz
Mikroskop Wilovert S	Hund
Minigelkammern für Agarosegele	Hofer
Multipipette	Eppendorf
Multiporator mit 0,4 cm Kunststoffküvetten	Eppendorf

Pipettboy	Integra Biosciences
Power PAC 300	Bio-Rad
Power Supply 200/2.0	Bio-Rad
Reagenzglasständer	Nalgene
Red Rotor	Hoefler
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine SRX-101	Konica
Scanner	Mustek
Sofortbildkamera MP4 ⁺	Polaroid
Speedvac SC 110	Savant
Spektralphotometer DU [®] 640	Beckmann
Sterilbank Lamin Air HB 2448 und HB 2472 S	Heraeus
Thermocycler Gene Amp [™] PCR System 2400	Perkin Elmer
Thermomagnetrührer	IKA-Labortechnik
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5403 mit Rotor 16F24-11; 16A4-44	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultraschallgerät	Bandelin-Elektronik
Ultrazentrifuge LE-70 mit Rotor FW 65	Beckmann
UV-Handlampe VL-6C	Serva
UV-Transilluminator Mighty Bright	Hoefler
Vakuumpumpe	Inotech
Vakuumsauger	Integra Bioscience
Vakuumbackofen	Heraeus
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	Memmert
Western Blot-Apparatur Mighty Small	Hoefler
Zentrifuge GS-6R mit Rotor GH 3.7	Beckmann
Zentrifuge RC28S mit Rotor F-28/50; F-16/250	Sorvall

3 METHODEN

3.1 Kultivierung von Zellen

3.1.1 Kultivierung etablierter Fibroblasten-Zelllinien und FRhK4-Zellen

Die Zellen wurden in DMEM-Erhaltungsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium der Lungen- und Knochenmarkfibroblasten enthielt dabei 10 % FCS, das der FRhK4-Zellen und -Zellklone 1 % FCS.

Einmal in der Woche erfolgte ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Erhaltungs- oder Selektionsmedium und etwa alle zwei Wochen eine Passagierung der Zellen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, im Verhältnis von 1:2 (Fibroblasten) bzw. 1:4 bis 1:6 (FRhK4-Zellen und -Zellklone) umgesetzt und für einen Tag in Wachstumsmedium/Selektionsmedium inkubiert, bevor sie weiter im jeweiligen Erhaltungsmedium/Selektionsmedium kultiviert wurden.

3.1.2 Kultivierung von U937-Zellen

Die nicht-adhärenenten U937-Zellen und -Zellklone wurden mit einer Zelldichte von 10⁴ bis 10⁶-Zellen/mL in Erhaltungs- oder Selektionsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Einmal wöchentlich wurden die Zellen 1:20 bis 1:60 gesplittet und mit neuem Medium versehen. Gegebenenfalls erfolgte die Kultivierung der Zellen auch in Anwesenheit von 10 ng/mL PMA. Dieses induziert bei den U937-Zellen einen Proliferationsstopp und leitet mit einem Adhärenzschritt die Differenzierung der Zellen zum Makrophagenphänotyp ein (Sachs, 1978; Harris & Ralph, 1985). Bei den PMA-behandelten Ansätzen erfolgte einmal wöchentlich ein 50 %iger Mediumwechsel.

3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Konfluent gewachsene Fibroblasten oder FRhK4-Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und einmal in Erhaltungsmedium gewaschen (U937-Zellen wurden direkt pelletiert). Die Zellen wurde dann in 1 mL des vorgekühlten Einfriermediums resuspendiert und in ein ebenfalls vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Die Proben wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgetaute Zellen wurden in Wachstumsmedium aufgenommen, in entsprechende Zellkulturflaschen transferiert und bei 37°C sowie 5 % CO₂ kultiviert. Um tote Zellen und restliches DMSO zu entfernen, wurde nach einem Tag das Medium nochmals gewechselt und durch Erhaltungsmedium ersetzt.

3.3 Bestimmung von Zellzahlen

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypan-Blau gemischt und die vitalen Zellen in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt. Durch Multiplikation der ermittelten Zellzahl eines Großquadrates mit dem Kammerfaktor (5×10^3) und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor erhielt man schließlich die Zellzahl pro mL.

3.4 Mykoplasmen-Nachweis

Mykoplasmen sind parasitär in Zellkulturen auftretende Prokaryoten, die starke Veränderungen des Stoffwechsels und des Wachstums der Zellen hervorrufen können, ohne die Wirtszelle zu zerstören (Bolske, 1988; McGarrity et al., 1984). Eine Kontamination von Zellkulturen durch Mykoplasmen sollte daher durch entsprechende Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde daher in regelmäßigen Abständen eine DAPI-Färbung (Kernfärbung, siehe Abb. 3.4-1) durchgeführt und zusätzlich ein Mykoplasma-Detection-Kit (ELISA) verwendet. Für die DAPI-Färbung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 20 bis max. 30 % auf einem Chamber Slide kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS, einmal in PBS/Carnoy's (1:1) und dann mit kaltem Carnoy's (4°C) gewaschen, bevor sie für 5-10 min in kaltem Carnoy's (4°C) fixiert wurden. Nach einer Inkubation der Zellen mit je 40 μ L DAPI-Lösung für 10 min bei RT im Dunkeln, wurden sie mit Aqua dest. gewaschen, mit einem Deckglas versehen und unter dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

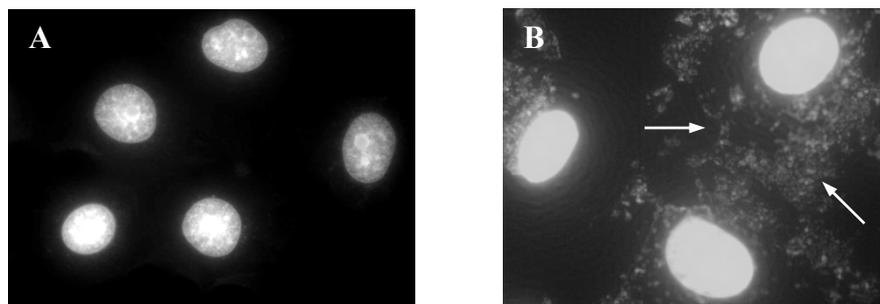


Abb. 3.4-1: Nachweis von Mykoplasmen über die DAPI-Färbung. Dargestellt sind die Zellkerne von Mykoplasmen-negativen FRhK4-Zellen (A, 1000 x) und Mykoplasmen-positiven Vero-Zellen (Affennierenzellen; B, 1000 x). Die Pfeile kennzeichnen die DNA der Mykoplasmen im Cytoplasma der kontaminierten Zellen.

Der Nachweis von Mykoplasmen über den Kit der Firma Qiagen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.5 MTT-Test zur Bestimmung der cytotoxischen G418-Konzentration

Bei dieser Methode handelt es sich um einen kolorimetrischen Test, mit dem die Zellvitalität sowie die Proliferation von Zellen anhand der Aktivität der Mitochondriendehydrogenase überprüft werden kann. Der gelbe wasserlösliche Farbstoff MTT wird dabei von lebenden Zellen über Pinocytose aufgenommen und durch die Succinatdehydrogenase der Mitochondrien zu einem wasserunlöslichen blauen Formazansalz reduziert. Dies ist dann lichtmikroskopisch durch die Blaufärbung des Cytoplasmas sichtbar. Wird das Formazan mit Alkohol wieder in Lösung gebracht, ist die Vitalität der Zellen proportional zur Quantität an Formazan, was im ELISA-Reader gemessen werden kann.

Pro Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 10^3 U937-Zellen in vier vertikalen Reihen ausgesät und in Erhaltungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an G418-Sulfat (0-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 550-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Alle vier Tage wurde aus den Wells vorsichtig 100 μL Medium entnommen und durch frisches Medium mit G418 ersetzt. Nach 16tägiger Inkubation der Ansätze wurden pro Verdünnung die Zellen aus jeweils zwei Wells gepoolt und in ein Eppendorfcup überführt. Die Zellen wurden für 4 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 200 μL Erhaltungsmedium resuspendiert. Je 100 μL dieser Zellsuspension wurden in zwei neue Wells gegeben und für weitere zwei Stunden kultiviert. Zu den 100 μL Medium wurden dann 10 μL der MTT-Lösung gegeben und die Zellen erneut für 4 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss an die vierstündige Inkubation wurden pro Well 100 μL Solubilisierungslösung zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation der Ansätze über Nacht bei 37°C und die abschließende Auswertung im ELISA-Reader durch die Bestimmung der Absorbanz bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm. Als Positivkontrolle (Vitalität 100 %) dienten die Zellen, die nicht mit G418 inkubiert wurden, als Negativkontrolle (0 % Vitalität) wurden Zellen verwendet, die mit 1000 μg G418/mL behandelt wurden.

3.6 Infektion von Zellkulturen mit HCV

Haut- bzw. Knochenmarkfibroblasten oder FRhK4-Zellen und -Zellklone in einer 6 cm Schale bzw. 25 cm^2 Kulturflasche (80-90 % konfluent gewachsen) wurden mit jeweils 500 μL HCV-Frischplasma infiziert und anschließend für 2-4 h inkubiert. Die Ansätze wurden dabei in regelmäßigen Abständen geschwenkt. Als Negativkontrollen wurden Zellen mitgeführt, die mit einem HCV-negativen Kontrollserum infiziert wurden (Mock). Nach der Inkubation wur-

de das Inokulum restlos entfernt, die Zellen zweimal mit je 2-3 mL Grundmedium gespült und im jeweiligen Erhaltungs- bzw. Selektionsmedium weiter kultiviert (siehe 3.1.1).

Bei einer Reinfektion von Zellen mit 500 μL Überstand infizierter bzw. transfizierter Zellen erfolgte die Inkubation der Zellen für 2-8 h. Im Anschluss an die Infektion wurden die Zellen zweimal mit 3 mL Grundmedium gespült und schließlich im jeweiligen Medium bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert.

3.7 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

3 mL LB^{++} -Medium wurden mit 20 μL einer Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 mL dieser Übernachtskultur wurde dann zu 100 mL LB^{++} -Medium gegeben. Nachdem die Kultur eine optische Dichte (OD_{660}) von 0,40 bis 0,55 erreicht hatte, wurde sie auf Eis unter regelmäßigem Schwenken für 10 min abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm (4°C) abzentrifugiert (F16/250-Rotor), in 30 mL kaltem Tfb I-Puffer resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm wurden die Bakterien dann in 4 mL kaltem Tfb II-Puffer aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.8 Verdünnungstransformation kompetenter Bakterien

Für die Amplifikation des p90/HCV FL-long pU, kurz p90/HCV (siehe 2.4.1), wurden kompetente Bakterien (C_{600} und SuRE Cells) mit dem Plasmid transformiert und über das Tetracyclin-Resistenzgen selektioniert.

Die Bakterien wurden zunächst aufgetaut und für 10 min auf Eis gelagert. Dann wurden verschiedene Verdünnungen des Plasmides mit Wasser hergestellt (1, 2 und 10 ng/ μL) und je 1 μL dieser Plasmidverdünnungen zu 30 μL der Bakteriensuspension gegeben. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C und die erneute Lagerung der Ansätze für 2 min auf Eis. Die Bakteriensuspensionen wurden dann mit jeweils 115 μL LB^{++} -Medium versetzt und erneut für 1 h bei 37°C im Thermoblock unter maximalem Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Ansätze auf LB-Agar-Platten mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracyclin ausplattiert und über Nacht bei 37°C gelagert. Ein Teil der derart selektionierten Bakterienklone wurde am nächsten Tag gepickt und in einer Übernachtskultur bei 37°C und bei 260 rpm auf dem Thermoschüttler in 3 mL LB-Medium und der entsprechenden Menge an Antibiotikum vermehrt.

3.9 Minipräparation bakterieller Plasmid-DNA

Bevor die selektionierten Bakterienklone der Verdünnungstransformation aus 3.8 im großen Maßstab vermehrt wurden, wurde in einer sogenannten Mini- bzw. Schnellpräparation überprüft, ob die ausgewählten Klone auch tatsächlich die eingebrachte Plasmid-DNA tragen.

Zu diesem Zweck wurden Bakterien aus je 1 mL der Übernachtskulturen 30 sec bei 9000 rpm abzentrifugiert, in 100 µL Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur vollständigen, alkalischen Lyse der Zellen wurden dann 100 µL der frisch angesetzten Lösung 2 hinzugegeben, kurz gevortext und die Suspension für 5 min bei 60°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, mit 150 µL Lösung 3 versetzt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Durch eine nachfolgende 15minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (4°C) konnten dann die kleinen, in Lösung gebliebenen Plasmid-Moleküle von den übrigen bakteriellen Bestandteilen (hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA, denaturierte Proteine und Zelldebris) getrennt werden, da diese durch die hohe Salzkonzentration ausgefallen waren. Zu den Überständen wurde dann je 1 mL eiskaltes Ethanol gegeben und die Plasmid-DNA für 30 min bei -80°C gefällt. Die Präzipitate wurden 20 min bei 14.000 rpm (4°C) abzentrifugiert, die Pellets noch zweimal mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und im Speed Vac getrocknet. Zur Überprüfung der Identität der Plasmid-DNA erfolgte abschließend eine Restriktionsenzymspaltung (siehe 3.20.2.1).

3.10 Maxipräparation bakterieller Plasmid-DNA

Nachdem die Bakterienklone auf die Plasmid-DNA hin überprüft wurden, erfolgte die Anzucht der Klone mit je 500 µL der Übernachtskultur aus 3.8 in 400 mL LB-Medium mit 10 µg/mL Tetracyclin. Die Inkubation der Bakterien wurde bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD₅₅₀ von 0,9-1,2 durchgeführt. Die Anzucht wurde schließlich mit 170 µg/mL Chloramphenicol über Nacht fortgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 4000 rpm in der Sorvall RC 28 S mit dem Rotor F-16/250 für 20 min bei 14°C zentrifugiert, das Pellet mit 20 mL TES-Puffer gewaschen und in 25 mL STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 1 mL Lysozym und das Aufkochen des Ansatzes für 40 sec über dem Bunsenbrenner wurden die Zellen dann lysiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation des Lysates für 45 min bei 16.000 rpm (14°C) in der Sorvall RC 28 S mit dem F-28/50-Rotor. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen-Anteil Isopropanol versetzt und die Nukleinsäure für mindestens 10 min bei -80°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 60 min bei 12.000 rpm (4°C) mit dem Rotor F-28/50 wurde das Pellet für etwa 10 min im

Speed Vac getrocknet und in 8,7 mL Sarkosyl-Lösung resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 9,4 g CsCl sowie 900 µL Ethidiumbromid-Lösung und eine isopyknische Zentrifugation in der Ultrazentrifuge mit dem FW 65-Rotor bei 33.000 rpm für 48 h bei 20°C. Die Plasmid-Bande wurde unter UV-Licht mit einer Kanüle abgezogen, in ein Falconröhrchen überführt, mit Cäsiumchlorid-Lösung auf 12 mL aufgefüllt und erneut für 24 h bei 50.000 rpm (20°C) im FW 65-Rotor zentrifugiert. Nachdem die Plasmid-Bande wieder abgezogen wurde, erfolgte die Entfernung des Ethidiumbromids durch mehrmaliges Ausschütteln der DNA-Präparation mit NaCl-gesättigtem Isopropanol. Abschließend wurde das Cäsiumchlorid durch eine Dialyse gegen eine 5 mM Tris-Base (pH 8,0) entfernt, die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 3.19) und die Identität der Nukleinsäure erneut durch eine Restriktionsspaltung überprüft (siehe 3.20.2.1). Die Lagerung der derart gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

3.11 Herstellung infektiöser HCV-RNA über *in vitro* Transkription

Für die Herstellung infektiöser HCV-RNA wurde die HCV-cDNA des mit Bsm I linearisierten Vektors p90/HCV (siehe 3.20.2.2) mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Der Transkriptionsansatz wurde modifiziert nach KOLYKHALOV und setzte sich wie folgt zusammen: 2 µg linearisiertes p90/HCV, 20 µL 5 x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT, 6 mM MgCl₂, je 3 mM ATP, UTP, CTP und GTP, 50 U RNasin und 50 U T7-Polymerase (Kolykhalov et al., 1997).

Der Ansatz besaß ein Endvolumen von 100 µL und wurde für 90 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 1 µL T7 Polymerase und die weitere Inkubation für 90 min bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Transkriptionsansatz dann einem DNase Verdau (siehe 3.20.1.2) sowie einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe 3.15.1). Die Produkte wurden schließlich gelelektrophoretisch kontrolliert (siehe 3.18) und photometrisch quantifiziert (siehe 3.19).

3.12 Transfektion von Zellen

3.12.1 Transfektion von U937- und FRhK4-Zellen mit HCV-RNA

3.12.1.1 DEAE-Dextran Transfektion

Mit DEAE-Dextran wurden U937-Zellen sowie FRhK4-Zellen und -Zellklone mit HCV-RNA transfiziert. Die U937-Zellen (10⁶ Zellen pro Ansatz) wurden mit RNA transfiziert, die aus dem HCV-Frischplasma Nr. 4 isoliert wurde. Die FRhK4-Zellen und -Zellklone einer 6 cm Zellkulturschale (etwa 80 % konfluent gewachsen) wurden sowohl mit RNA aus der HCV-

Frischplasmaprobe Nr. 4, als auch mit der *in vitro* transkribierten HCV-RNA (siehe 3.11) transfiziert.

Die jeweiligen Zellen wurden zu diesem Zweck einmal mit TS-Lösung gewaschen und in 250 µL Transfektionsmix aus 1 bzw. 10 µg RNA und 12,5 µL DEAE-Dextran in TS-Lösung inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein RNA-freies Inokulum. Nach einer 15minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen zweimal in Grundmedium gewaschen und schließlich bei 37°C und 5 % CO₂ im jeweiligen Erhaltungsmedium weiter kultiviert.

3.12.1.2 Transfektion mit TransMessengerTM Transfection Reagent

Die Transfektion von U937-Zellklonen sowie FRhK4-Zellen und -Zellklonen erfolgte mit jeweils 5-10 µg RNA nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und im entsprechenden Erhaltungsmedium/Selektionsmedium kultiviert. Bei den U937-Zellklonen wurde das Selektionsmedium teilweise mit 10 ng/mL PMA versetzt und alle vier Tage zu 50 % erneuert.

3.12.2 Transfektion von U937-Zellen mit pcDNA/RLI 3' und pcDNA/RLI 3' (-)

3.12.2.1 Calcium-Phosphat Transfektion

5 µg Vektor-DNA (pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-)) wurden mit kaltem TE-Puffer auf 438 µL aufgefüllt, kurz gemischt und langsam mit 62 µL einer 2 M CaCl₂-Lösung versetzt. Anschließend wurden 500 µL kaltes 2 x HBS in einem 15 mL Falconröhrchen vorgelegt und die vorbereitete DNA-Lösung tropfenweise hinzugegeben, während zwischendurch auf Eis geschüttelt wurde. Dieser Transfektionsmix wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend langsam auf 10⁶ U937-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale (in 2 mL Erhaltungsmedium) verteilt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen in ein 15 mL Falconröhrchen überführt, für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und mit 1 mL Glycerol-Schocklösung für genau 90 sec behandelt. Sofort danach wurden die Zellen mit 10 mL Erhaltungsmedium neutralisiert und zweimal in einem Gesamtvolumen von 10 mL Medium gewaschen (5 min bei 3000 rpm). Die Zellen wurden in 5 mL Erhaltungsmedium resuspendiert, in eine 6 cm Zellkulturschale überführt und vor ihrer Selektion (siehe 3.13) für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Als Kontrolle für die nachfolgende Selektion dienten Mock-transfizierten Zellen, die mit einem Transfektionsmix ohne Plasmid-DNA transfiziert wurden.

3.12.2.2 Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation werden nicht-adhärenente Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Impulsen hoher Frequenz ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Öffnungen in der Plasmamembran, durch die die Nukleinsäuren in die Zellen gelangen können.

Für die Transfektion von U937-Zellen mit pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-) wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 800 μ L Grundmedium aufgenommen, mit 5 μ g der entsprechend linearisierten Plasmid-DNA versetzt (siehe 3.20.3) und in Elektroporations-Küvetten überführt. Zwei Ansätze wurden dann bei RT elektroporiert, zwei weitere Ansätze wurden vor der Transfektion in der Küvette auf Eis abgekühlt bevor sie in den Multiporator von Eppendorf gestellt wurden. Die benötigte Spannung sowie die Pulslänge für die Elektroporationen wurden einerseits nach den Empfehlungen des Herstellers, andererseits in Anlehnung an BERGAN und KUSUMAWATI gewählt und sind in Tab. 3.12-1 aufgeführt (Bergan et al., 1993; Kusumawati et al., 1999).

Tab. 3.12-1: Bedingungen der Elektroporation für die Transfektion von U937-Zellen.

	Elektroporation bei 4°C	Elektroporation bei RT
Spannung	440 Volt	220 Volt
Pulsdauer	40 μ s	80 μ s

Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen zunächst 10 min in der Küvette belassen (bei RT bzw. für 2 min auf Eis und dann bei RT), vorsichtig in Erhaltungsmedium überführt und für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.12.2.3 Transfektion mit SuperFect[®] Transfection Reagent

Die Transfektion von $1-2 \times 10^6$ U937-Zellen mit pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-) erfolgte in einer 6 cm Zellkulturschale mit dem SuperFect-Reagenz nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und direkt danach selektioniert.

3.13 Selektion der transfizierten U937-Zellen

Etwa 48 h nach der Transfektion von U937-Zellen mit pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-) (siehe 3.12.2) erfolgte die Selektion der entsprechenden Zellklone. Zu diesem

Zweck wurden die Zellen zunächst 10 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und in 10 mL bzw. 20 mL Selektionsmedium aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension wurden dann je 200 µl in das Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Alle vier Tage erfolgte schließlich der Austausch von 100 µL Medium durch 100 µL neues Selektionsmedium, bis eine deutlich sichtbare Zellproliferation zu erkennen und alle Kontrollzellen abgestorben waren.

3.14 Isolierung von Nukleinsäure

3.14.1 HCV-RNA-Extraktion nach der Silica-Methode

Bei der Silica-Methode handelt es sich um ein schnelles und einfaches Verfahren, um RNA aus Serum- oder Plasmaproben zu isolieren. Die Silica-Methode beruht dabei auf einer Lyse des Probenmaterials in Anwesenheit von Guanidiniumisothiocyanat (GIT), das die Proteine denaturiert und somit unerwünschte RNasen inhibiert. Nach der Lyse wird die freigesetzte Nukleinsäure an Silicapartikel gebunden und aufgereinigt (Boom et al., 1990).

Zu 100 µL einer HCV-Frischplasmaprobe wurden nacheinander 900 µL Lysepuffer und 10 µL der Silica-Matrix (siehe 2.14.9) gegeben, wobei die Probe jeweils gut gemischt wurde. Der Ansatz wurde dann 10 min bei RT inkubiert (zwischendurch vortexen), für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Silica-Pellet in 900 µL Waschpuffer vollständig resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der letzte Waschschrift einmal mit Waschpuffer, zweimal mit 70%igem Ethanol und einmal mit Aceton wiederholt. Es folgte eine zehnmütige Inkubation des Pellets im offenen Reaktionsgefäß bei 56°C, die Aufnahme der Probe in 100 µL DEPC-H₂O und die weitere Inkubation des geschlossenen Reaktionsgefäßes für 10 min im Thermoblock (zwischendurch vortexen). Schließlich wurde der Ansatz erneut für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, 75 µL des wässrigen Überstandes in ein neues Gefäß überführt und die Nukleinsäurelösung bei -80°C gelagert.

3.14.2 RNA-Extraktion mit Guanidiniumisothiocyanat

Das Prinzip der Extraktionsmethode nach CHOMCZYNSKI und SACCHI beruht darauf, dass sich die RNA in einer wässrigen Lösung in Anwesenheit von Guanidiniumisothiocyanat (GIT) unter sauren Bedingungen (pH 4,5) von einer organischen Phase aus Phenol und Chloroform sowie einer sogenannten Interphase abtrennen lässt (Chomczynski & Sacchi, 1987). D.h. bei der Lyse der Zellen unter sauren Bedingungen, verbleibt die RNA in einer nachfolgenden Zentrifugation in der wässrigen Oberphase, während sich die Proteine und die DNA in der unteren organischen Phase bzw. der Interphase befinden.

Als Ausgangsmaterial dienten max. 10^7 Zellen bzw. 200 μL Überstand infizierter und nicht infizierter Kulturen oder 100-200 μL der jeweiligen HCV-Frischplasmaproben. Die Proben wurden mit 500 μL Lösung D versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Anschließend erfolgte nacheinander die Zugabe von 100 μL einer 1 M Natriumacetatlösung (pH 4,0) und 500 μL wassergesättigtem Phenol (pH 4,5), wobei die Ansätze jedes Mal durch ein- bis zweiminütiges Schwenken gemischt wurden. Nach der weiteren Zugabe von 100 μL Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurden die Proben dann 10 sec kräftig geschüttelt, für 15 min auf Eis gestellt und für 20 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen-Anteil an eiskaltem Isopropanol versetzt und die RNA für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Durch eine erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm (4°C) für 20 min wurde die Nukleinsäure pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 300 μL Lösung D resuspendiert und die RNA durch den Zusatz des gleichen Volumens an Isopropanol repräzipitiert. Die Pelletierung der Nukleinsäure erfolgte wiederum durch eine Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm (4°C). Das Pellet wurde schließlich noch zweimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen, im Speed Vac getrocknet und in einem geeigneten Volumen Mol.Bio- H_2O aufgenommen. Um den Lösungsvorgang zu verbessern, wurden die Proben für 10 min bei 65°C inkubiert, photometrisch quantifiziert (siehe 3.19) und dann bei -80°C gelagert.

3.14.3 Modifizierte RNA-Extraktion mit 5 M Guanidiniumisothiocyanat-Lösung

Als Ausgangsmaterial dieser modifizierten RNA-Extraktion nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (Chomczynski & Sacchi, 1987) dienten neben 200 μL Zellsuspension oder Kulturüberstand auch 200 μL HCV-Frischplasma- bzw. HCV-Serumproben.

Im Vergleich zur herkömmlichen RNA-Extraktion (siehe 3.14.2) wurde bei dieser Methode u.a. die Zusammensetzung der Lösung D verändert. Die eingesetzten Mengen der verwendeten Substanzen wurde dabei erhöht (Lösung D*; siehe 2.14.10), um den Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen, der auftritt, wenn man die normale Lösung D nicht auf ein Zellpellet sondern zu 100-200 μL Zellkulturüberständen oder HCV-Plasmaproben gibt. Zusätzlich wurde auch, nach Rücksprache mit S. Wünschmann (Department of Internal Medicine, University of Iowa, Iowa City), die Durchführung geringfügig modifiziert. Der Eisschritt, der unmittelbar nach der Zugabe von GIT, Phenol und Chloroform zur Probe erfolgt, wurde von 15 min auf 45 min erhöht, um eine bessere Phasentrennung zu gewährleisten. Zudem fand die Fällung der RNA mit Isopropanol nun bei -80°C statt, wobei auf die zweite Fällung gänzlich verzichtet wurde.

3.14.4 Isolierung von DNA aus Zellen

3.14.4.1 Klassische DNA-Isolierung

Etwa 10^6 - 10^7 Zellen wurden gegebenenfalls mit Trypsin abgelöst, einmal mit 10 mL PBS gewaschen und in 900 μ L TE-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 μ L der 20 %igen Sarcosyl-Lösung wurde der Ansatz kurz gemischt, mit 20 μ L der RNase A-Stocklösung versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 200 μ g/mL zugegeben, für weitere 3 h bei 57°C inkubiert und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe 3.15.1).

3.14.4.2 Isolierung mit Chelex[®] 100

Bei dieser Methode wurden 200 μ L einer Zellsuspension ($\sim 2 \times 10^5$ Zellen) zunächst für 5 min bei 10.000 rpm (RT) abzentrifugiert und das Pellet in 200 μ L einer 10 %igen Chelex-Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde dann für 10 min bei 95°C im Thermomixer und 1 min auf Eis inkubiert, bevor eine Zentrifugation für 30 sec bei 14.000 rpm erfolgte. Schließlich wurden vorsichtig 100 μ L Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 μ L des derart hergestellten Lysates direkt in die PCR eingesetzt.

3.15 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.15.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

3.15.1.1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Mit dieser Methode werden proteinhaltige Verunreinigungen aus DNA- bzw. RNA-Präparationen beseitigt. Das gepufferte Phenol sowie das Chloroform denaturieren dabei die Proteine, sie fallen aus und sammeln sich in der nachfolgenden Zentrifugation in der unteren Phenolphase und der Interphase unter der wässrigen Nukleinsäurelösung. Die geringen Mengen an Isoamylalkohol verhindern beim Ausschütteln ein Schäumen der Probe, während das Chloroform beim letzten Mischvorgang noch das restliche Phenol aus der wässrigen Phase beseitigt. Bei der Aufreinigung von DNA wurde in dieser Arbeit ausschließlich TE-gesättigtes Phenol (pH 7,5) verwendet. Die Isolierung von RNA erfolgte stets mit H₂O-gesättigtem Phenol (pH 4,5), da sich im „sauren“ Phenol DNA löst und so ein zusätzlicher Reinigungseffekt auftrat (vgl. 3.14.2).

Die Nukleinsäureproben wurden zunächst auf ein Volumen von 500 μ L mit Mol.Bio-H₂O gebracht und anschließend mit einem Volumen-Anteil des äquilibrierten Phenols versetzt. Die Probe wurde 2 min geschüttelt und für 2 min bei 14.000 rpm (RT) zentrifugiert, bevor die

obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert wurde. Nacheinander wurde dann die Oberphase mit einem Volumen-Anteil Phenol/Chloroform/Isoamlyalkohol (25:24:1) sowie einem Volumen-Anteil Chlorofom/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, wobei jeweils erneut für 2 min geschwenkt und für 2 min zentrifugiert wurde. Die Oberphase wurde schließlich in ein neues Eppendorfcup überführt und die Nukleinsäure gefällt (siehe 3.15.1.2).

3.15.1.2 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren bilden in Gegenwart von monovalenten Kationen in Ethanol ein unlösliches Präzipitat und können so aus Lösungen weiter aufgereinigt bzw. konzentriert werden.

Die Fällung der Nukleinsäure erfolgte durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem Ethanol sowie einer Inkubation der Proben für 1 h bei -80°C. Durch eine nachfolgende Zentrifugation der Ansätze für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C wurde die Nukleinsäure pelletiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C) und für 5 min im Speed Vac getrocknet. Die Nukleinsäure wurde dann in einem geeigneten Volumen Mol.Bio-H₂O aufgenommen und gegebenenfalls photometrisch quantifiziert (siehe 3.19).

3.15.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um spezifische Fragmente einer durch Restriktionsverdau gespaltenen DNA oder Produkte einer PCR isolieren zu können, wurde einerseits eine Aufreinigung in niedrig schmelzender Agarose durchgeführt, andererseits ein Kit der Firma Qiagen verwendet.

3.15.2.1 Aufreinigung durch Gelelektrophorese in LMP-Agarose

Die DNA wurde in niedrig schmelzender Agarose elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden dann auf 56°C erhitzt, mit vorgewärmtem Aqua dest. auf 500 µL aufgefüllt und dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol versetzt. Der Ansatz wurde für 2 min im Vortexer gemischt und es folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (RT) zur Phasentrennung. Nach der Überführung der wässrigen Oberphase in ein neues Cup wurde der Vorgang nacheinander mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und mit Phenol (TE-gesättigt) wiederholt. Anschließend wurde das Phenol durch dreimaliges Extrahieren mit wassergesättigtem Ether aus der wässrigen Oberphase entfernt, die obere Etherphase abgenommen und die DNA gefällt (siehe 3.15.1.2).

3.15.2.2 *Aufreinigung mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit*

Bei dieser Aufreinigung wurde die DNA zunächst in normaler oder niedrig schmelzender Agarose elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und in ein Eppendorfcup überführt. Die weitere Isolierung der Nukleinsäure erfolgte mit dem Gel Extraktions Kit der Firma Qia-gen nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss an die Elution der DNA wurde die Konzentration der Nukleinsäure am Photometer bestimmt (siehe 3.19).

3.16 RT-PCR zum Nachweis von RNA

Bei jeder RT-PCR wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, die die zu detektierende Nukleinsäure definitiv enthielt (Ausnahme: Nachweis des Negativstranges von HCV) und mindestens eine Negativkontrolle, zu der statt RNA nur Wasser gegeben wurde.

3.16.1 Nachweis des Positivstranges von HCV

Die Detektion des HCV-Positivstranges erfolgte mittels RT-PCR mit einer nachfolgenden nested-PCR modifiziert nach den Angaben von SCHMIDT et al. (Schmidt et al., 1995). Dabei wurden 1 µg der RNA-Präparationen aus den Zellen bzw. 6 µL RNA-Extrakt, mit jeweils 30 pmol Sense- und Antisense-Primer (outer-Primer, siehe 2.8.1), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 5 µL 10 x PCR-Puffer auf ein Volumen von 45 µL gebracht und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden dann sofort auf Eis gestellt und mit 5 µL des Enzymmixes bestehend aus 1,25 U ExpandTM Reverse Transkriptase sowie 1 U Taq DNA-Polymerase versetzt. Es folgte eine reverse Transkription für 30 min bei 42°C, ein Denaturierungsschritt für 1 min bei 95°C und 30 PCR-Zyklen mit folgenden Parametern: Denaturierung für 1 min bei 95°C, Annealing für 1 min bei 60°C und Extension für 2 min bei 72°C. Anschließend erfolgte eine einmalige Extension bei 72°C für 10 min.

An die RT-PCR schloss sich dann die nested-PCR an. Für diesen Zweck wurde 1 µL der cDNA aus der RT-PCR in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 pmol der jeweiligen inner-Primer (siehe 2.8.1), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 µL 10 x PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase versetzt. Die nested PCR erfolgte in einem Endvolumen von insgesamt 50 µL, wobei die PCR-Bedingungen denen der RT-PCR entsprachen. Lediglich eine zweiminütige Denaturierung wurde den 30 PCR-Zyklen vorgeschaltet.

3.16.2 Nachweis des Replikationsintermediates von HCV

Zum Nachweis des Negativstranges von HCV wurde jeweils 1 µg der RNA-Präparationen aus den Zellen eingesetzt. Im Gegensatz zur Detektion des Positivstranges wurde die reverse Transkription und die erste PCR zum Nachweis des Replikationsintermediates in getrennten Reaktionsgefäßen, modifiziert nach den Angaben von LANFORD und CRAGGS, durchgeführt (Lanford et al., 1995; Craggs et al., 2001). Für die reverse Transkription wurde das Template zunächst mit 20 pmol des HCV-spezifischen Sense-Primers (outer-Primer, siehe 2.8.1) in einem Volumen von 12 µL für 2 min bei 95°C und 3 min bei 70°C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 8 µL des vorgewärmten RT-Mixes mit 4 U Tth-Polymerase, 2 µL Tth-Puffer, 1 mM MnCl₂ sowie 200 µM eines jeden dNTP, während die Temperatur bei 70°C gehalten wurde. Nach einem Primer-Annealing für 2 min bei 60°C folgte die reverse Transkription für 20 min bei 70°C. Die Reverse Transkriptase Aktivität der Tth-Polymerase wurde anschließend durch die Zugabe von 2 µL einer 7,5 mM EGTA-Lösung sowie einer Inkubation der Ansätze für 30 min bei 98°C inaktiviert. Die Durchführung der ersten PCR erfolgte mit 1-5 µL cDNA aus der RT-Reaktion in einem Volumen von 50 µL mit jeweils 30 pmol der outer-Primer (siehe 2.8.1), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 µL 10 x PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase. Im Anschluss an die erste PCR wurde eine nested PCR durchgeführt, wobei die PCR-Bedingungen denen der nested-PCR aus 3.16.1 entsprachen.

3.16.3 Nachweis von HAV-RNA

Die reverse Transkription und die nachfolgende PCR zum Nachweis des HAV wurde in einem Endvolumen von 50 µL durchgeführt. Zunächst wurden dabei 45 µL des RT-PCR-Ansatzes aus 5 µL 10 x PCR-Puffer, 50 pmol HAV Sense- und Antisense-Primer (siehe 2.8.7), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 6 µL eines RNA-Extraktes für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und 5 µL des Enzymmixes bestehend aus 1,25 U ExpandTM Reverse Transkriptase sowie 1 U Taq DNA-Polymerase hinzugegeben. Es folgte die reverse Transkription für 45 min bei 42°C, ein Denaturierungsschritt für 1 min bei 94°C und 30 PCR-Zyklen mit folgenden Parametern: Denaturierung für 1 min bei 94°C, Annealing für 2 min bei 56°C und Extension für 3 min bei 72°C. Zum Abschluss erfolgte eine finale Extension bei 72°C für 10 min.

3.16.4 Nachweis von RLI-mRNA

Die enzymatische Amplifikation der RLI-mRNA wurde in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 2 µg RNA und 30 pmol RLI-1-as-Primer (siehe 2.8.4) mit Mol.Bio-H₂O

auf ein Volumen von 10 μL gebracht, für 10 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription in einem Gesamtvolumen von 20 μL mit 200 μM eines jeden Desoxynukleotidtriphosphates, 10 mM DTT, 4 μL des 5 x ExpandTM Reverse Transkriptase Puffers und 1,25 U ExpandTM Reverse Transkriptase. In einem zweiten Schritt wurden 5 μL der cDNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit je 200 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 μL des 10 x PCR-Puffers, 1 U Taq DNA-Polymerase sowie 30 pmol der RLI-spezifischen Sense- bzw. Antisense-Primer (siehe 2.8.4) versetzt. Nach einer zweiminütigen Denaturierung der Proben bei 95°C erfolgte die PCR mit 30 Zyklen (1 min 95°C, 1 min 56°C und 2 min 72°C) sowie eine abschließende Extension der neusynthetisierten DNA für 10 min bei 72°C.

3.16.5 Nachweis von β -Actin-mRNA

Bei der β -Actin PCR erfolgte die Amplifikation der Nukleinsäure ebenfalls in zwei Schritten. Dazu wurden wiederum 0,5-2 μg RNA-Extrakt mit 30 pmol Antisense-Primer (siehe 2.8.8) auf ein Volumen von 10 μL gebracht, für 10 min bei 65°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Mit dem gleichen Reaktionsmix wie unter 3.16.4 beschrieben (Verwendung von β -Actin spezifischen Primern anstelle der RLI-Primer) wurde schließlich die reverse Transkription und die nachfolgende PCR durchgeführt. Nach einer Initialen Denaturierung für 5 min bei 95°C und 30 PCR-Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 95°C, 2 min Annealing bei 60°C sowie 3 min Extension bei 72°C, erfolgte wieder eine finale Extension für 10 min bei 72°C.

3.17 PCR zum Nachweis des RLI auf Genomebene

Um zu überprüfen, ob die transfizierten U937-Zellen aus 3.12.2 das RLI-ORF des Plasmides pcDNA3/RLI 3' stabil aufgenommen hatten, wurde das RLI in den selektionierten Zellklonen (siehe 3.13) auf Genomebene nachgewiesen. Die Detektion des RLI-ORF erfolgte dabei jeweils mit einer Primerkombination die gewährleistete, dass das zusätzlich eingebrachte RLI-ORF von dem zellulären RLI-Gen unterschieden werden konnte (siehe Tab. 3.17-1).

Die PCR wurde in einem Volumen von 50 μL mit je 1 μg DNA-Extrakt, 50 pmol Sense- und Antisense-Primer, 200 μM jedes Desoxynukleotidtriphosphates, 5 μL 10 x PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase wie unter 3.16.4 beschrieben durchgeführt.

Tab. 3.17-1: Primerkombinationen für den Nachweis des RLI auf Genomebene

Ansatz	Primer 1	Primer 2
1	RLI-1-s	RLI Tausch-as (SP6-Promotor)
2	RLI-1-as	RLI Tausch-s (CMV-Enhancer)
3	RLI-1-as	RLI-P-CMV (CMV-Promotor)

3.18 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA- und RNA-Moleküle erfolgte mit 0,6 bis 2 %igen horizontalen Agarosegelen in TAE-Puffer unter Zusatz von 0,4 µg/mL Ethidiumbromid. Die angelegte Feldstärke betrug maximal 5 V/cm Elektrodenabstand. Vor dem Auftragen der Proben wurde ihre Dichte durch die Zugabe eines Probenpuffers (normaler oder denaturierender Probenpuffer; siehe 2.14.13) erhöht, wobei dieser maximal 1:6 verdünnt wurde. Als Längenmaß wurden 5-10 µL eines DNA-Größenstandards eingesetzt. Die Beurteilung der Gele erfolgte unter UV-Licht bei 256 nm und die Dokumentation der Ergebnisse mit einer Polaroidkamera.

Für die RNA-Gele wurde der Lauf- und Elektrophorese-Puffer mit DEPC-H₂O und der Probenpuffer mit Mol.Bio.H₂O angesetzt. Zusätzlich wurde die Elektrophoresekammer, der Gelträger und der Kamm nacheinander mit 3 %iger H₂O₂-Lösung und mit DEPC-H₂O gespült, bevor sie für die Gelelektrophorese verwendet wurden.

3.19 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA bei 260 nm, das durch die in den Basen enthaltenen aromatischen Ringe bedingt ist. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt, was bei einem Absorptionswert von 1 (Optische Dichte, OD) einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL entspricht (1 OD₂₆₀ = 40 µg/mL ssRNA bzw. 33 µg/mL ssDNA).

Zusätzlich kann die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Lösung an dem Verhältnis der Absorption von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm) bestimmt werden. Bei einer reinen Nukleinsäure-Präparation liegt der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA). Ist der Wert kleiner liegt eine Verunreinigung der Präparation durch Proteine oder Phenolreste vor.

3.20 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

3.20.1 DNase-Verdau mit DNase RQ1

3.20.1.1 Verdau von zellulären RNA-Extrakten mit DNase RQ1

Die RNA-Extrakte HCV-transfizierter Zellen wurden vor der Durchführung der RT-PCR einer DNA-Degradation mit der DNase RQ1 unterzogen. Dafür wurden je 43 µL RNA-Lösung aus der Extraktion mit je 5 µL 10 x DNase-Puffer und 2 U DNase RQ1 für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt (siehe 3.15.1).

Der erfolgreiche DNA-Verdau wurde überprüft, indem eine RNA-haltige Probe mit und ohne die Reverse Transkriptase über die RT-PCR amplifiziert wurde.

3.20.1.2 Verdau von *in vitro* transkribierter HCV-RNA mit DNase RQ1

Die Produkte der *in vitro* Transkription aus 3.11 wurden mit 5 U DNase RQ1 sowie 10 µL 10 x DNase-Puffer versetzt und für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt (siehe 3.15.1) und photometrisch quantifiziert (siehe 3.19).

Die DNA-Degradation der Transkriptionsansätze wurde durch eine Kontrolle bei der RT-PCR bzw. durch eine elektrophoretische Auftrennung der Proben im Agarosegel überprüft.

3.20.2 Restriktionsenzymspaltung von p90/HCV

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, die doppelsträngige DNA-Moleküle an den Phosphodiesterbindungen spalten. Die Restriktionsenzymspaltung des infektiösen HCV-Plasmides (p90/HCV FL-long pU; siehe 2.4.1) erfolgte, je nach Arbeitsvorhaben, mit unterschiedlichen Enzymen.

3.20.2.1 Spaltung des p90/HCV mit Xba I und Not I

Der Restriktionsverdau zur Überprüfung der Identität der HCV-Plasmid-DNA aus den Plasmidpräparationen (siehe 3.9 und 3.10) erfolgte in einem Endvolumen von 30 µL mit jeweils 4 U der Restriktionsendonukleasen Xba I und Not I, 2 µL RNase A (2 mg/mL), 3 µL 10 x Restriktionspuffer H und 20 µL (Minipräparation) bzw. 300 ng (Maxipräparation) Plasmid-DNA für 2 h bei 37°C. Zur Kontrolle der Spaltung wurden die Ansätze komplett auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.18).

3.20.2.2 Linearisierung des p90/HCV mit Bsm I

Die Linearisierung des infektiösen HCV-Plasmides mit Bsm I für die *in vitro* Transkription erfolgte mit 5 µg Plasmid-DNA sowie 20 U Bsm I in einem Endvolumen von 40 µL nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss an den jeweiligen Verdau wurden 1-3 µL des Ansatzes zur Kontrolle der Spaltung entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.18). Die linearisierte DNA wurde dann über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt (siehe 3.15.1) und die Konzentration der Nukleinsäure photometrisch bestimmt (siehe 3.19).

3.20.2.3 Spaltung des p90/HCV mit Kpn I und Pin AI (Age I)

Die Degradation des p90/HCV erfolgte für 2 h bei 37°C mit jeweils 20 U Pin AI bzw. Kpn I, 4 µL des entsprechenden Restriktionspuffers sowie 5 µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 40 µL. Die Kontrolle des erfolgreichen Verdau erfolgte mit 3 µL des Spaltproduktes über eine Gelelektrophorese (siehe 3.18).

3.20.3 Linearisierung von pcDNA/RLI 3' und pcDNA/RLI 3' (-)

Für die Transfektion von U937-Zellen mit pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-) über die Elektroporation (siehe 3.12.2.2), mussten die Plasmide mit Pvu I linearisiert werden. Dafür wurden jeweils 10 µg Plasmid, 4 µL Enzym und 5 µL Puffer H in einem Volumen von 50 µL für 3 h bei 37°C inkubiert.

3.21 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Der Bradford-Assay beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Säurefarbstoffes Coomassie-Brilliantblau in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu von 465 nach 595 nm verschiebt.

Für den Assay wurden je 5 µL der gegebenenfalls vorverdünnten Zellysate mit 1 mL Bradford-Reagenz gemischt und für 15 min inkubiert. Nach genau 15 min erfolgte die Proteinbestimmung der Proben im Photometer gegen den Lysepuffer als Referenz.

3.22 SDS-PAGE und Western-Blot zum Nachweis des RLI

Die SDS-PAGE wurde in dieser Arbeit zum Nachweis des RLI-Proteins eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden FRhK4-Zellen und -Zellklone (pcDNA3/RLI 3' und pcDNA3/RLI 3' (-)) einer 6 cm Zellkulturschale mit je 250 µL kaltem Rita-Puffer für 15 min auf Eis lysiert. Der Zelldebris wurde für 10 min bei 14.000 rpm (4°C) abzentrifugiert, die Überstände in ein neues

Gefäß überführt und mit je 5 μ L Lysat die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe 3.21). 20-40 μ g Protein wurden im Verhältnis 1:5 mit Proteinprobenpuffer für 5 min im Thermoblock erhitzt. Es folgte die Auftrennung der Proben über ein vertikales Sammelgel (4 % Acrylamidstocklösung in 4 x Upper Tris) und ein Trenngel (7,5 % Acrylamidstocklösung in 4 x Lower-Tris) in Elektrophorespuffer für 2-3 h bei maximal 6 V/cm Elektrodenabstand und 4°C. Als Größenmarker wurde ein vorgefärbter Proteinstandard mitgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in Renaturierungspuffer und anschließend zusammen mit der Nitrozellulosemembran für 30 min in Blottingpuffer inkubiert, bevor der Tank-Blot für 3 h bei 1,0 A erfolgte. Im Anschluss an den Transfer wurde die Spur mit dem Marker abgetrennt, die Membran kurz in TTBS-Puffer gespült und anschließend für 1 h (oder über Nacht) in Blockierungslösung bei RT (4°C) inkubiert. Für das Immunostaining wurde die Membran dreimal für 10 min in Sättigungspuffer gewaschen und zunächst 1 h bei RT (oder über Nacht) mit einem primären Antikörper (anti-RLI-AK, 1:250 in Sättigungspuffer) inkubiert. Nach dem Waschen, wurde die Membran mit einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper (anti-Kaninchen-HRP, 1:4000 in Sättigungspuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden erneut durch dreimaliges Waschen in TTBS für jeweils 5 min entfernt und es erfolgte schließlich die Detektion mit dem Chemilumineszenz-Kit (Luminol-Reagenz) nach den Anweisungen des Herstellers.

An die Detektion des RLI-Proteins schloss sich der Nachweis von β -Actin über einen primären β -Actin-Antikörper aus der Ziege (1:400 in Sättigungspuffer) und einen sekundären, HRP-gekoppelten anti-Ziege-Antikörper (1:2000 in Sättigungspuffer) an. Zu diesem Zweck wurde die Membran kurz in TTBS-Puffer gewaschen, für 30 min bei 50°C in Strippingpuffer inkubiert, erneut für 10 min in TTBS-Puffer gewaschen und wie oben beschrieben weiter behandelt, wobei mit der Blockierung der Membran begonnen wurde.

3.23 Konstruktion HCV-spezifischer ssDNA-Sonden

Die Herstellung der HCV-spezifischen, einzelsträngigen und 5'-biotinylierten Sense-Sonden zur Detektion des Negativstranges von HCV wurde (im Gegensatz zur Konstruktion der Antisense-Sonden) in enger Zusammenarbeit mit Stephan Kremb, einem ehemaligen Diplomanden am Institut für Virologie der Universität Bremen, durchgeführt.

3.23.1 Ermittlung des geeigneten Bereiches

Mit den Computerprogrammen aus 2.6 wurde eine Region für die Konstruktion der HCV-spezifischen Sonden aus der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides (p90/HCV) ermittelt, die innerhalb der HCV-Genotypen 1a, 1b, 2a, 2b und 3a recht homolog ist (siehe Abb. 3.23-1).

Die entsprechenden Sense- und Antisense-Primer zur Herstellung der Sonden wurden mit dem Primerdesign-Programm aus 2.6 ermittelt und binden jeweils am 5'- bzw. 3'-Ende des ausgewählten 429 bp-langen Fragmentes der konservierten 5'NTR/Core-Region des infektiösen p90/HCV.

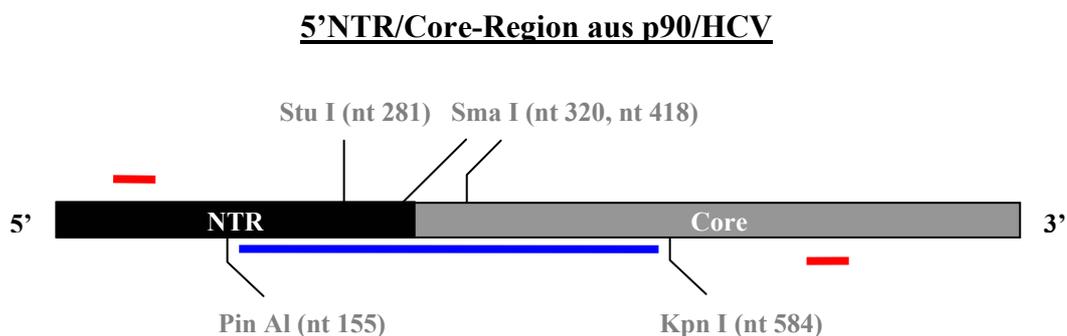


Abb. 3.23-1: Schematische Übersicht über die 914 bp-lange 5'NTR/Core-Region aus der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides p90/HCV. Die Abbildung zeigt den Bereich für die Herstellung der ssDNA-Sonden in Sense- bzw. Antisense-Orientierung (blau), die Primerbindestellen für die Herstellung eines 665 bp-langen HCV-Inserts (rot) und verschiedene Restriktionsschnittstellen.

3.23.2 Isolierung der Template-DNA

Das 429 bp-lange Fragment aus der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides wurde über eine Restriktionsenzymsspaltung des p90/HCV mit Pin A I sowie Kpn I isoliert (siehe 3.20.2.3) und in einer nachfolgenden Gelelektrophorese in niedrig schmelzender Agarose vom restlichen Plasmid getrennt. Die Template-DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gegebenenfalls aus der niedrig schmelzenden Agarose aufgereinigt (siehe 3.15.2.1).

3.23.3 Durchführung einer Run-Off-PCR

Bei der Run-Off-PCR wird die Nukleinsäure-Synthese mit nur einem Primer an einer DNA-Matrize definierter Länge durchgeführt. D.h. die DNA-Polymerase kann theoretisch nur einen der beiden Matrizenstränge amplifizieren und fällt am Ende ab, so dass einzelsträngige DNA-Moleküle entstehen.

Die Synthese der HCV-spezifischen Sonden über die Run-Off-PCR erfolgte, modifiziert nach STURZL, in einem Volumen von 100 μ L mit je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP,

200 pmol eines biotinylierten Sondenprimers (siehe 2.8.2), 10 μ L 10 x PCR-Puffer und 4,2 U Taq-Polymerase bzw. 4 U Tth-Polymerase (Sturzl & Roth, 1990). Als Template-DNA für die Herstellung der Sonden dienten entweder 15 μ L des nicht aufgereinigten 429 bp-langen Fragmentes aus 3.23.2 (unverdünnt oder verdünnt) oder 20-200 ng des entsprechend aufgereinigten Fragmentes. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 95°C denaturiert, dann folgte die PCR mit 30-40 Zyklen von 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 48-76°C und 2 min Extension bei 72°C. Zum Abschluss wurde eine einmalige Extension der neusynthetisierten DNA für 10 min bei 72°C durchgeführt.

3.23.4 Kontrolle der Einzelsträngigkeit der Sonden

Die Kontrolle der Einzelsträngigkeit der Sonden erfolgte zum einen über eine Restriktionsenzymspaltung der Produkte aus der Run-Off-PCR mit Stu I und/oder Sma I und zum anderen über eine gelelektrophoretische Auftrennung der Amplikons mit denaturierendem Probenpuffer.

Für die Restriktionsspaltung wurden die Amplikons aus der Run-Off-PCR entweder direkt in den Verdau eingesetzt oder die Produkte wurden vorher im Agarosegel getrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 3.15.2.1). Die Restriktion erfolgte in einem Endvolumen von 30 μ L für 2 h bei 37°C, wobei der Ansatz aus 3-6 μ L der jeweiligen PCR-Produkte, 4 U Enzym und 3 μ L des entsprechenden Restriktionspuffers bestand. Zur Kontrolle der Spaltung wurde der Restriktionsansatz komplett elektrophoretisch getrennt (siehe 3.18).

3.24 Konstruktion von HCV-spezifischen Kontrolltranskripten

Um die Qualität der HCV-spezifischen Sonden aus 3.23 überprüfen zu können, wurden, zusammen mit Stephan Kremb, HCV-spezifische Kontrolltranskripte in Positiv- und Negativstrang-Orientierung einer definierten Länge hergestellt. Die Region für die Konstruktion der synthetischen Kontrolltranskripte sollte dabei den Bereich der HCV-Sonden beinhalten.

3.24.1 Ermittlung der geeigneten Primer zur Isolierung eines HCV-Inserts aus der 5'NTR/Core-Region des p90/HCV

Mit Hilfe des Primer 3-Computerprogrammes aus 2.6 wurden zunächst Primer ermittelt, die stromaufwärts vom nt 155 des 5'NTR und stromabwärts vom nt 580 der Core-Region in der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides binden (siehe Abb. 3.23-1). An beide Primer wurde zusätzlich die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymes gehängt, um später eine Ligation des Fragmentes in entsprechende Vektoren zu ermöglichen. Der Sense-Primer wurde mit

einer Hind III-Schnittstelle und der Antisense-Primer mit einer Eco RI-Schnittstellen versehen (siehe 2.8.3). Die gleichen Primer wurden außerdem noch einmal mit einer zusätzlichen 5'-Phosphat-Markierung verwendet (HCV trans-s-P und HCV trans-as-P), damit die hergestellten HCV-Inserts (siehe 3.24.2) vor ihrem Verdau mit Hind III und Eco RI ligiert werden konnten. Dadurch sollte überprüft werden, ob eine Ligation der HCV-Inserts die Restriktionsspaltung verbessert und damit den Erfolg der Klonierung, im Vergleich zu den unphosphorylierten Inserten, erhöht.

3.24.2 Isolierung des HCV-Inserts aus der 5'NTR/Core-Region mittels PCR

Für die Isolierung des HCV-Inserts wurden 50 ng des p90/HCV mit 50 pmol der normalen oder 5'-Phosphat-markierten Sense- und Antisense-Primer (siehe 2.8.3), je 200 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 5 μL 10 x PCR-Puffer auf ein Volumen von 47,5 μL gebracht. Die Ansätze wurden für 5 min bei 95°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2,5 U Taq-Polymerase und die Durchführung von 30 PCR-Zyklen mit 1 min 95°C, 1 min 68°C und 1 min 72°C. Nach einer abschließenden Extension für 10 min bei 72°C wurden die PCR-Produkte bei 4°C gelagert.

Bei den 665 bp-langen HCV-Inserten, die über die 5'-phosphorylierten Primer konstruiert wurden, erfolgte im Anschluss an die PCR eine Blunt End Ligation der Produkte. Für diese Ligationenreaktion wurde die DNA-Ligase des Phagens T4 verwendet. Sie katalysiert die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Moleküles mit der freien 3'-Hydroxylgruppe eines benachbarten DNA-Stranges. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 50 μL . Der Reaktionsmix bestand aus 10-20 μL PCR-Produkt, 5 μL 10 x Ligase-Puffer, 5 μL BSA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sowie 1 μL T4 DNA-Ligase. Der Ligationenansatz wurde für 5 min bei 37°C, für 1 h bei RT und über Nacht bei 14°C inkubiert, bevor er schließlich bei -20°C gelagert wurde.

3.24.3 Restriktionsenzymsspaltung der HCV-Inserts sowie der Plasmide pSP64/65 und Dephosphorylierung der linearisierten Vektoren

Damit die über die PCR gewonnenen, 665 bp-langen HCV-Inserts aus 3.24.2 in die Vektoren pSP64 und pSP65 inkloniert werden konnten, mussten sowohl die PCR-Produkte (unligiert oder ligiert) als auch die Plasmide mit Hind III und Eco RI enzymatisch degradiert werden. Die Restriktionsspaltungen wurden mit jeweils 20 U Eco RI und Hind III, 4 μL Puffer B, 23 μL PCR-Produkt oder 5 μg pSP64 bzw. 5 μg pSP65 für 3 h bei 37°C in einem Endvolumen von 40 μL durchgeführt.

Im Anschluss an den Verdau wurde bei den linearisierten Vektormolekülen jeweils die 5'-Phosphatgruppe mit einer alkalischen Phosphatase abgespalten. Dies sollte bei der sich anschließenden Ligation verhindern, dass die Plasmidmoleküle mit sich selbst reagieren (Rezirkularisierung oder Oligomerisierung). Für die Reaktion wurden 40 μL der linearisierten DNA-Moleküle mit 1 μL der alkalischen Phosphatase sowie 5 μL des 10 x Phosphorylierungspuffers und 54 μL DEPC- H_2O für 30 min bei 56°C inkubiert. Nach einer erneuten Zugabe von 1 μL der alkalischen Phosphatase und einer weiteren Inkubation der Probe für 30 min bei 56°C, wurde der Ansatz schließlich mit 12 μL einer 100 mM EGTA-Lösung versetzt und erneut 30 min bei 65°C inkubiert, um die alkalische Phosphatase zu inaktivieren.

Die verdauten Vektormoleküle und die verdauten 665 bp-langen HCV-Inserts wurden schließlich über ein Gel in niedrig schmelzender Agarose aufgereinigt (siehe 3.15.2.1), im Photometer quantifiziert (siehe 3.19) und bei -20°C gelagert.

3.24.4 Ligation der HCV-Inserts in die Vektoren pSP64 und pSP65

Die Ligation der verdauten 665 bp-langen HCV-Inserts mit den hydrolysierten Vektorfragmenten, dargestellt in Abb. 3.24-1, erfolgte ebenfalls mit der T4 DNA-Ligase. Ein Ansatz wurde in einem Endvolumen von 50 μL durchgeführt und enthielt 0,3 pmol des linearisierten Vektormoleküles (pSP64 oder pSP65), 0,3 pmol/0,6 pmol/0,9 pmol des 665 bp-langen HCV-Inserts, 5 μL 10 x Ligase-Puffer, 5 μL BSA (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und 1 μL T4 DNA-Ligase. D.h. das Verhältnis der Konzentration von Vektor- zu Insert-DNA betrug 1:1, 1:2 oder 1:3. Die Ansätze wurden jeweils für 5 min bei 37°C, für 1 h bei RT und schließlich über Nacht bei 14°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die in der Ligrationsreaktion entstandenen rekombinanten Plasmide mit dem HCV-Insert (pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV}) waren, aufgrund der fehlenden terminalen Phosphatgruppe der Vektor-DNA, zunächst noch unvollständig. In der nachfolgenden Transformation von HB101-Zellen (siehe 3.24.5) wurden die Lücken dann durch die bakteriellen Enzyme geschlossen.

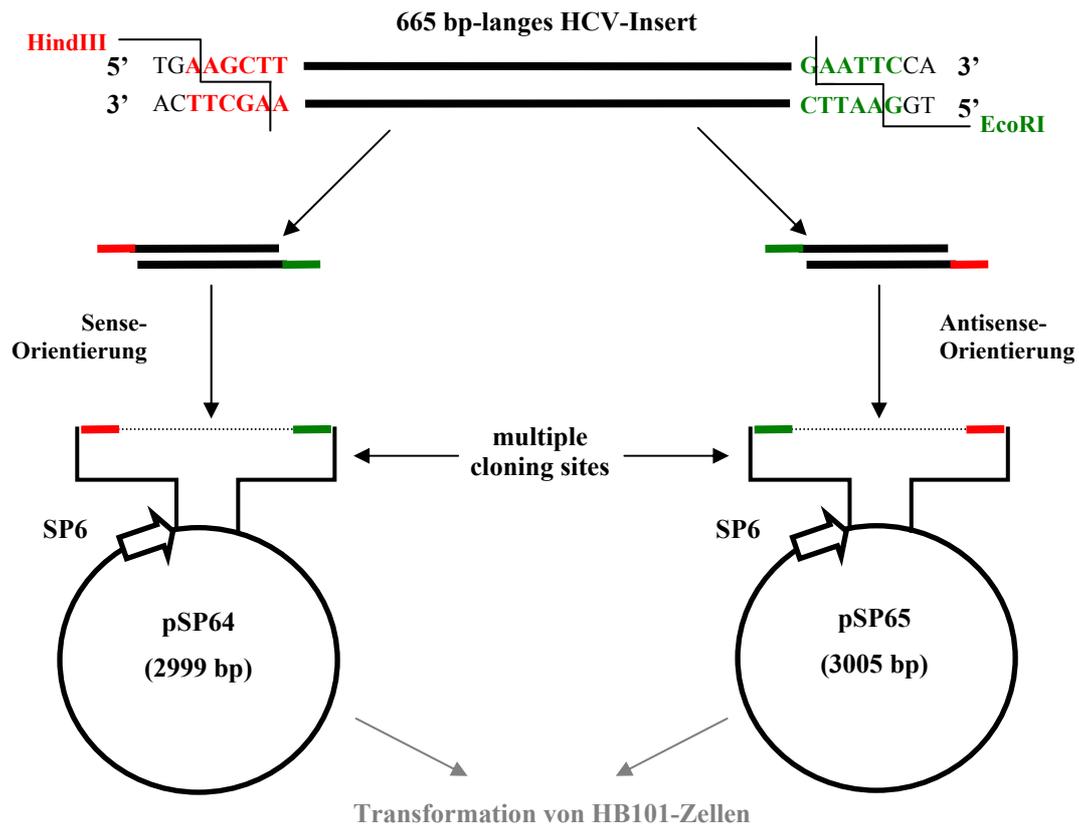


Abb. 3.24-1: Schematische Übersicht über die Herstellung der rekombinanten Plasmide pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV}. Dargestellt ist die Ligation eines 665 bp-langen HCV-Fragmentes aus der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides (p90/HCV) in die Vektoren pSP64 und pSP65.

3.24.5 Transformation und Amplifikation der rekombinanten Plasmide

Für die Amplifikation der rekombinanten Vektoren pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV} in HB101- und C₆₀₀-Zellen wurden die Bakterien zunächst aufgetaut und 10 min auf Eis gelagert. 20 µL des Ligationsansatzes aus 3.24.4 wurden mit 80 µL (40 µL) Bakteriensuspension gemischt, für 20 min auf Eis, für 2 min bei 42°C und wiederum für 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 320 µL (160 µL) LB⁺⁺-Medium wurden die Ansätze für 1 h im Thermoblock unter Schütteln bei 37°C inkubiert, auf Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert und schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienklone gepickt und in einer Übernachtskultur bei 37°C und 260 rpm auf dem Thermoschüttler in 3 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin vermehrt. In einer anschließenden Minipräparation (siehe 3.9) wurden die Klone über eine Restriktionsspaltung mit Eco RI und Hind III identifiziert (vgl. 3.24.3). Einige der Klone, die die gewünschte Plasmid-DNA mit dem HCV-Insert besaßen, wurden anschließend in einer Maxipräparation amplifiziert (siehe 3.10).

3.24.6 Kontrolle der Orientierung des HCV-Inserts in den rekombinanten Plasmiden

Eine Kontrolle der Orientierung des in den rekombinanten Plasmiden pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV} enthaltenen HCV-Inserts erfolgte über die PCR. Eingesetzt wurden Kombinationen des Sense-Primers AD 3, der direkt stromaufwärts vor dem SP6-Promotor der rekombinanten Plasmide bindet, mit dem Primer HCV trans-s bzw. HCV trans-as (siehe Tab. 3.24-1).

Tab. 3.24-1: Primerkombinationen zur Überprüfung der richtigen Orientierung des HCV-Inserts in den rekombinanten Plasmiden pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV}.

Ansatz	Vektor	Primer 1	Primer 2	Amplikon
1	pSP64 ^{rHCV}	HCV Trans-s	AD 3	Nein
2	pSP64 ^{rHCV}	HCV Trans-as	AD 3	Ja
3	pSP65 ^{rHCV}	HCV Trans-s	AD 3	Ja
4	pSP65 ^{rHCV}	HCV Trans-as	AD 3	Nein

Je 50 pmol Primer wurden mit 50 ng Template-DNA, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie 5 µL PCR-Puffer (10 x) auf ein Volumen von 49 µL gebracht. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95°C inkubiert, es erfolgte die Zugabe von 1 U Taq-Polymerase und 30 PCR-Zyklen mit folgenden Parametern: 1 min 95°C, 1 min 48°C und 1 min 72°C. Nach einer abschließenden Extension für 10 min bei 72°C wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.18) und begutachtet.

3.24.7 Linearisierung der rekombinanten Plasmide und Isolierung der Template-DNA über die PCR

Bevor die HCV-spezifischen Kontrolltranskripte über die *in vitro* Transkription hergestellt werden konnten, mussten die rekombinanten Vektoren pSP64/65 linearisiert werden (siehe 3.24.7.1). Gleichzeitig sollten kurze Templates direkt über die PCR aus pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV} isoliert werden, damit diese ebenfalls für die *in vitro* Transkription verwendet werden konnten (siehe 3.24.7.2). Die linearisierten Plasmide und die etwa 690 bp-langen PCR-Templates wurden schließlich in niedrig schmelzender Agarose elektrophoretisch aufgereinigt (siehe 3.15.2.1) und bei -20°C gelagert.

3.24.7.1 Linearisierung der rekombinanten Plasmide pSP64/65^{rHCV}

Die Spaltung der rekombinanten Plasmide erfolgte mit je 7 µg Plasmid-DNA (siehe 3.24.5), 3 µL Eco RI und 4 µL Puffer H (pSP64^{rHCV}) bzw. 3 µL Hind III und 4 µL Puffer B (pSP65^{rHCV}) in einem Endvolumen von 40 µL für 3 h bei 37°C.

3.24.7.2 Isolierung der Template-DNA über die PCR

Für die Isolierung der Templates in Sense-Orientierung aus dem pSP64^{rHCV} wurden der Sense-Primer AD 3 und der HCV trans-as verwendet. Zur Isolierung des Antisense-Templates aus pSP65^{rHCV} wurde der Primer AD 3 zusammen mit dem HCV trans-s eingesetzt (vgl. Tab. 3.24-1, Ansatz 2 und 3). Die PCR-Bedingungen entsprachen denen unter 3.24.6 genannten.

3.24.8 Herstellung der Kontrolltranskripte mittels *in vitro* Transkription

Zur Herstellung der Kontrolltranskripte in Sense- und Antisense-Orientierung wurden 5 µg der aufgereinigten HCV-cDNA der linearisierten Plasmide pSP64^{rHCV} und pSP65^{rHCV} oder 0,1 bzw. 1 µg der PCR-Templates aus 3.24.7 *in vitro* durch die SP6-RNA-Polymerase transkribiert. Ein Ansatz enthielt dabei folgende Bestandteile: 5 µg linearisiertes Plasmid bzw. 0,1-1 µg PCR-Template, 20 µL 5 x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT, je 0,5 mM ATP, UTP, CTP und GTP, 100 U RNasin und 40-100 U SP6-Polymerase.

Die Ansätze wurden mit DEPC-H₂O auf 100 µL aufgefüllt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Transkriptionsansätze wurden anschließend einem DNase-Verdau (siehe 3.20.1.2) sowie einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe 3.15.1). Die Produkte wurden elektrophoretisch kontrolliert (siehe 3.18) und im Photometer quantifiziert (siehe 3.19).

3.25 Hybrid-Detection-Assay

Der Hybrid-Detection-Assay (HDA) basiert auf der Hybridisierung von RNA-Molekülen mit einer 5'-biotinylierten, einzelsträngigen DNA-Sonde und der Detektion der entstandenen und anschließend immobilisierten DNA:RNA-Hybride durch einen Ap-gekoppelten anti-Hybrid-Antikörper (siehe Abb. 3.25-1).

Über den HDA wurde in dieser Arbeit nicht nur die Qualität der HCV-spezifischen Sonden mit den entsprechend konstruierten Kontrolltranskripten überprüft, sondern auch RNA-Extrakte HCV-transfizierter Zellen untersucht. Dafür wurde die HCV-spezifische Positivstrang- bzw. Negativstrang-Sonde zunächst mit einer entsprechenden Menge des jeweiligen Kontrolltranskriptes bzw. des zellulären RNA-Extraktes für 5 min bei 95°C inkubiert (wobei

ein Volumen von 15 μL nicht überschritten wurde). Die Ansätze wurden dann sofort auf Eis gestellt, mit 100 μL Hybridisierungspuffer versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer 25minütigen Inkubation der Proben bei 57°C im Thermomixer wurden von den Hybridisierungsansätzen jeweils 50 μL in zwei Kavitäten einer Streptavidin-beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben, die Platte mit Parafilm abgedeckt und für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem der Überstand anschließend auf einem Whatman-Papier dekantiert wurde, erfolgte die Zugabe von 50 μL des gebrauchsfertigen anti-Hybrid-Antikörpers pro Well und die Inkubation der Platte für weitere 30 min auf dem Schüttler. Die Wells wurden dann fünfmal mit Waschpuffer und einmal mit Mol.Bio-H₂O gewaschen, bevor jeweils 50 μL der Substratlösung zur Kavität der Mikrotiterplatte gegeben wurde. Die Ansätze wurden 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und schließlich im Lumineszenz-Counter ausgewertet.

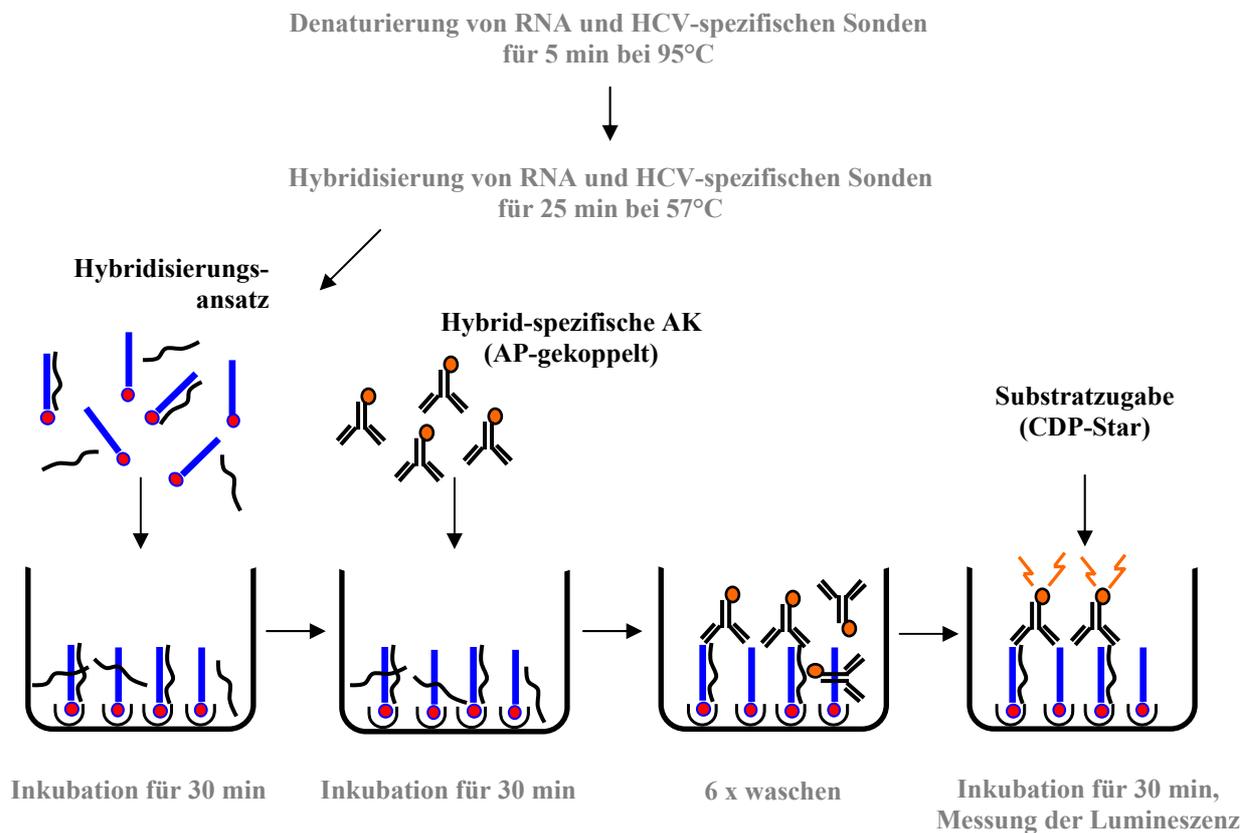


Abb. 3.25-1: Schematische Darstellung des Hybrid-Detection-Assays. (— : RNA; —● : biotinylierte ssDNA-Sonde; ∪ : Streptavidin).

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung einer PCR-unabhängigen Methode zum Nachweis des Positiv- und Negativstranges von HCV

Für die Etablierung einer PCR-unabhängigen Methode zur Detektion des HCV in Zellextrakten, wurde das Prinzip des Hybrid-Detection-Assays (HDA, vgl. 3.25) gewählt, das von SCHMITZ und DOTZAUER bereits erfolgreich zum Nachweis der RNA des Hepatitis A-Virus eingesetzt wurde (Schmitz & Dotzauer, 1998).

Das Prinzip des HDA beruht auf der Hybridisierung einer einzelsträngigen, biotinylierten DNA-Sonde mit der Target-RNA. Es mussten deshalb zunächst HCV-spezifische DNA-Sonden konstruiert werden, deren Spezifität dann mit ebenfalls synthetisch hergestellten HCV-spezifischen Kontrolltranskripten über den HDA kontrolliert werden sollte.

4.1.1 Herstellung HCV-spezifischer ssDNA-Sonden

Für die Konstruktion der HCV-spezifischen 5'-biotinylierten ssDNA-Sonden war es vorab erforderlich, eine geeignete Region aus der HCV-cDNA des infektiösen HCV-Plasmides (p90/HCV FL-long pU; vgl. 2.4.1) zu ermitteln. Im Anschluss daran wurde die entsprechende Template-DNA isoliert und die Sonden schließlich mittels der Run-Off-PCR synthetisiert.

4.1.1.1 Ermittlung und Isolierung des geeigneten Templates

Die geeignete Region zur Herstellung der Sonden wurde über das Computerprogramm Blast am NCBI ermittelt, indem der recht konservierte Bereich der 5'NTR/Core-Region des HCV-Suptyps 1a (Isolate H77; Blast-Zugangsnummer: NC_004102, gi: 22129792) mit den entsprechenden Sequenzen der Subtypen 1b, 2a, 2b und 3a verglichen wurde. Das Alignment ergab, dass eine 429 bp-lange Region des Virusgenoms, die von den Restriktionsschnittstellen Pin AI (nt 155) und Kpn I (nt 584) begrenzt wird (vgl. Abb. 3.23-1), zwischen den aufgeführten Subtypen sehr homolog ist und somit für die Konstruktion der HCV-spezifischen Sonden eingesetzt werden konnte (siehe Tab. 4.1-1).

Die 429 bp-lange Region wurde aus der HCV-cDNA des p90/HCV FL-long pU (kurz p90/HCV) über einen Restriktionsverdau mit Pin AI und Kpn I herausgeschnitten, über ein LMP-Agarosegel isoliert (gegebenenfalls noch aus dem Gel aufgereinigt; siehe 3.23.2) und als Template-DNA für die nachfolgende Run-Off-PCR (siehe 3.23.3) verwendet.

Die entsprechend notwendigen 5'-biotinylierten Sondenprimer wurden aus den Enden des 5'- bzw. 3'-Bereiches des 429 bp-langen Templates mittels des Primer 3-Programmes ausgewählt.

Tab. 4.1-1: Ergebnisse des Alignments eines 429 bp-langen Bereiches aus der 5'NTR/Core-Region des HCV-Subtyps 1a (H77) mit anderen HCV-Subtypen.

Alignment	Homologie in %	Blast-Zugangsnummer
HCV 1a gegen HCV 1b	95,3	AJ238799 (gi:5420376)
HCV 1a gegen HCV 2a	89,0	AF169005 (gi: 6707285)
HCV 1a gegen HCV 2b	88,6	AB030907 (gi: 9757541)
HCV 1a gegen HCV 3a	88,1	AF046866 (gi: 2895898)

Dargestellt sind die Homologien [%] der 429 bp-langen Sequenz des HCV-Subtyps 1a (Isolate H77; nt 155 - nt 584; Blast-Zugangsnummer: NC_004102; gi: 22129792) mit den entsprechenden Bereichen der Subtypen 1b, 2a, 2b und 3a. Das Alignment erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Blast am NCBI.

4.1.1.2 Synthese der Negativstrang-spezifischen Sense-Sonde über die Run-Off-PCR

Die Herstellung der HCV-spezifischen Sense-Sonde erfolgte zunächst mit je 15 µL Gelprobe des 429 bp-Templates in 40 PCR-Zyklen mit je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 200 pmol Primer Sonde-HCV-s, 10 µL 10 x PCR-Puffer, 4,2 U Taq-Polymerase und unterschiedlichen Annealing-Temperaturen. Die Abb. 4.1-1 zeigt dabei exemplarisch die Ergebnisse von zwei Run-Off-Ansätzen auf einem Gel, wobei die Annealing-Temperatur 65 bzw. 68°C betrug.

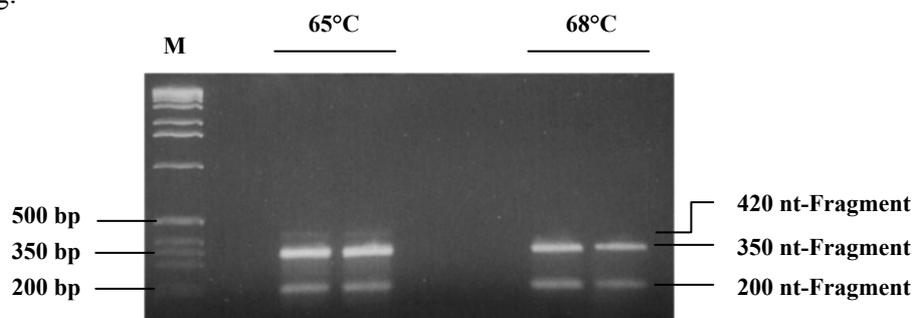


Abb. 4.1-1: Herstellung der HCV-spezifischen Sense-Sonde über die Run-Off-PCR. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängig voneinander initiiertes Ansätze im 2 %igen Agarosegel. In die PCR wurden je 15 µL Gelprobe des 429 bp-langen Templates, 10 µL PCR-Puffer, 200 µM pro dNTP, 200 pmol Sense-Primer und 4,2 U Taq-Polymerase eingesetzt. Die Parameter der 40 PCR-Zyklen waren in beiden Ansätzen gleich, lediglich die Annealing-Temperatur variierte zwischen 65 und 68°C. (M: Marker)

Es waren maximal drei Produkte unterschiedlicher Größe entstanden. Ein Produkt lief auf der Höhe der 200 bp-Bande des DNA-Größenmarkers (200 nt-Fragment), ein anderes Produkt war etwa bei 350 bp lokalisiert (350 nt-Fragment) und das dritte Produkt lag bei ungefähr 420 bp (420 nt-Fragment).

Da eigentlich nur ein PCR-Produkt erwartet wurde, erfolgte in weiteren Ansätzen der Versuch die Stringenz der Bedingungen der Run-Off-PCR zu verbessern. Es wurde u.a. die Annealing-Temperatur verändert, unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen getestet und teilweise sogenannte PCR-Beschleuniger, wie Triton X-100 und Tween 20, eingesetzt. Dabei schien lediglich eine leichte Erhöhung der Menge an MgCl₂ von 1,5 auf 2 mM und die Verwendung von Triton X-100 eine geringfügige Verbesserung zu bewirken (nicht dargestellt). Die Veränderung der Primer- und Templatekonzentration sowie die Zugabe anderer Beschleuniger hatte hingegen keinen bzw. einen negativen Effekt auf die Ergebnisse der Run-Off-PCR (nicht dargestellt). Es spielte auch keine Rolle, ob für die Synthese der Sense-Sonde das 429 bp-lange Template direkt aus dem Gel in die Run-Off-PCR eingesetzt oder vorher aus der Agarose aufgereinigt wurde (nicht dargestellt).

Die besten Resultate wurden schließlich mit je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 200 pmol Primer, 10 µL 10 x PCR-Puffer mit 2 mM MgCl₂, 4,2 U Taq-Polymerase, 0,1 % Triton X-100, einer Annealing-Temperatur von 68°C und 40 PCR-Zyklen erzielt. Dennoch entstanden auch unter diesen Run-Off-Bedingungen stets zwei (200 nt- und 350 nt-Fragment) bzw. drei Banden (200 nt-, 350 nt- und 420 nt-Fragment), d.h. die erzielten Ergebnisse waren mit denen der Abb. 4.1-1 vergleichbar.

Aufgrund der Tatsache, dass die Grundvoraussetzung für die Spezifität der Sonde ihre Einzelsträngigkeit ist, musste im folgenden überprüft werden, welches der entstandenen Run-Off-Produkte tatsächlich einzelsträngig vorlag. Zu diesem Zweck wurden die Amplikons aus der Run-Off-PCR (vgl. Abb. 4.1-1) und einzeln isolierte Produkte (350 nt- und 200 nt-Fragment) entweder mit denaturierendem Probenpuffer aufgetragen (siehe Abb. 4.1-2) oder einem Restriktionsverdau mit Stu I bzw. Sma I unterzogen (siehe Abb. 4.1-3).

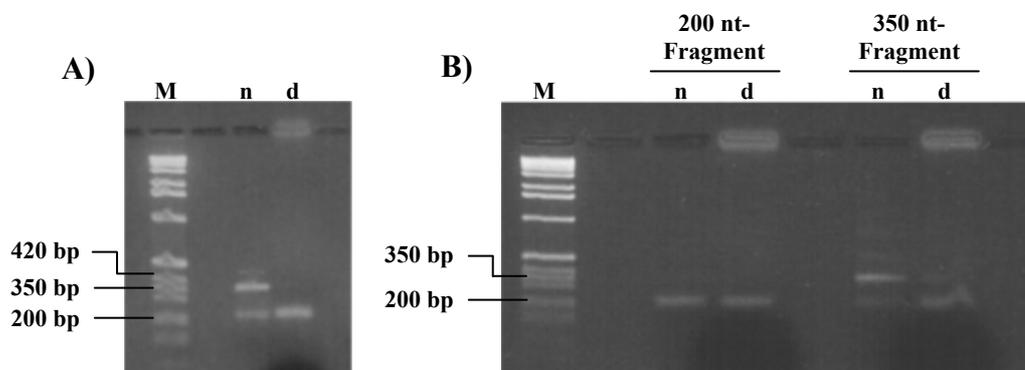


Abb. 4.1-2: Kontrolle der Einzelsträngigkeit der Run-Off-Produkte über eine Gelelektrophorese mit denaturierendem Probenpuffer. Dargestellt sind die Produkte aus einer Run-Off-PCR im 2 %igen Agarosegel, aufgetragen mit normalen (n) oder denaturierendem (d) Probenpuffer. (A) Amplikons aus einer Run-Off-PCR direkt aufgetragen. (B) 200 nt- und 350 nt-Fragment einer Run-Off-PCR nach einer Gelelektrophorese in niedrig schmelzender Agarose ausgeschnitten, aufgereinigt und aufgetragen. (M: Marker)

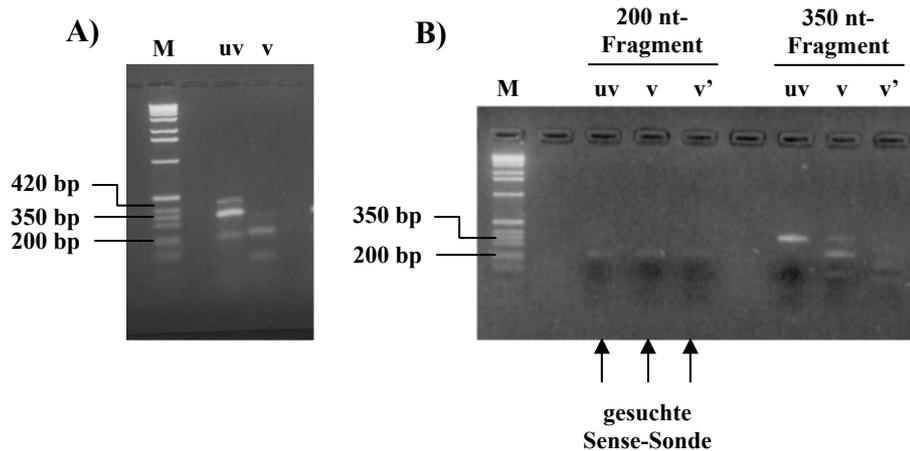


Abb. 4.1-3: Kontrolle der Einzelsträngigkeit der aufgereinigten Run-Off-Produkte über einen Verdau mit Restriktionsenzymen. Dargestellt sind die Produkte aus einer Run-Off-PCR im 2 %igen Agarosegel. Die Produkte wurden entweder unverdaut (uv) oder nach einem Stu I- (v) bzw. Sma I-Verdau (v') aufgetragen. (A) Amplikons aus einer Run-Off-PCR direkt aufgetragen. (B) 200 nt- und 350 nt-Fragment einer Run-Off-PCR nach einer Gelelektrophorese in niedrig schmelzender Agarose ausgeschnitten, aufgereinigt und aufgetragen. (M: Marker)

Anhand der Abb. 4.1-2B ist zu erkennen, dass das Run-Off-Produkt auf Höhe der 200 bp-Bande des DNA-Größenmarkers (200 nt-Fragment) sein Laufverhalten im Agarosegel, im Gegensatz zum 350 nt- (siehe Abb. 4.1-2B) bzw. 420 nt-langen Fragment (siehe Abb. 4.1-2A), durch eine Denaturierung nicht verändert hat. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch eine zusätzlich durchgeführte Restriktionsenzymsspaltung der Run-Off-Produkte. Während die 350 nt- und 420 nt-langen Fragmente ihr Laufverhalten im Gel veränderten (siehe Abb. 4.1-3A und Abb. 4.1-3B), wurde das 200 nt-Fragment durch Stu I bzw. Sma I nicht verdaut (siehe Abb. 4.1-3B).

Demnach handelte es sich beim 200 nt-langen Fragment aus der Run-Off-PCR um die gesuchte einzelsträngige HCV-Sense-Sonde.

4.1.1.3 Synthese der Positivstrang-spezifischen Antisense-Sonde über die Run-Off-PCR

Für die Herstellung der HCV-spezifischen Antisense-Sonde wurde ähnlich verfahren wie bei der Synthese der Sense-Sonde. Mit Hilfe der Bedingungen der Ausgangs-PCR aus 4.1.1.2 entstand dabei zunächst ein Produkt auf Höhe von etwa 360 bp des DNA-Größenmarkers (360 nt-Fragment, nicht dargestellt). Bei dem 360 nt-Fragment handelte es sich aber nicht um die gesuchte einzelsträngige Antisense-Sonde, da das Molekül mit den Restriktionsenzymen Stu I und Sma I gespalten werden konnte (nicht dargestellt). In weiteren Run-Off-Ansätzen wurden daher nicht nur die Synthesebedingungen (Annealing-Temperatur und Zyklenzahl) verändert, sondern auch die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes stark variiert. U.a. wur-

den unterschiedliche Konzentrationen an $MgCl_2$, Template-DNA und PCR-Beschleuniger eingesetzt. Die Abb. 4.1-4 zeigt dabei exemplarisch die Ergebnisse verschiedener Run-Off-Ansätze auf zwei Elektrophoresegelel, wobei der jeweilige PCR-Ansatz einmal unverdaut (uv) und einmal nach einem Verdau mit *Stu* I (v) aufgetragen wurde.

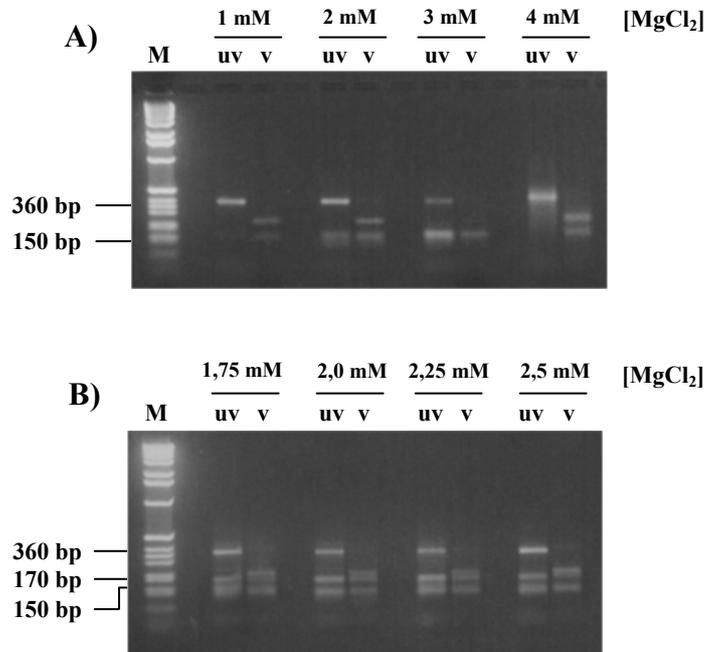


Abb. 4.1-4: Herstellung der HCV-spezifischen Antisense-Sonde über die Run-Off-PCR. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mehreren unabhängig voneinander initiierten Ansätzen im 2 %igen Agarosegel. In die PCR wurden je 15 μ L Gelprobe des 429 bp-langen Templates, 10 μ L PCR-Puffer mit $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1-4 mM, 200 μ M pro dNTP, 200 pmol Antisense-Primer, 0,1 % Triton X-100 und 4,2 U Taq-Polymerase eingesetzt. Die Parameter der 40 PCR-Zyklen waren in beiden Ansätzen gleich, lediglich die Annealing-Temperatur variierte. Bei (A) betrug sie 72°C und bei (B) 68°C. Die Produkte aus einem Ansatz wurden entweder unverdaut (uv) oder nach einem anschließenden *Stu* I-Verdau (v) aufgetragen. (M: Marker)

Es waren meist mehrere PCR-Produkte sichtbar (360 nt-, 170 nt- und 150 nt-Fragment auf Höhe von 360, 170 und 150 bp des DNA-Markers), wobei das 360 nt-Fragment deutlich durch den Restriktionsverdau gespalten wurde (siehe Abb. 4.1-4A und B). Nicht eindeutig zu erkennen war, ob die 170 nt- bzw. die 150 nt-Fragmente ebenfalls abgebaut wurden, da die verdauten Fragmente der 360iger Bande etwa auf deren Höhe lagen. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Produkte aus dem LMP-Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und auf einem Agarosegel mit normalem und denaturierendem Probenpuffer aufgetragen. Es zeigte sich, dass sowohl das 150 nt-lange Fragment, als auch das 170 nt-Fragment sein Laufverhalten im Agarosegel mit einem denaturierenden Probenpuffer veränderte (nicht dargestellt). Demnach handelte es sich weder beim 360 nt-Fragment noch bei den anderen beiden Produkten um die gesuchte einzelsträngige Antisense-Sonde.

Nachdem die bisherigen Versuche die Antisense-Sonde herzustellen gescheitert waren, wurde das 429 bp-lange Template gegen ein 665 bp-langes HCV-Insert ausgetauscht, das eigentlich für die Herstellung der Kontrolltranskripte vorgesehen war (vgl. 3.24.2). Aber auch mit diesem neuen Template gelang es in verschiedenen Ansätzen über die Run-Off-PCR zunächst nicht, die ssDNA-Sonde in Antisense-Orientierung zu synthetisieren (nicht dargestellt).

Schließlich wurde versucht die Antisense-Sonde mit Hilfe eines neuen Primers (SHCV AS/588) herzustellen, der etwas weiter stromabwärts im 665 bp-langen Template bindet als der zuvor eingesetzte Sondenprimer (Sonde HCV-as). Gleichzeitig wurde verglichen, welchen Einfluss es hat, wenn man statt der zuletzt verwendeten Taq-Polymerase die thermostabile Tth-Polymerase verwendet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 4.1-5 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass, je nach verwendetem Enzym, unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen unterschiedliche Produkte entstanden waren. Beim Gebrauch der Taq-Polymerase und dem Primer Sonde HCV-as beispielsweise konnten die bereits beschriebenen Fragmente mit einer Länge von 150, 170 und 360 nt beobachtet werden (siehe Abb. 4.1-5; Spur 1n). Im Gegensatz dazu entstand bei der Verwendung der Tth-Polymerase nur ein Produkt auf Höhe von etwa 250 bp des DNA-Größenmarkers, das sein Laufverhalten nicht durch den denaturierenden Probenpuffer änderte (250 nt-Fragment, siehe Abb. 4.1-5; Spur 2n und 2d). Ähnliche Ergebnisse lieferten die Resultate der Run-Off-PCR mit dem Primer SHCV AS/588 und der Tth-Polymerase. Hier entstand ein Produkt auf Höhe von ca. 270 bp, das ebenfalls nicht denaturiert werden konnte (270 nt-Fragment, siehe Abb. 4.1-5; Spur 4n und 4d).

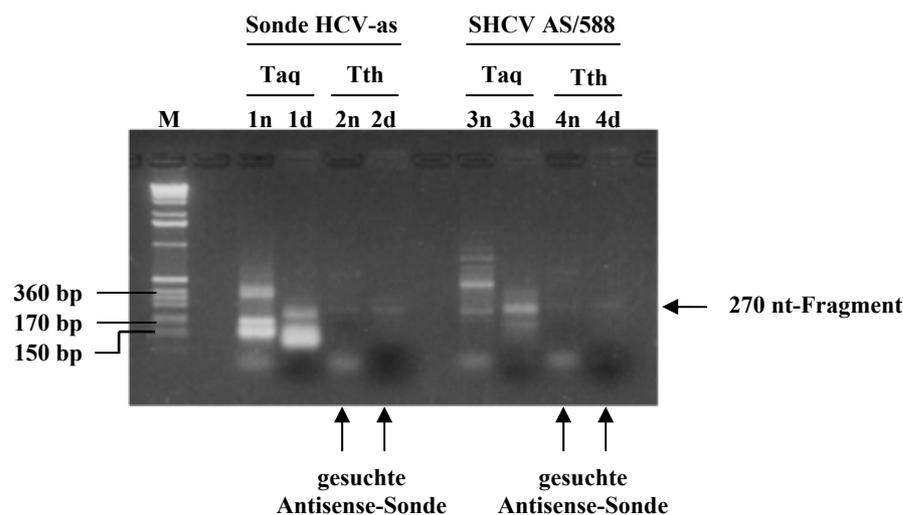


Abb. 4.1-5: Herstellung der HCV-spezifischen Antisense-Sonde über die Run-Off-PCR. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mehreren unabhängig voneinander initiierten Ansätzen im 2 %igen Agarosegel. In die PCR wurden je 50 ng des 665 bp-langen HCV-Inserts als Template, 10 µL PCR-Puffer, 200 µM pro dNTP, 200 pmol Antisense-Primer (Sonde HCV-as oder SHCV AS/588) und 4,2 U Taq- oder 5 U Tth-Polymerase eingesetzt. Die Parameter der 40 PCR-Zyklen waren in allen Ansätzen gleich, die Annealing-Temperatur betrug 70°C. Die Produkte aus einem Ansatz wurden entweder mit normalem (n) oder mit denaturierendem Probenpuffer (d) aufgetragen. (M: Marker)

Demnach handelte es sich sowohl beim 250 nt- als auch beim 270 nt-langen Fragment (siehe Abb. 4.1-5; Spur 2n, 2d und 4n, 4d) um die gesuchte einzelsträngige Antisense-Sonde. Diese konnte aber nur mit Hilfe der Tth-DNA-Polymerase synthetisiert werden. Der Gebrauch der Taq-Polymerase führte hingegen unter annähernd identischen Versuchsbedingungen zu keinem verwertbaren Ergebnis (siehe Abb. 4.1-5; Spur 1n, 1d und 3n, 3d).

Insgesamt gesehen war es somit gelungen, HCV-spezifische einzelsträngige und 5'-biotinylierte Sense- und Antisense-Sonden zu konstruieren.

4.1.2 Herstellung HCV-spezifischer Kontrolltranskripte

Um die Spezifität der HCV-spezifischen Sonden aus 4.1.1 im HDA überprüfen zu können, mussten entsprechende RNA-Transkripte (Kontrolltranskripte) in Sense- und Antisense-Orientierung konstruiert werden, die den kompletten Bereich der HCV-Sonden umfassten. Zu diesem Zweck wurde ein 665 bp-langes Insert aus der 5'NTR/Core-Region der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides p90/HCV isoliert (siehe 3.24.2). Dann wurde das Insert in die Vektoren pSP64 bzw. pSP65 ligiert und somit unter die Kontrolle des SP6-Promotors gebracht (siehe 3.24.4). Interessanterweise verlief dabei die Ligation von Insert und Vektor mit den vorab ligierten (Blunt End Ligation, siehe 3.24.2) und anschließend degradierten HCV-Inserts deutlich erfolgreicher als eine Ligation, bei der die unligierten Inserts verwendet wurden.

Nachdem die rekombinanten Plasmide in einer Maxipräparation amplifiziert (siehe 3.24.5) und die Orientierung des Inserts über eine PCR überprüft wurde (vgl. 3.24.6), erfolgte schließlich die *in vitro* Transkription (siehe 3.24.8). Dabei gelang es sowohl mit den linearisierten rekombinanten Vektoren als auch mit den entsprechend über die PCR isolierten Templates, HCV-spezifische Kontrolltranskripte in positiver (Sense-Transkript) und negativer Polarität (Antisense-Transkript) herzustellen.

4.1.3 Untersuchung der Spezifität und Sensitivität der HCV-spezifischen Sonden

Für die Überprüfung der Spezifität und Sensitivität der hergestellten Sense- und Antisense-Sonden wurden diese mit unterschiedlichen Mengen der synthetisch hergestellten HCV-spezifischen Kontrolltranskripte aus 4.1.2 hybridisiert und die entstandenen DNA:RNA-Hybride über den HDA (siehe 3.25) nachgewiesen. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mitgeführt, die statt der HCV-spezifischen Kontrolltranskripte nur Wasser enthielten, ansonsten aber genau wie die übrigen Ansätze behandelt wurden (Substratkontrolle).

Bei den angegebenen Lumineszenzwerten handelt es sich um einen Mittelwert aus zwei Parallelansätzen derselben Probe eines HDA. Die angegebenen Werte sind dabei um den jeweils höchsten Wert der mitgeführten Negativkontrollen korrigiert.

4.1.3.1 Überprüfung der Spezifität der HCV-Sense-Sonden

Zunächst wurde die Spezifität von zwei HCV-spezifischen Sense-Sonden überprüft, die in unabhängig voneinander initiierten Run-Off-PCR-Ansätzen synthetisiert und über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem LMP-Gel aufgereinigt wurden (Sonde S/200-1 und S/200-2). 50 fmol der Sense-Sonde wurden dafür in getrennten Ansätzen mit je 250 fmol der Kontrolltranskripte beider Polaritäten inkubiert. Die Tab. 4.1-2 zeigt die Ergebnisse von zwei eigenständig initiierten HDA.

Tab. 4.1-2: Überprüfung der Spezifität der HCV Sense-Sonden S/200-1 und S/200-2 über den HDA.

HDA	Sonde [50 fmol]	Kontrolltranskript [250 fmol]	LCPS/100	Kreuzreaktion der Sonde in %
1	S/200-1	Sense-Transkript	0	0
		Antisense Transkript	56.000	
2	S/200-1	Sense-Transkript	0	0
		Antisense Transkript	50.273	
	S/200-1	Sense-Transkript/PCR	0	0
		Antisense-Transkript/PCR	68.802	
	S/200-2	Sense-Transkript	0	0
		Antisense Transkript	14.787	

50 fmol der Sense-Sonden wurden mit 250 fmol des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 1416cx97 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (HDA1: 444 LCPS/100; HDA2: 450 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. Die Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit dem Sense-Transkript ist als Kreuzreaktion in % angegeben.

Beide Sense-Sonden waren außerordentlich spezifisch für das Antisense-Transkript und es kam zu keinen Kreuzreaktionen mit dem Kontrolltranskript in positiver Polarität. Die maximalen Lumineszenzwerte der S/200-1-Sonde lagen mit 50.273 LCPS/100 dabei um mehr als das dreifache höher als der Wert der S/200-2-Sonde von 14.787 LCPS/100. Außerdem erreichte die S/200-1-Sonde mit den Kontrolltranskripten in Antisense-Orientierung, die mit Hilfe des PCR-Templates hergestellt wurden (Antisense-Transkripte/PCR; vgl. 3.24.2), mit 68.802 LCPS/100 noch einmal einen über 20 % höheren Wert, als die vergleichbaren Transkripte aus der *in vitro* Transkription mit dem linearisierten pSP65^{rHCV}. Für die nachfol-

genden Versuche wurden daher nur noch die Kontrolltranskripte verwendet, die mit den PCR-Templates synthetisiert wurden.

Um zu testen, ob die Spezifität der Sonden auch noch bei einer deutlich geringeren Konzentration von Sonde und Kontrolltranskript erhalten bleibt, wurde ein weiterer HDA durchgeführt. Neben der Sonde S/200-1 und S/200-2 wurde dabei eine dritte Sonde eingesetzt (S/200-3), die ebenfalls über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt worden war.

Wie man anhand der Tab. 4.1-3 erkennen kann, fiel der gemessene Lumineszenzwert nach der Hybridisierung von nur 10 fmol Sense-Sonde S/200-1 und 25 fmol Antisense-Transkript mit 19.909 LCPS/100 erwartungsgemäß niedriger aus, als der entsprechende Wert aus dem ersten Versuchsansatz (vgl. Tab. 4.1-2). Die Messwerte waren dabei aber, trotz der Verwendung von drei unterschiedlichen Sonden, recht einheitlich (19.650 bis 22.679 LCPS/100). Auch die Spezifität war in diesem Ansatz bei allen eingesetzten Sonden wieder sehr hoch und lag mit maximal 0,45 % weit unter einem Prozent.

Tab. 4.1-3: Überprüfung der Spezifität verschiedener HCV Sense-Sonden über den HDA.

Sonde [10 fmol]	Kontrolltranskript [25 fmol]	LCPS/100	Kreuzreaktion der Sonde in %
S/200-1	Sense-Transkript	9	0,05
	Antisense Transkript	19.909	
S/200-2	Sense-Transkript	0	0
	Antisense Transkript	22.679	
S/200-3	Sense-Transkript	88	0,45
	Antisense Transkript	19.650	

10 fmol der Sense-Sonden wurden mit 25 fmol des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 1416cx97 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (120 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. Die Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit dem Sense-Transkript ist als Kreuzreaktion in % angegeben.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Sense-Sonden, die über eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt wurden, sehr spezifisch für ihr Antisense-Transkript waren, sollte nun getestet werden, ob eine Isolierung der Sense-Sonden über einen Kit möglicherweise mit einer höheren Ausbeute bei gleichbleibender Spezifität verbunden wäre. Im nachfolgenden HDA wurden daher zwei Sense-Sonden überprüft, die ebenfalls unabhängig voneinander synthetisiert und über einen Kit der Firma Qiagen aus dem Gel aufgereinigt wurden (S/200-Q1 und S/200-Q2). Außerdem kam ein neuer Anti-Hybrid-Antikörper zum Einsatz (Lot.-Nr.: 5366cx01), der in einem Vorversuch mit diesen Sonden zu deutlich höheren Lumines-

zenzwerten führte als bisher (nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurde, neben der Überprüfung der Qualität der neuen Sense-Sonden, gleichzeitig der Versuch unternommen, die Sondenkonzentrationen zu optimieren, um eine Kreuzreaktion mit dem Sense-Transkript so gering wie möglich zu halten. Als Referenzwert zu den bisherigen Versuchen wurden zusätzlich je 10 fmol der Sonde S/200-3 mit jeweils 25 fmol der Kontrolltranskripte hybridisiert (siehe Tab. 4.1-4).

Tab. 4.1-4: Überprüfung der Spezifität verschiedener HCV Sense-Sonden über den HDA.

Sonde	Eingesetzte Sondenmenge	Kontrolltranskript [25 fmol]	LCPS/100	Kreuzreaktion der Sonde in %
S/200-3	10 fmol	Sense-Transkript	484	0,54
	10 fmol	Antisense Transkript	89.434	
S/200-Q1	5 fmol	Sense-Transkript	7847	3,95
	5 fmol	Antisense Transkript	198.581	
S/200-Q2	5 fmol	Sense-Transkript	7686	3,69
	5 fmol	Antisense Transkript	208.036	
S/200-Q1	4 fmol	Sense-Transkript	5826	2,92
	4 fmol	Antisense Transkript	199.431	
S/200-Q2	4 fmol	Sense-Transkript	4686	2,19
	4 fmol	Antisense Transkript	214.165	
S/200-Q1	3 fmol	Sense-Transkript	5991	3,21
	3 fmol	Antisense Transkript	186.786	
S/200-Q2	3 fmol	Sense-Transkript	2962	1,54
	3 fmol	Antisense Transkript	192063	
S/200-Q1	2 fmol	Sense-Transkript	1579	1,65
	2 fmol	Antisense Transkript	95.971	
S/200-Q2	2 fmol	Sense-Transkript	806	0,52
	2 fmol	Antisense Transkript	154.995	

Je 25 fmol der Kontrolltranskripte wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Sonden hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/ 100), wobei der Wert der Substratkontrolle (87 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. Die Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit dem Sense-Transkript ist als Kreuzreaktion in % angegeben.

Betrachtet man sich zunächst das Ergebnis der S/200-3-Sonde fällt auf, dass die gemessene Lumineszenz von 89.434 LCPS/100 deutlich höher ausgefallen war als der Wert, der mit der gleichen Sonde und dem Antikörper der Lot.-Nr. 1416cx97 im vorangegangenen HDA erzielt

wurde (vgl. Tab. 4.1-3). D.h. die Qualität des neu erworbenen Antikörpers war anscheinend um ein vielfaches besser als die des zuletzt verwendeten Antikörpers.

Interessant war zudem der Vergleich der S/200-3-Sonde mit den über den Kit aufgereinigten Sonden (S/200-Q1 und S/200-Q2). Bei der Hybridisierung von 3-5 fmol der S/200-Q1 bzw. S/200-Q2 mit je 25 fmol Antisense-Transkript waren die absoluten Lumineszenzwerte mit etwa 200.000 LCPS/100 mehr als doppelt so hoch als der Wert, der mit 10 fmol der Sonde S/200-3 (89.434 LCPS/100) erzielt wurde. Selbst bei einer Reduktion der Sondenkonzentration auf 2 fmol waren die absoluten Lumineszenzwerte beim Einsatz der S/200-Q2 (154.995 LCPS/100) im Vergleich zur S/200-3 noch deutlich höher. Die Kreuzreaktion der über den Kit aufgereinigten Sonden lag bei der eingesetzten Sondenmenge von 5 fmol aber auch mit annähernd 4 % deutlich über den bisherigen Werten. Durch eine Verringerung der Sondenkonzentration auf 3 fmol konnte aber die Kreuzreaktion der Sonde S/200-Q2 auf unter 2 % reduziert werden. Bei der Verwendung von 2 fmol S/200-Q2 betrug die Kreuzreaktion sogar nur noch 0,52 % und lag somit annähernd bei den Werten der S/200-3-Sonde.

In weiteren Versuchen, die Sondenkonzentration der S/200-Q1 und S/200-Q2 zu optimieren, stellte sich heraus, dass es bezüglich der Fehlhybridisierung keinen Unterschied machte, ob 2 oder 2,5 fmol der jeweiligen Sonde verwendet wurden. Die Kreuzreaktionen schwankten beim Einsatz von jeweils 25 fmol Sense-Transkript zwischen 0,5 und 2,3 % (nicht dargestellt). Die Sonde S/200-Q2 lieferte dabei stets die besseren Ergebnisse mit einer Kreuzreaktion von maximal 1,8 % (nicht dargestellt).

Insgesamt gesehen waren alle hergestellten HCV-spezifischen Sense-Sonden also von guter Qualität. Dennoch wurden für die weiteren Hybrid-Detection-Assays nur noch die S/200-1 und S/200-3 sowie die S/200-Q2 eingesetzt.

4.1.3.2 Überprüfung der Spezifität der HCV-Antisense-Sonden

Die Überprüfung der Spezifität der HCV-spezifischen Antisense-Sonden (AS/normal und AS/588; siehe 4.1.1.3), erfolgte mit jeweils 5 fmol Sonde und 2,5 fmol der entsprechenden Kontrolltranskripte. Die Konzentration der Sonden wurde in Anlehnung an die Ergebnisse aus 4.1.3.1 gewählt, da beide Sonden über den Kit der Firma Qiagen aufgereinigt wurden. Die Menge der Kontrolltranskripte wurde reduziert, weil davon ausgegangen werden konnte, dass auch beim Einsatz von nur 2,5 fmol Sense-Transkript noch hohe Lumineszenzwerte erzielt werden.

Tab. 4.1-5: Überprüfung der Spezifität der HCV Antisense-Sonden über den HDA.

Sonde [5 fmol]	Kontrolltranskript [2,5 fmol]	LCPS/100	Kreuzreaktion der Sonde in %
AS/normal	Antisense Transkript	212	0,33
	Sense-Transkript	63.749	
AS/588	Antisense Transkript	87	0,20
	Sense-Transkript	42.813	

5 fmol der Antisense-Sonden wurden mit 2,5 fmol des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (31 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. Die Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit dem Sense-Transkript ist als Kreuzreaktion in % angegeben.

Die Ergebnisse, dargestellt in der Tab. 4.1-5, zeigen, dass beide Antisense-Sonden außerordentlich spezifisch für das Sense-Transkript waren. Mit Werten von 42.813 (AS/588) und 63.749 LCPS/100 (AS/normal), gegenüber den Lumineszenzen mit dem Kontrolltranskript in negativer Polarität von 87 (AS/588) und 212 LCPS/100 (AS/normal), lag die Fehlhybridisierung in beiden Fällen deutlich unter 1 %. D.h. beide Sonden waren für die weitere Verwendung im HDA gut geeignet.

4.1.3.3 Überprüfung der Sensitivität der HCV-spezifischen Sonden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die hergestellten HCV-spezifischen Sense- (S/200-1, S/200-2, S/200-3 und S/200-Q2) und Antisense-Sonden (AS/588 und AS/normal) eine hohe Spezifität für ihr entsprechendes Kontrolltranskript besaßen, sollte nun untersucht werden, wie sensitiv die verschiedenen Sonden waren. Dafür wurden exemplarisch zwei Sense- (S/200-1 und S/200-Q2) sowie eine Antisense-Sonde (AS/588) mit unterschiedlichen Mengen an Kontrolltranskripten inkubiert und das Ausmaß der Hybridisierung über den HDA ausgewertet. Die eingesetzte Konzentration der verwendeten Sonden richtete sich jeweils nach den Erkenntnissen aus 4.1.3.1 und 4.1.3.2. Die Resultate sind in den Abb. 4.1-6 bis Abb. 4.1-8 dargestellt. Dabei wurde ein Ergebnis noch als positiv bewertet, wenn der Lumineszenzwert aus der Hybridisierung der jeweiligen Sonde mit dem entsprechend komplementären Transkript doppelte so groß war wie der höchste Lumineszenzwert der mitgeführten Kontrolle mit dem jeweils falschen Kontrolltranskript.

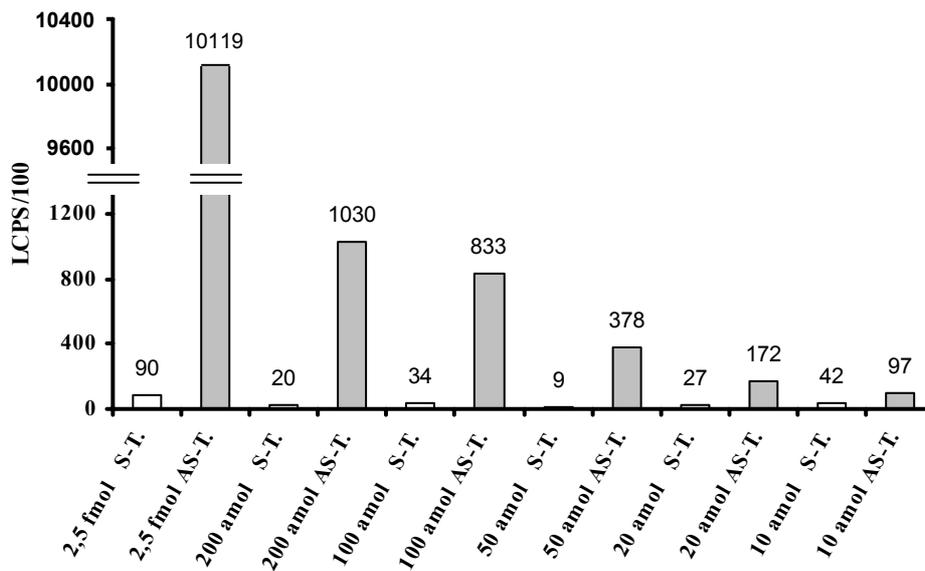


Abb. 4.1-6: Überprüfung der Sensitivität der HCV-Sense-Sonde S/200-1 über den HDA. 10 fmol der Sense-Sonde wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 1416cx97 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (68 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript).

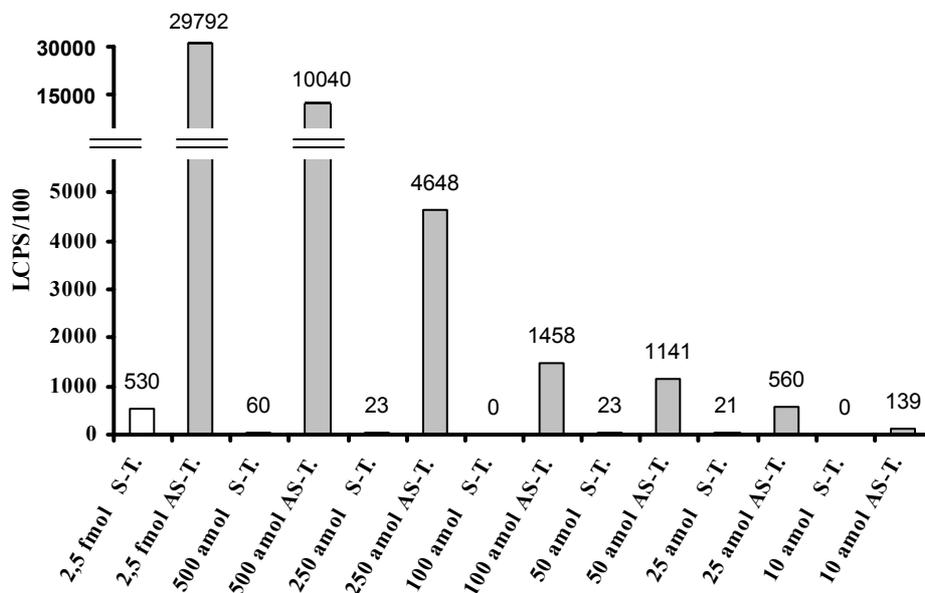


Abb. 4.1-7: Überprüfung der Sensitivität der HCV-Sense-Sonde S/200-Q2 über den HDA. 2,5 fmol der Sense-Sonde wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle bei null lag. (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript).

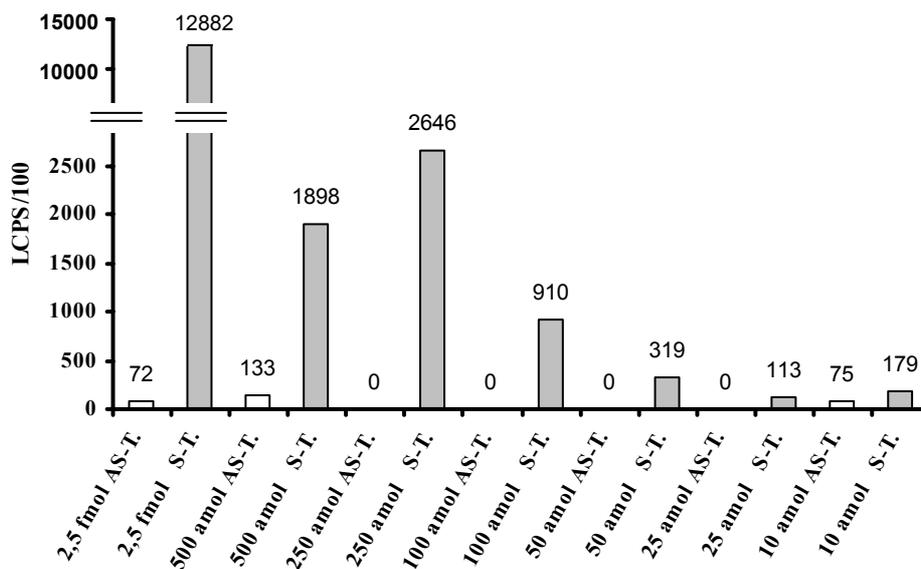


Abb. 4.1-8: Überprüfung der Sensitivität der HCV-Antisense-Sonde AS/588 über den HDA. 5 fmol der Antisense-Sonde wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Kontrolltranskriptes hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle bei null lag. (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript).

Anhand der Abb. 4.1-6 ist zu erkennen, dass die Nachweisgrenze der Sense-Sonde S/200-1 für die Detektion des Antisense-Transkriptes zwischen 20 und 50 amol lag. Nach der Hybridisierung der S/200-1 mit 2,5 fmol des Transkriptes in gleicher Orientierung wurde hier nämlich eine Lumineszenz von 90 LCPS/100 gemessen, so dass das Signal von 172 LCPS/100 beim Nachweis von 20 fmol Antisense-Transkript als negativ bewertet werden musste. Mit der Antisense-Sonde AS/588 konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Hier lag die Nachweisgrenze etwa zwischen 25 und 50 amol (siehe Abb. 4.1-8). Die Sense-Sonde S/200-Q2 besaß hingegen nur eine Sensitivität von ungefähr 50 amol, da hier der Lumineszenzwert der Negativkontrolle (2,5 fmol Sense-Sonde hybridisiert mit 2,5 fmol des Sense-Transkriptes) mit 530 LCPS/100 sehr hoch ausgefallen war (siehe Abb. 4.1-7).

Dennoch erwiesen sich die HCV-spezifischen Sense- und Antisense-Sonden nicht nur als sehr spezifisch für das entsprechende Kontrolltranskript, sondern auch als äußerst sensitiv.

4.1.4 Kontrolle der Spezifität und Sensitivität der konstruierten Sonden nach Zusatz von zellulärer bzw. viraler RNA

Beim Nachweis des Positiv- und Negativstranges von HCV in RNA-Extrakten verschiedener Zellen über den HDA ist, neben einem komplexen Gemisch an zellulären RNAs, bei der Detektion des Replikationsintermediates auch mit einem recht großen Überschuss an HCV-Positivstrang zu rechnen (Lerat et al., 1996; Craggs et al., 2001). In weiteren Versuchen

musste daher getestet werden, ob sich diese Faktoren auf die ermittelte Spezifität und Sensitivität der konstruierten Sonden auswirken könnten.

Zuerst wurde überprüft, ob die Sonden eventuell mit zellulärer RNA oder dem HCV-Positivstrang, isoliert aus der Plasmaprobe Nr. 4, unspezifisch reagieren. In einem ersten Vorversuch mit der S/200-1-Sonde kam es dabei weder mit 3 µg zellulärer RNA, noch mit 3 µg HCV-RNA zu einer Kreuzreaktion. Der absolute Lumineszenzwert der Sense-Sonde mit dem Antisense-Transkript war aber nach der Zugabe von zellulärer RNA insgesamt um das vierfache geringer als ohne RNA (nicht dargestellt).

Fehlhybridisierungen der Sonden mit zellulärer oder viraler RNA konnten jedoch nicht immer vermieden werden, was anhand der Ergebnisse von drei weiteren HDA zu erkennen ist, die in der Tab. 4.1-6 zusammengefasst sind.

Tab. 4.1-6: Kontrolle der Fehlhybridisierung der Sonden S/200-3, S/200-Q2 und AS/588 mit zellulärer oder viraler RNA über den HDA.

HDA	Sonde	Probe	LCPS/100	Kreuzreaktion der Sonde in %
1	S/200-3 [10 fmol]	1 µg RNA/U937	468	2,7
		1 µg RNA/U937 + 2,5 fmol AS-T.	17.516	
		1 µg HCV-RNA	46	0,3
		1 µg HCV-RNA + 2,5 fmol AS-T.	15.622	
2	S/200-Q2 [2,5 fmol]	1 µg RNA/FRhK4	0	0
		1 µg RNA/FRhK4 + 2,5 fmol S-T.	0	0
		1 µg RNA/FRhK4 + 2,5 fmol AS-T.	11.375	
3	AS/588 [5 fmol]	1 µg RNA/FRhK4	227	0,7
		1 µg RNA/FRhK4 + 2,5 fmol AS-T.	295	0,9
		1 µg RNA/FRhK4 + 2,5 fmol S-T.	33.876	

Die Sonden wurden mit 1 µg zellulärer RNA aus FRhK4-Zellen bzw. U937-Zellen oder 1 µg HCV-RNA der Plasmaprobe Nr. 4 hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (HDA 1: 41 LCPS/100; HDA 2: 24 LCPS/100; HDA 3: 0 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. Die Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit der zellulären oder viralen RNA ist als Kreuzreaktion in % angegeben. (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript)

Mit den Sonden S/200-Q2 und AS/588 konnten keine bzw. nur eine geringe unspezifische Reaktion mit zellulärer RNA aus FRhK4-Zellen beobachtet werden (HDA 2: 0 LCPS/100 und HDA 3: 227 LCPS/100). Auch im ersten HDA wurde nur ein geringer Wert nach der Reaktion der S/200-3-Sonde mit HCV-RNA (46 LCPS/100) gemessen. Im Gegensatz dazu kam es

nach der Hybridisierung von 10 fmol Sonde S/200-3 und 1 µg zellulärer RNA aus U937-Zellen zu einer recht starken Reaktion mit einem Lumineszenzwert von 468 LCPS/100. Verglichen mit dem Resultat der Sonde S/200-3 mit zellulärer RNA und 2,5 fmol Antisense-Transkript (17.515 LCPS/100) entspricht das einer Fehlhybridisierung von 2,7 %.

Da derartige Kreuzreaktionen auch mit anderen Sonden und scheinbar unabhängig von der verwendeten Zelllinie auftraten (vgl. Abb. 4.1-9 und Abb. 4.1-10), war es somit wichtig, für den späteren Nachweis von HCV in Zellextrakten, diese zusätzliche Kontrolle (Hybridisierung von Sonde und zellulärer RNA) stets mitzuführen und gegebenenfalls von den übrigen Lumineszenzwerten abzuziehen.

Um in einem weiteren Experiment zu testen, ob ein Überschuss des HCV-Transkriptes in positiver Polarität den Nachweis des Antisense-Transkriptes durch die Sense-Sonde negativ beeinflusst, wurde zum Antisense-Transkript ein 50facher Überschuss des Sense-Transkriptes gegeben. Anhand der Tab. 4.1-7 ist zu erkennen, dass der Überschuss des Sense-Transkriptes beim Nachweis von 100 amol bzw. 2,5 fmol Antisense-Transkript nur geringe Auswirkungen auf die gemessenen Lumineszenzwerte hatte, was die Spezifität der Sonden unterstrich.

Tab. 4.1-7: Einfluss eines 50fachen Überschusses des Sense-Transkriptes auf den Nachweis des Antisense-Transkriptes mit der Sense-Sonde S/200-3 über den HDA.

HDA	Sonde	Probe	Zugabe von 50fachen Überschuss an S-T.	LCPS/100
1	S/200-3 [10 fmol]	1 µg RNA/U937 + 2,5 fmol AS-T.	-	17.516
		1 µg RNA/U937 + 2,5 fmol AS-T.	+ 125 fmol S-T.	12.611
		1 µg RNA/U937 + 100 amol AS-T.	-	1048
		1 µg RNA/U937 + 100 amol AS-T.	+ 5 fmol S-T.	1087
2	S/200-3 [10 fmol]	1 µg RNA von U937-Zellen	-	0
		1 µg RNA/U937 + 2,5 fmol AS-T.	-	14.943
		1 µg RNA/U937 + 2,5 fmol AS-T.	+ 125 fmol S-T.	11.516
		1 µg RNA/U937 + 100 amol AS-T.	-	510
		1 µg RNA/U937 + 100 amol AS-T.	+ 5 fmol S-T.	555

10 fmol Sonde wurden mit unterschiedlichen Mengen des Antisense-Transkriptes (AS-T.) und 1 µg zellulärer RNA aus U937-Zellen hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der höchsten Negativkontrolle (HDA 1 => 1µg RNA/U937 + 10 fmol Sonde: 468 LCPS/100; HDA 2 => Substratkontrolle: 421 LCPS/100) bereits abgezogen wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass das Hepatitis C-Virus *in vitro* und *in vivo* ausgesprochen langsam repliziert und daher nur über sehr sensitive Methoden nachweisbar ist (Yoo et al., 1995, Kolykhalov et al., 1997, Bartenschlager & Lohmann, 2000), war es nun von entscheidender Bedeutung zu kontrollieren, in wie weit die Sensitivität der Sonden durch die Zugabe von zellulärer RNA eingeschränkt sein könnte.

Aus diesem Grund wurde eine Sense- (S/200-Q2) und eine Antisense-Sonde (AS/588) in Anwesenheit von jeweils 1 µg zellulärer RNA mit unterschiedlichen Konzentrationen der Kontrolltranskripte inkubiert und das Ausmaß der Hybridisierung über den HDA ermittelt. Die Resultate sind in der Abb. 4.1-9 und der Abb. 4.1-10 dargestellt. Dabei wurde ein Ergebnis als positiv bewertet, wenn die Lumineszenz der Hybridisierung der jeweiligen Sonde mit dem entsprechend komplementären Transkript mindestens doppelte so groß war, als der höchste Lumineszenzwert der mitgeführten Negativkontrollen.

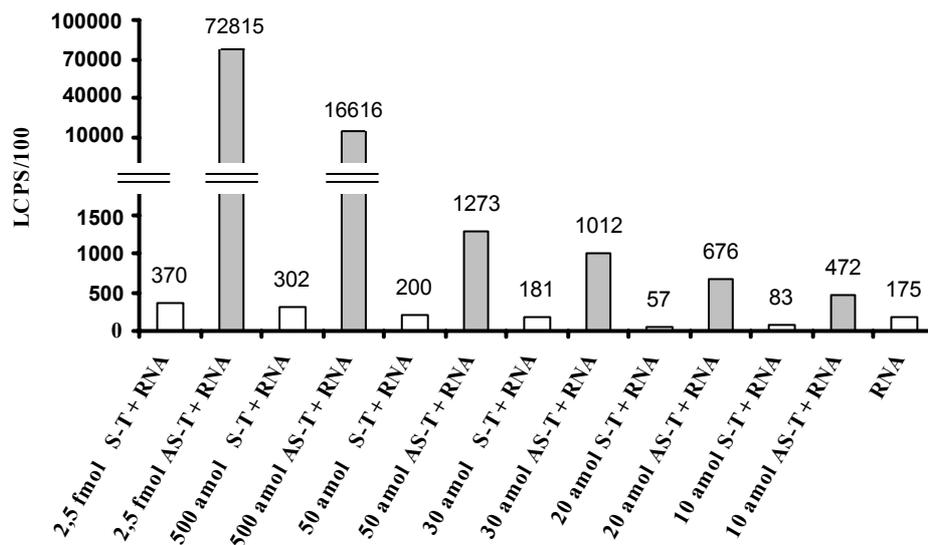


Abb. 4.1-9: Untersuchung des Einflusses von zellulärer RNA auf die Sensitivität der Sense-Sonde S/200-Q2 über den HDA. 2,5 fmol Sonde wurden mit unterschiedlichen Mengen der Kontrolltranskripte und 1 µg zellulärer RNA aus FRhK4-Zellen hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der höchsten Negativkontrolle (1 µg RNA/FRhK4 + 2,5 fmol Sonde: 175 LCPS/100) mit angegeben wurde (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript).

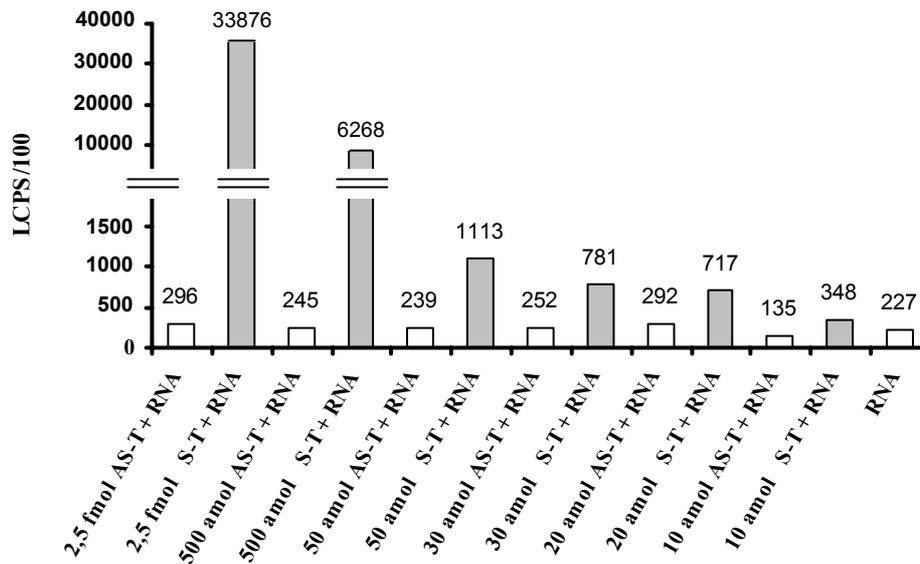


Abb. 4.1-10: Untersuchung des Einflusses von zellulärer RNA auf die Sensitivität der Antisense-Sonde AS/588 über den HDA. 5 fmol Sonde wurden mit unterschiedlichen Mengen der Kontrolltranskripte und 1 µg zellulärer RNA aus FRhK4-Zellen hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der höchsten Negativkontrolle (1 µg RNA/FRhK4 + 5 fmol Sonde: 227 LCPS/100) mit angegeben wurde (S-T.: Sense-Transkript; AS-T.: Antisense-Transkript).

Betrachten man sich zunächst die Ergebnisse mit der Sense-Sonde S/200-Q2 wird deutlich, dass die Sonde, trotz Zusatz von zellulärer RNA, ihr entsprechendes Kontrolltranskript noch bis zu einer Konzentration von etwa 30 amol detektieren konnte (siehe Abb. 4.1-9). Die Antisense Sonde AS/588 erreichte sogar unter den gleichen Bedingungen eine Nachweisgrenze von 20 amol (siehe Abb. 4.1-10). Obwohl diese Sensitivität in zwei weiteren Ansätzen mit etwa 30 bis 50 amol nicht ganz erreicht wurde (nicht dargestellt), zeigen die Resultate, dass trotz Zugabe von zellulärer RNA noch eine hohe Sensitivität der Sonden gegeben war.

Insgesamt gesehen ist es also gelungen HCV-spezifische Sense- (S/200-1, S/200-3 und S/200-Q2) und Antisense-Sonden (AS/normal und AS/588) zu konstruieren, die hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität gut für einen Nachweis von synthetisch hergestellter HCV-RNA über den Hybrid-Detection-Assay geeignet waren. Ob sich dieses neu etablierte Nachweissystem auch tatsächlich zur Detektion von HCV-RNA aus Probenmaterial eignete und mit der sehr sensitiven Methode der PCR konkurrieren konnte, wurde zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit untersucht (siehe 4.3).

4.2 Studien zur Etablierung eines Replikationssystems für HCV

Neben der Intention ein PCR-unabhängiges Nachweissystem für HCV zu entwickeln, wurde gleichzeitig versucht, ein Replikationssystem für das Hepatitis C-Virus zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Zelllinien mit HCV infiziert. Anschließend sollte das Virus an die gegebenenfalls vorhandenen, permissiven Zellen adaptiert werden, um ein Zellkultursystem zu entwickeln, das mit einer hohen Produktion infektiöser Virionen verbunden ist.

Da die Methode des HDA zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand, erfolgte die Detektion des Virus in den einzelnen Infektionsansätzen vorerst ausschließlich über die RT-PCR.

4.2.1 Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis von HCV-RNA

Für die Etablierung einer HCV-PCR wurde die virale RNA aus unterschiedlichen, definitiv HCV-positiven Plasmaproben isoliert und je 6 µL RNA-Extrakt in einer RT-PCR sowie einer nachfolgenden nested PCR, modifiziert nach den Angaben von SCHMIDT et al., amplifiziert (Schmidt et al., 1995; siehe 3.16.1). Von insgesamt vier der untersuchten HCV-haltigen Plasmaproben waren dabei teilweise nur ein bis zwei Ansätze positiv (nicht dargestellt). Aufgrund der Tatsache, dass in zwei unabhängig voneinander initiierten Extraktionen dieselbe Probe einmal positiv und einmal negativ erschien (nicht dargestellt), lag die Ursache dieses Problems offensichtlich nicht in den Synthesebedingungen der PCR sondern vielmehr in der RNA-Extraktion per se.

Um einen zuverlässigen Nachweis des Hepatitis C-Virus für die nachfolgenden Versuche über die PCR gewährleisten zu können, wurde daher die RNA-Extraktionsmethode optimiert. Dafür wurde u.a. die bislang durchgeführte Silica-Methode (siehe 3.14.1) durch die RNA-Extraktion nach Chomczynski (siehe 3.14.2) ersetzt. Eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse konnte aber nicht erzielt werden (nicht dargestellt). Auch eine Kombination der beiden Methoden miteinander führte zu keiner Erhöhung der Sensitivität der HCV-PCR (nicht dargestellt). Erst eine geringe Modifikation in der Durchführung der Chomczynski-Extraktion, die nach Absprache mit S. Wünschmann (Department of Internal Medicine, University of Iowa, Iowa City) durchgeführt wurde, und die Veränderung der Konzentrationen der Bestandteile des verwendeten Lysepuffers (siehe 3.14.3) hatte einen deutlichen Effekt auf die Sensitivität der Methode. Die Idee war, die Konzentrationen der Substanzen des herkömmlichen Lysepuffers (Lösung D; vgl. 2.14.10) geringfügig zu erhöhen, um den Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen.

sichtigen, der auftritt, wenn die Lösung D nicht auf ein Zellpellet, sondern zu 100-200 μL Überstand oder Plasmaprobe gegeben wird. Dabei stellte sich heraus, dass der derart modifizierte Lysepuffer (Lösung D*; vgl. 2.14.10) generell die Sensitivität der RT-PCR erhöhte.

Die Abb. 4.2-1 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines β -Actin-mRNA-Nachweises in HFS-10-Zellen über die PCR, wobei die RNA aus unterschiedlichen Zellzahlen einerseits mit der normalen Lösung D und andererseits mit der modifizierten Lösung D* extrahiert wurde. Bei der Verwendung der Lösung D konnte die β -Actin-mRNA erst beim Einsatz von 6 μL RNA-Extrakt aus 10^5 HFS-10-Zellen detektiert werden (siehe Abb. 4.2-1; Lösung D, Spur 2). Beim Einsatz der Lösung D* war hingegen noch eine β -Actin-Bande bei der gleichen Menge Extrakt aus nur 10^3 Zellen deutlich erkennbar (siehe Abb. 4.2-1; Lösung D*, Spur 5).

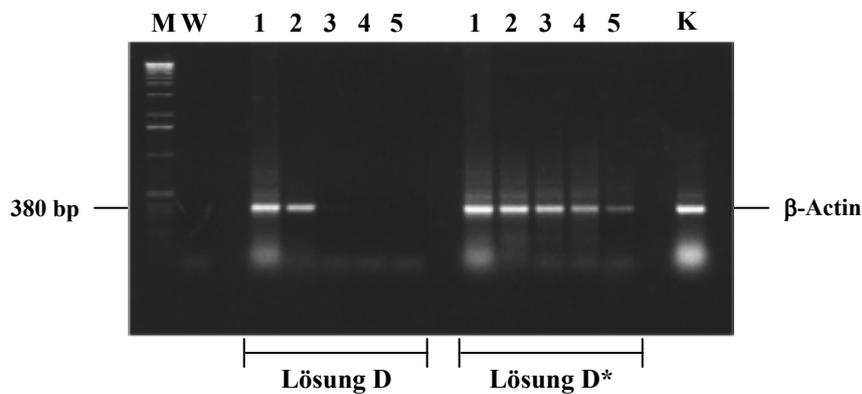


Abb. 4.2-1: Nachweis von β -Actin-mRNA aus Extrakten unterschiedlicher Zellzahlen humaner Fibroblasten über die RT-PCR. Die Extraktion der RNA erfolgte mit der modifizierten Methode nach Chomczynski aus 10^6 (Spur 1), 10^5 (Spur 2), 10^4 (Spur 3, 4) und 10^3 (Spur 5) HFS-10-Zellen. Einerseits wurde dabei die normale Lösung D, andererseits die modifizierte Lösung D* verwendet. Für die RT-PCR wurden 6 μL der jeweiligen RNA-Extrakte eingesetzt. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: 5 μL positives RNA-Extrakt von FRhK4-Zellen)

Eine weitere Erhöhung der Sensitivität der PCR bei der Untersuchung von HCV-haltigen Proben konnte erzielt werden, wenn im Verlauf der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski 1 mg/mL Glykogen direkt vor der Fällung der Nukleinsäure zur Probe gegeben wurde. Die Abb. 4.2-2 zeigt beispielsweise, wie aus den RNA-Extrakten verschiedener Verdünnungen der HCV-Serumprobe Nr. 5, unabhängig vom verwendeten Lysepuffer, in fast allen Ansätzen die virale RNA detektiert werden konnte, wenn der Probe Glykogen zugesetzt wurde (siehe Abb. 4.2-2; mit Glykogen, Spur 2-5). Im Gegensatz dazu war bei einer Extraktion unter identischen Bedingungen, ohne den Zusatz von Glykogen, maximal eine 1:2 Verdünnung der Serumprobe Nr. 5 positiv (siehe Abb. 4.2-2; ohne Glykogen, Spur 2-3). Das dabei sogar eine unverdünnte Probe negativ ausfiel (siehe Abb. 4.2-2; ohne Glykogen,

Lösung D*, Spur 2), lag sicherlich nicht an der Methode, sondern hing vermutlich damit zusammen, dass das Material während der Extraktion verloren gegangen war.

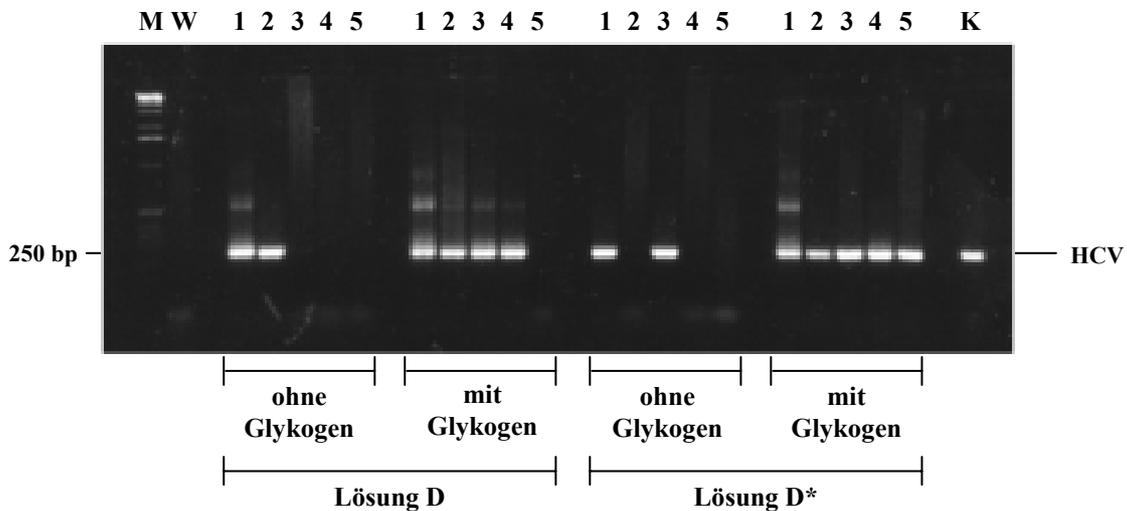


Abb. 4.2-2: Nachweis von HCV-Positivstrang-RNA aus HCV-haltigen Plasma- oder Serumproben über die RT-PCR. Für die Detektion der viralen RNA wurden, neben der HCV-positiven Frischplasmaprobe Nr. 4 (Spur 1), folgende Verdünnungen der HCV-Serumprobe Nr. 5 eingesetzt: unverdünnt (Spur 2), 2^{-1} (Spur 3), 2^{-2} (Spur 4), 2^{-3} (Spur 5). Die Extraktion der RNA erfolgte mit der modifizierten Methode nach Chomczynski aus je 200 μ L Probe. Einerseits wurde dabei die normale Lösung D, andererseits die modifizierte Lösung D* verwendet. In einigen Proben wurde die RNA in Anwesenheit von Glykogen gefällt. Für die RT-PCR wurden 6 μ L der jeweiligen RNA-Extrakte eingesetzt. Je 1 μ L der cDNA aus der RT-PCR wurde für die nested PCR verwendet. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: 5 μ L positives RNA-Extrakt der HCV-Frischplasmaprobe Nr. 4)

Über die beschriebenen Modifikationen der RNA-Extraktion nach Chomczynski konnte also die Sensitivität der RT-PCR derart verbessert werden, dass nun eine zuverlässige Detektion des Virus im Probenmaterial über die nested PCR gewährleistet war. Alle weiteren Extraktionen wurden daher nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski (vgl. 3.14.3) durchgeführt. Handelte es sich beim Untersuchungsmaterial um Plasma- bzw. Serumproben oder um Überstände infizierter Kulturen, wurde außerdem 1 mg/mL Glykogen vor der Fällung der Nukleinsäure zur Probe gegeben.

4.2.2 Infektion verschiedener Zelllinien mit HCV

Um zu prüfen, welche Zellen eventuell für die Etablierung eines geeigneten Replikationssystems in Frage kommen könnten, wurden nun verschiedene Zelllinien aus dem Labor mit HCV infiziert. Der Infektionserfolg wurde jeweils über die nested PCR kontrolliert.

4.2.2.1 Infektion von Hautfibroblasten mit HCV-Frischplasma

Die Infektion der Hautfibroblasten (HFS-10-Zellen) erfolgte mit jeweils 500 μ L HCV-Frischplasma Nr. 4 bzw. einem HCV-negativen Kontrollplasma für 2 h bei 37°C in einer 6 cm Schale. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1. Tag, 1., 2. und 3. Woche p.i.) wurde jeweils der Überstand eingefroren sowie ein Zellextrakt hergestellt. In einer nachfolgenden nested PCR mit den RNA-Extrakten der einzelnen Proben konnte zu keinem Zeitpunkt HCV-Positivstrang-RNA im Überstand oder den Zellextrakten nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

4.2.2.2 Infektion von Knochenmarkfibroblasten mit HCV-Frischplasma

Bei der Infektion der Knochenmarkfibroblasten (KMF-Zellen) wurde wie bei den Hautfibroblasten verfahren (vgl. 4.2.2.1). Zu keinem Zeitpunkt p.i. konnte jedoch HCV-RNA über die nested PCR nachgewiesen werden, d.h. die Infektion verlief ebenfalls ergebnislos (nicht dargestellt).

4.2.2.3 Infektion von FRhK4-Zellen mit HCV-Frischplasma

Die Infektion der FRhK4-Zellen erfolgte mit 500 μ L des HCV-Frischplasmas Nr. 4 oder einem HCV-negativen Kontrollplasma für 2 h bei 37°C in einer 6 cm Schale. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (NP, 1., 2. und 3. Woche p.i.) wurde jeweils der Überstand eingefroren sowie ein Zellextrakt hergestellt. Die Ergebnisse der nested PCR mit den RNA-Extrakten der einzelnen Proben sind in der nachfolgenden Tab. 4.2-1 aufgeführt.

Tab. 4.2-1: Nachweis von HCV-Positivstrang-RNA in infizierten FRhK4-Zellen über die RT-PCR.

Probenentnahme	Infizierte FRhK4-Zellen			
	Mock		HCV-Plasma (Nr. 4)	
	Zellextrakt	Überstand	Zellextrakt	Überstand
NP	nb	nb	-	-
1. Wo p.i.	nb	nb	+	-
2. Wo p.i.	nb	nb	-	+
3. Wo p.i.	-	-	+	-

Die FRhK4-Zellen einer 6 cm Schale wurden mit 500 μ L Frischplasma oder einem HCV-negativen Kontrollplasma (Mock) infiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus je 200 μ L Zellextrakt oder 200 μ L Überstand. Für die RT-PCR wurden 6 μ L der jeweiligen RNA-Extrakte eingesetzt. Je 1 μ L der cDNA aus der RT-PCR wurde für die nested PCR verwendet. (nb: nicht bestimmt)

HCV-Positivstrang konnte in den Zellextrakten der HCV-infizierten FRhK4-Zellen in der ersten und der dritten Woche p.i. sowie im Überstand der 2. Woche p.i. nachgewiesen werden. Dies war der erste vage Hinweis auf eine Replikation des Virus in diesen Zellen.

4.2.3 Infektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen mit HCV-Plasma

Für die Bestätigung der Ergebnisse aus 4.2.2.3 sollte eine weitere Infektion von FRhK4-Zellen mit dem HCV-Frischplasma Nr. 4 erfolgen.

Aufgrund der Tatsache, dass FRhK4-Zellen, die stabil mit dem pcDNA3/RLI 3' transfiziert waren (RLI-positive FRhK4-Zellklone), die Replikation des HAV fördern (Gotter, 1999; Kurth, 2001), sollten dabei, neben den FRhK4-Zellen, auch diese Zellklone mitgeführt werden. Da die zur Verfügung stehenden RLI-positiven FRhK4-Zellklone jedoch nur über eine Antibiotikaresistenz selektioniert und noch nicht explizit auf die zusätzlich eingebrachte Sequenz des RNase L-Inhibitors (RLI) hin untersucht worden waren, wurde zunächst in einem Vorversuch überprüft, welcher Klon das RLI-ORF des Vektors pcDNA3/RLI 3' (siehe 2.4.3) stabil trägt, bevor eine Infektion dieser Zellen mit HCV durchgeführt wurde.

4.2.3.1 Überprüfung RLI-positiver FRhK4-Zellklone auf die Insertion des RLI-ORF

Die Kontrolle der erfolgreichen Insertion des RLI-ORF in den mit G418-selektionierten RLI-positiven FRhK4-Zellklonen von GOTTER (Gotter, 1999) erfolgte auf Genomebene. In die PCR wurden dabei unterschiedliche Primerkombinationen aus dem pcDNA3 und dem RLI eingesetzt, um zwischen dem zellulären RLI-Gen und dem integrierten RLI-ORF des Plasmids unterscheiden zu können (vgl. 3.17). Die Ergebnisse sind in der Tab. 4.2-2 dargestellt.

Tab. 4.2-2: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von FRhK4-Zellen mit pcDNA3/RLI 3' über die PCR.

Lage der verwendeten Primer	Untersuchte RLI+-FRhK4-Zellklone									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SP6-Promotor / RLI	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
CMV-Enhancer / RLI	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
CMV-Promotor / RLI	nb	nb	nb	nb	nb	-	nb	nb	nb	nb

Aus insgesamt zehn RLI+-FRhK4-Zellklonen wurde jeweils die DNA extrahiert (klassische Methode) und je 1 µg DNA-Extrakt mit unterschiedlichen Primerkombinationen in eine PCR eingesetzt. (nb: nicht bestimmt)

Bei der Verwendung des Sense-Primers aus der codierenden Region des RLI sowie dem Anti-sense-Primer aus dem SP6 Promotor, der stromabwärts der cDNA des RLI-ORF im transfizierten pcDNA3/RLI 3' liegt, waren von insgesamt 10 untersuchten Klonen nur vier positiv (Klon Nr. 6, 7, 8 und 10). Beim Einsatz einer Primerkombination aus dem CMV-Enhancer/Promotor-Bereich des Plasmides und dem RLI-Insert war sogar nur bei drei Klonen eine Bande im Agarosegel sichtbar (Klon Nr. 7, 8 und 10).

Das bedeutet nur die Klone Nr. 6, 7, 8 und 10 besaßen das zusätzlich eingebrachte RLI-ORF, wobei im Klon Nr. 6 der CMV-Enhancer und -Promotor nicht integriert war.

Um zu testen, ob sich dies möglicherweise auf eine zu erwartende Überexpression des RLI auswirken könnte, wurde versucht, die Expression des RLI in drei der positiven Zellklone sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf Translationsebene nachzuweisen.

4.2.3.2 Kontrolle der RLI-Expression auf Transkriptionsebene

Die Detektion des RLI auf Transkriptionsebene in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen Nr. 6, Nr. 8 und Nr. 10 erfolgte mit Hilfe der RT-PCR (siehe 3.16.4). Als Kontrollansätze dienten zwei Zellklone, die stabil mit dem pcDNA/RLI 3'(-) (vgl. 2.4.4) transfiziert wurden, aus dem die Sequenz des RLI entfernt worden war (RLI-negative Zellklone), sowie FRhK4-Zellen. Die Zellen wurden bis zur ersten Probenentnahme zehn Tage kultiviert und anschließend einmal passagiert. Nach einer weiteren viertägigen Kultivierung der Ansätze wurde eine zweite Probe genommen. Nach der Extraktion der RNA aus den Zellen und einem sich anschließenden DNase-Verdau, erfolgte schließlich die RT-PCR, wobei als Kontrolle für eine erfolgreiche RNA-Isolierung mit den identischen Proben eine β -Actin-PCR durchgeführt wurde.

Es konnte sowohl in den FRhK4-Zellen, als auch in den RLI-negativen und den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen RLI-mRNA nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Zu beiden Zeitpunkten der Probenentnahme war aber in jeweils zwei der drei untersuchten RLI-positiven Zellklone die Intensität der RLI-Banden höher als in den übrigen Ansätzen (im Zellklon Nr. 8 und Nr. 10 bzw. Nr. 6 und Nr. 10). Da die entsprechenden β -Actin-Banden in allen Ansätzen annähernd identisch waren (nicht dargestellt), könnte dies somit ein kleines Indiz dafür sein, dass in den RLI-positiven Zellklonen Nr. 6, Nr. 8 und Nr. 10 möglicherweise mehr RLI-mRNA als in den entsprechenden Kontrollansätzen vorlag. Ein aussagekräftiger quantitativer Vergleich war hier aber nicht möglich.

4.2.3.3 Kontrolle der RLI-Expression auf Translationsebene

Um die RLI-Expression auf Translationsebene zu untersuchen, wurden die zellulären Proteine positiver (Zellklon Nr. 6, 8 und 10) und negativer FRhK4-Zellklone (Zellklon Nr. 6 und 7) sowie von FRhK4-Zellen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das RLI über einen Immoblot mit entsprechenden Antikörpern detektiert (siehe 3.22). In unterschiedlichen Ansätzen mit 10-40 µg Proteinextrakt und Variationen in den Inkubationszeiten des RLI-spezifischen Antikörpers ist es nicht gelungen, ein brauchbares Ergebnis zu erzielen. Entweder trat die zu erwartende RLI-Bande von 68 kDa gar nicht auf und es konnten nur unspezifische Banden zwischen 30, 50 und etwa 100 kDa detektiert werden oder es waren so viele Banden sichtbar, dass eine genaue Zuordnung der spezifischen RLI-Bande nicht möglich war (nicht dargestellt). Eine quantitative Aussage über die Konzentration des Proteins in den jeweiligen Zellen konnte daher nicht getroffen werden.

Es war somit nicht gelungen, die zu erwartende Überexpression des RLI in den RLI-positiven Zellklonen auf Transkriptions- bzw. Translationsebene nachzuweisen. Dennoch wurde für die nachfolgende HCV-Infektion der RLI-positive FRhK4-Zellklon Nr. 6 mitgeführt.

4.2.3.4 Infektion von FRhK4-Zellen und -Zellklonen mit HCV-Plasma

Die Infektion von FRhK4-Zellen, einem RLI-negativen FRhK4-Zellklon und dem RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 wurde für 4 h bei 37°C mit je 500 µL HCV-Plasma durchgeführt (siehe 3.6). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (NP, 1., 2., 3. und 4. Woche p.i.) wurden die Überstände eingefroren sowie Zellextrakte hergestellt. Es folgte eine RNA-Extraktion nach der modifizierten Chomczynski-Methode und eine nested PCR. Die Ergebnisse sind in der Tab. 4.2-3 dargestellt, wobei als Kontrollen Proben der Mock-infizierten FRhK4-Zellen mitgeführt wurden.

HCV-Positivstrang-RNA konnte in den FRhK4-Zellen nur im Überstand direkt nach der vierstündigen Infektion nachgewiesen werden. In den HCV-infizierten RLI-positiven FRhK4-Zellen konnte hingegen sowohl am Nullpunkt als auch in der zweiten und dritten Woche p.i. HCV-RNA in den Zellextrakten detektiert werden. Da das entsprechende Zellextrakt aus der ersten Woche p.i. negativ ausfiel, war dies ein erneuter Hinweis für eine Replikation des HCV in FRhK4-Zellen. Außerdem spricht das Ergebnis dafür, dass das Virus möglicherweise in den RLI-positiven Zellklonen besser replizieren könnte als in den FRhK4-Zellen.

Tab. 4.2-3: Nachweis von HCV-Positivstrang-RNA in infizierten FRhK4-Zellen und dem infizierten RLI+-FRhK4-Zellklon Nr. 6 über die RT-PCR.

Probenentnahme	Infizierte Zellen					
	Mock-infizierte FRhK4-Zellen		HCV-infizierte FRhK4-Zellen		HCV-infizierte RLI+-Zellklone	
	Zellextrakt	Überstand	Zellextrakt	Überstand	Zellextrakt	Überstand
NP	nb	nb	-	+	+	+
1. Wo p.i.	nb	nb	-	-	-	-
2. Wo p.i.	nb	nb	-	-	+	-
3. Wo p.i.	nb	nb	-	-	+	-
4. Wo p.i.	-	-	-	-	-	-

Die Zellen einer 6 cm Schale wurden mit 500 µL HCV-Plasma oder einem HCV-negativen Kontrollplasma (Mock) infiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus je 200 µL Zellextrakt oder 200 µL Überstand. Für die RT-PCR wurden 6 µL der jeweiligen RNA-Extrakte eingesetzt. Je 1 µL der cDNA aus der RT-PCR wurde für die nested PCR verwendet. (nb: nicht bestimmt)

4.2.4 Versuch einer Adaptation des HCV an FRhK4-Zellen

Um ein Zellkultursystem etablieren zu können, das eine hohe Produktion infektiöser Viruspartikel erlaubt, wurde im folgenden versucht, das HCV an die FRhK4-Zellen zu adaptieren. Zu diesem Zweck wurden einerseits mit einem Teil der infizierten Ansätze aus 4.2.3.4 Zellpassagen durchgeführt. Andererseits erfolgte mit den Überständen der HCV-infizierten Zellen aus 4.2.2.3 eine Reinfektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven Zellklonen mit anschließenden Virus- und Zellpassagen der reinfizierten Zellen.

4.2.4.1 Versuch einer Adaptation des HCV über Zellpassagen

Beim Versuch, das HCV aus dem Probenmaterial der Infektionsansätze aus 4.2.3.4 anzupassen, wurden mit einem Teil der infizierten Zellen aus der 4. Woche p.i. mehrere Zellpassagen durchgeführt. Dabei erfolgte in regelmäßigen Abständen mit den Zellextrakten und/oder Überständen der jeweiligen Zellen ein HCV-Nachweis über die nested PCR.

HCV-Positivstrang-RNA war bereits nach der zweiten Passage im RLI-positiven Zellklon, aber erst nach der vierten Passage im RLI-negativen Zellklon detektierbar (nicht dargestellt). Ein weiteres Indiz dafür, dass das HCV in den RLI-positiven Zellklonen möglicherweise etwas besser replizieren kann als in den entsprechenden Vergleichszellen.

Aus ungeklärter Ursache kam es jedoch in beiden Ansätzen zu einer HAV-Coinfektion (Nachweis erfolgte über die RT-PCR; nicht dargestellt). Diese führte möglicherweise dazu, dass im HCV-infizierten RLI-positiven Zellklon ein CPE auftrat, der eine weitere Kultivie-

zung des Ansatzes unmöglich machte. Er musste in der dritten Passage abgebrochen werden. Der RLI-negative Zellklon konnte hingegen trotz der Coinfektion weiter kultiviert werden, wobei HCV-RNA von der 4. bis zur 9. Passage über insgesamt 5 Monate sporadisch in den Zellen nachweisbar war. Eine Adaptation des HCV an diese Zellen gelang aber nicht, da in den Passagen 10 und 11 keine virale RNA mehr detektiert werden konnte (nicht dargestellt). Der Ansatz wurde schließlich nach der 11. Passage abgebrochen.

4.2.4.2 Versuch einer Adaptation des HCV über Virus- und Zellpassagen

Mit den Überständen der HCV-infizierten Zellen aus 4.2.2.3 (Überstände der 1., 2. und 3. Woche p.i.) wurden FRhK4-Zellen und RLI-positive FRhK4-Zellklone reinfiziert (siehe Abb. 4.2-3). Die Infektion erfolgte dabei mit je 500 μ L Inokulum für 4 h bei 37°C in einer 6 cm Schale (siehe 3.6). Als Kontrolle dienten FRhK4-Zellen, die mit dem Überstand der Mock-infizierten FRhK4-Zellen aus 4.2.2.3 der dritten Woche p.i. inokuliert wurden.

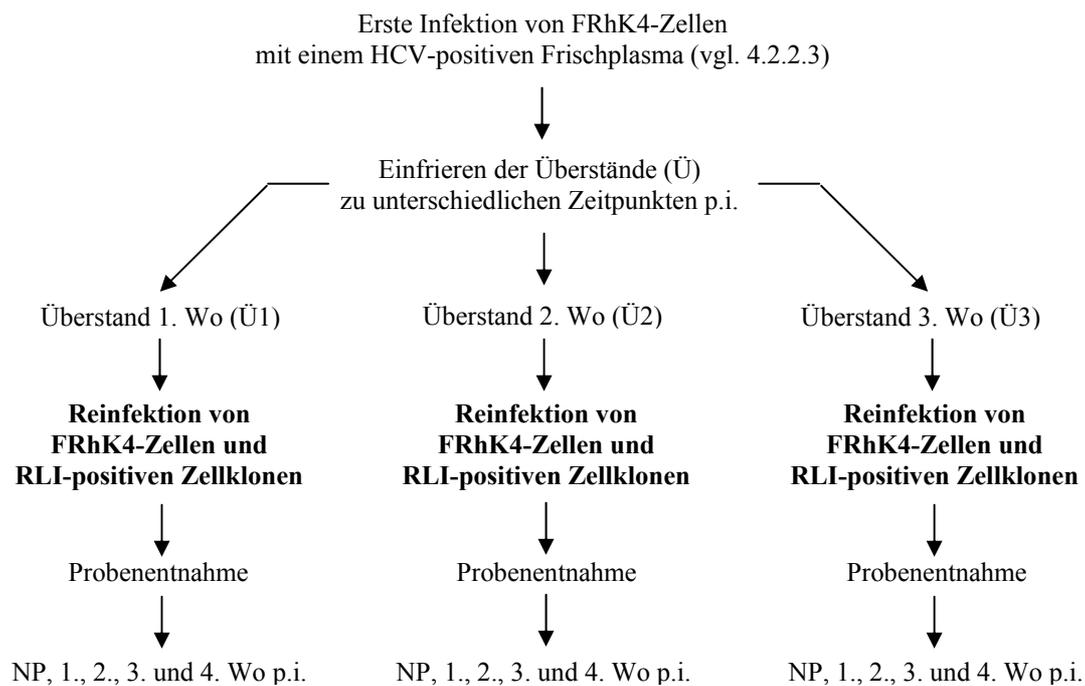


Abb. 4.2-3: Fließschema der Reinfektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen mit den Überständen aus 4.2.2.3.

Anhand der Tab. 4.2-4 erkennt man, dass nach dreiwöchiger Kultivierung der Zellen in allen Proben der reinfizierten RLI-positiven Zellklone HCV-Plusstrang-RNA im Überstand nachgewiesen werden konnte. Direkt nach der Infektion und zwei Wochen p.i. waren indes alle Ansätze negativ. Vier Wochen nach der Infektion war einer der drei Infektionsansätze positiv. Im Gegensatz dazu konnte in den FRhK4-Zellen zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme

HCV-RNA detektiert werden, auch wenn in der 2., 3. und 4. Woche p.i. nicht in allen drei Proben der Nachweis der viralen RNA gelang.

Demnach sind bei der ersten Infektion von FRhK4-Zellen aus 4.2.2.3 geringe Mengen infektiöser Virionen entstanden, die in diesen Ansätzen zu einer Neuinfektion der Zellen geführt haben.

Tab. 4.2-4: Nachweis von HCV-Positivstrang-RNA in reinfizierten FRhK4-Zellen bzw. dem RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 über die RT-PCR.

Probenentnahme	Mock-reinfizierte FRhK4-Zellen	HCV-reinfizierte FRhK4-Zellen	HCV-reinfizierte RLI+-Zellklone	Reinfektion mit Ü aus 4.2.2.3
NP	nb	+	-	Ü1
		+	-	Ü2
		+	-	Ü3
1. Wo p.i.	nb	+	+	Ü1
		+	-	Ü2
		+	-	Ü3
2. Wo p.i.	nb	+	-	Ü1
		+	-	Ü2
		-	-	Ü3
3. Wo p.i.	nb	-	+	Ü1
		+	+	Ü2
		+	+	Ü3
4. Wo p.i.	-	+	-	Ü1
		-	-	Ü2
		+	+	Ü3

FRhK4-Zellen und RLI-positive FRhK4-Zellklone einer 6 cm Schale wurden mit je 500 µL Überstand der ersten bis dritten Woche p.i. (Ü 1, Ü2 und Ü3) der HCV-infizierten Zellen aus 4.2.2.3 inkubiert. Als Kontrollen dienten FRhK4-Zellen, die mit dem Überstand der Mock-infizierten Zellen aus 4.2.2.3 der dritten Woche p.i. (Ü3) inokuliert wurden. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 µL Überstand. Für die RT-PCR wurden 6 µL der jeweiligen RNA-Extrakte eingesetzt. Je 1 µL der cDNA aus der RT-PCR wurde für die nested PCR verwendet. (Ü: Überstand; nb: nicht bestimmt)

Im Anschluss an die Reinfektion der Zellen wurde dann eine weitere Viruspassage durchgeführt, d.h. mit allen Überständen der ersten und dritten Woche p.i. aus Tab. 4.2-4 wurden erneut FRhK4-Zellen und RLI-positive Zellklone infiziert. Anschließend erfolgten mehrere Zellpassagen, wobei jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektionserfolg über die nested PCR nachgewiesen wurde. Dabei konnte in keinem Ansatz HCV-RNA detektiert werden (nicht dargestellt).

Obwohl die FRhK4-Zellen also offensichtlich permissiv für das HCV waren, misslang der Versuch, das Virus an diese Zellen zu adaptieren.

4.2.5 Transfektion von U937-Zellen mit HCV-RNA

Nachdem es nicht gelungen war, die Replikationseffizienz des Hepatitis C-Virus in den FRhK4-Zellen merklich zu steigern, wurde, auf der Suche nach einem geeigneten Zellkultursystem, ein weiterer Versuch mit U937-Zellen unternommen.

In einem ersten Ansatz konnte nach der Transfektion der Zellen mit je 10 µg HCV-RNA (isoliert aus zwei HCV-Frischplasmen) zwei Wochen p.i. sowohl in den Zellextrakten als auch in den Überständen der transfizierten U937-Zellen die virale RNA nachgewiesen werden, während drei Wochen p.i. kein Virus mehr detektierbar war (nicht dargestellt). Da aber auch eine von insgesamt sechs mitgeführten Negativkontrollen positiv ausfiel, konnte das Ergebnis nicht verwertet werden.

Eine Wiederholung der PCR war aufgrund der sehr geringen RNA-Ausbeuten nach der Extraktion nicht möglich.

In einem zweiten Ansatz wurde daher die Transfektion der U937-Zellen wiederholt. Dabei sollte, neben den promonozytären Zellen, erneut ein Zellklon mitgeführt werden, der stabil mit dem pcDNA3/RLI 3' transfiziert war (RLI-positiver U937-Zellklon), um durch das zusätzlich eingebrachte RLI möglicherweise die Replikation des HCV und damit die Chance auf ein Zellkultursystem zu erhöhen.

Da RLI-positive und RLI-negative Zellklone (U937-Zellklone, die stabil mit dem Kontrollplasmid ohne RLI-ORF transfiziert waren) nicht zur Verfügung standen, mussten diese zunächst hergestellt werden.

4.2.5.1 Herstellung RLI-positiver und RLI-negativer U937-Zellklone

U937-Zellen wurden mit dem pcDNA3/RLI 3' (siehe 2.4.3) oder dem entsprechenden Kontrollplasmid ohne RLI-ORF (siehe 2.4.4) über unterschiedliche Methoden transfiziert (siehe 3.12.2) und anschließend mit G418 selektioniert. Die für unbehandelte Zellen cytotoxische G418-Konzentration wurde zuvor an U937-Zellen über einen Vitalitätstest (MTT-Test; siehe 3.5) ermittelt. Die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander initiierten MTT-Tests sind in der Abb. 4.2-4 zusammengefasst.

Wie zu erkennen ist, tolerierten die unbehandelten U937-Zellen das G418 maximal bis zu einer Konzentration von 600 µg/mL. Um einen ausreichenden Selektionsdruck auszuüben, wurden die transfizierten U937-Zellen daher in 700 µg/mL G418 selektioniert (siehe 3.13).

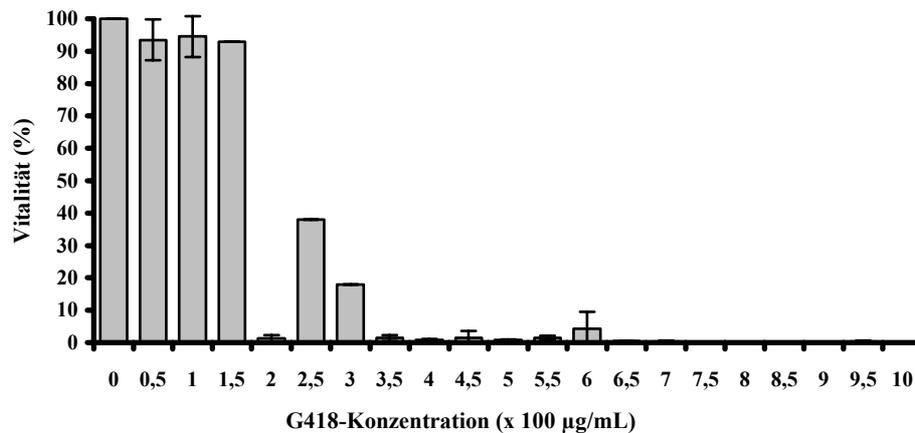


Abb. 4.2-4: Vitalität von U937-Zellen in Abhängigkeit der G418-Konzentration. U937-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an G418 für 16 Tage inkubiert. Dann wurde die Vitalität der Zellen über einen MTT-Test ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander initiierten Ansätzen mit Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Selektion der transfizierten U937-Zellen waren insgesamt sehr unterschiedlich. Nach einer Calcium/Phosphat-Transfektion konnte kein Zellklon, nach der Elektroporation vier RLI-positive sowie acht RLI-negative Klone und nach der Transfektion mit dem Superfect-Reagenz jeweils über 90 U937-Zellklone selektioniert werden (nicht dargestellt).

Die Überprüfung der stabilen Insertion des RLI-ORF aus dem pcDNA3/RLI 3' erfolgte nach einer DNA-Extraktion über die klassische Methode oder die Isolierung mit Chelex (siehe 3.14.4), mit Hilfe der PCR auf Genomebene (siehe 3.17). Es zeigte sich, dass lediglich in einem der insgesamt vier selektionierten RLI-positiven Zellklone aus der Elektroporation das RLI-ORF integriert war (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu wiesen von 20 getesteten RLI-positiven-Zellklonen aus der Transfektion mit dem Superfect-Reagenz 19 die zusätzlich eingebrachte Sequenz des RLI auf, wobei zehn Klone den kompletten CMV-Enhancer/Promotor-Bereich integriert hatten (nicht dargestellt). Einer dieser RLI-positiven sowie einer der RLI-negativen U937-Zellklone wurde schließlich für die nachfolgende HCV-Transfektion verwendet.

4.2.5.2 Transfektion RLI-negativer und RLI-positiver U937-Zellklone mit HCV-RNA

Die Transfektion von je 2×10^5 Zellen erfolgte mit dem TransMessenger-Reagenz der Firma Qiagen (siehe 3.12.1.2). Für die Transfektion wurden jeweils 10 µg infektiöse HCV-RNA eingesetzt, die über die *in vitro* Transkription mit dem infektiösen HCV-Plasmid hergestellt

wurde (siehe 3.11). Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal gewaschen und im Selektionsmedium kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. wurde die Zellzahl in den entsprechenden Ansätzen bestimmt und eine Probe für die RNA-Extraktion entnommen. Zusätzlich wurde stets eine gewisse Anzahl der Zellen in Anwesenheit von PMA inkubiert (siehe 3.1.2), um über eventuell auftretende morphologische Differenzierungsstörungen zusätzliche Hinweise für eine vorliegende HCV-Replikation zu erhalten. Nach 16tägiger Kultivierung der Zellen wurden die Ansätze abgebrochen und die restlichen Zellsuspensionen jeweils für die Herstellung von Zellysaten eingefroren.

Nach der Isolierung der Ribonukleinsäure aus den Zellen (siehe 3.14.3) und einem anschließenden DNase-Verdau (siehe 3.20.1.1) erfolgte schließlich mit je 1 µg RNA-Extrakt der Nachweis der viralen RNA über die nested PCR. Im Gegensatz zu den bisherigen Ansätzen wurde dabei nicht die genomische RNA sondern das Replikationsintermediat des HCV über die Negativstrang-spezifische PCR detektiert (siehe 3.16.2), um zwischen der eingebrachten Inokulum-RNA und der neu synthetisierten RNA unterscheiden zu können und einen direkten Hinweis auf eine gegebenenfalls vorhandene Virusreplikation zu erhalten. Als Negativkontrolle für die Spezifität der PCR-Reaktion wurde HCV-Positivstrang-RNA mitgeführt, die aus der HCV-Frischplasmprobe Nr. 4 isoliert wurde. Beim Nullpunkt (NP) handelte es sich um den Zeitpunkt der ersten Probenentnahme etwa sieben Stunden nach der Transfektion der Zellen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 4.2-5 dargestellt.

Bei den RLI-negativen U937-Zellen konnte in den HCV-transfizierten Zellen zu allen Zeitpunkten p.i. das Replikationsintermediat von HCV nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2-5A; HCV), während die entsprechenden Kontrollen alle negativ waren (siehe Abb. 4.2-5A; Mock). Bei den RLI-positiven Klonen konnte hingegen nur am Nullpunkt eine Bande in den HCV-transfizierten Ansätzen beobachtet werden (siehe Abb. 4.2-5B; HCV).

Ein insgesamt sehr überraschendes Ergebnis. Einerseits schien schon wenige Stunden nach der Transfektion eine Replikation des HCV stattgefunden zu haben, andererseits war in den Extrakten der RLI-negativen Zellklone deutlich mehr Negativstrang-RNA nachweisbar als in den RLI-positiven Zellklonen. Ein direkter Vergleich der Replikationseffizienz zwischen den RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellen war in diesem Versuch aber nicht möglich, da von den transfizierten RLI-positiven Zellklonen beim Spülen unmittelbar nach der Transfektion viele Zellen verloren gegangen waren und somit die Zellzahl der positiven Zellklone um ein Vielfaches unter der Anzahl der negativen Klone lag.

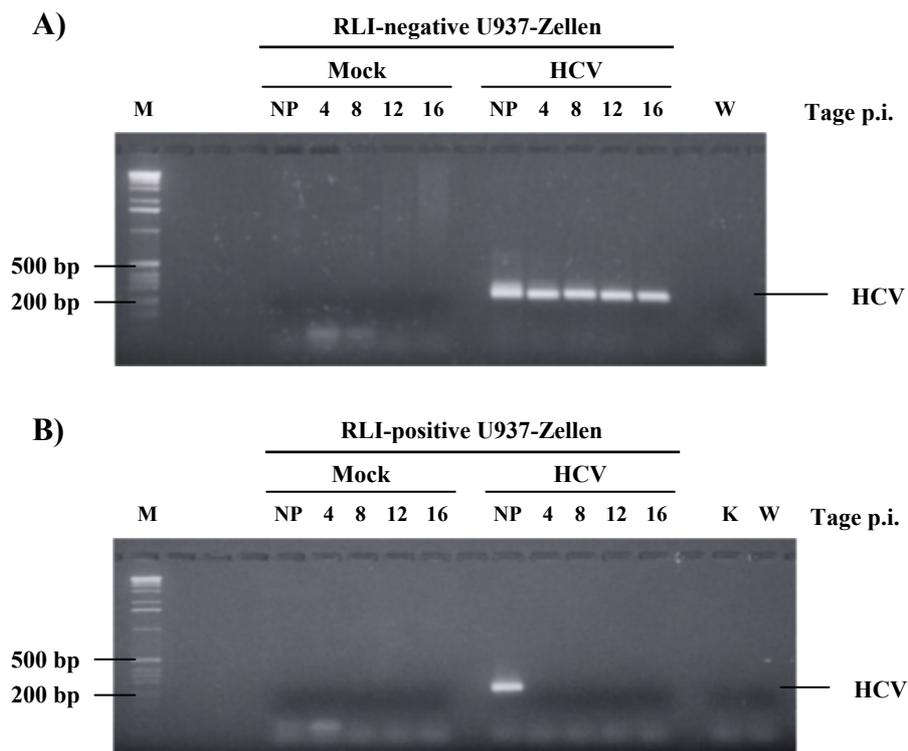


Abb. 4.2-5: Nachweis von HCV-Negativstrang-RNA in transfizierten RLI-negativen bzw. RLI-positiven U937-Zellklonen über die RT-PCR. 2×10^5 U937-Zellen wurden mit je $10 \mu\text{g}$ *in vitro* transkribierter HCV-RNA transfiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Tagen p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils $200 \mu\text{L}$ Zellextrakt. Nach einem anschließenden DNase-Verdau der Proben wurde je $1 \mu\text{g}$ RNA in die reverse Transkription eingesetzt und $5 \mu\text{L}$ des RT-Produktes in die erste PCR. Je $1 \mu\text{L}$ der cDNA aus der ersten PCR wurde für die nested PCR verwendet. (A) Mock- bzw. HCV-transfizierte RLI-negative U937-Zellklone, (B) Mock- bzw. HCV-transfizierte RLI-positive U937-Zellklone. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: $5 \mu\text{L}$ RNA-Extrakt der HCV-Frischplasmprobe Nr. 4)

Die Vermutung, dass es sich bei den Banden in der Abb. 4.2-5 trotz eines DNase-Verdau der RNA-Extrakte möglicherweise um amplifiziertes Plasmid aus Resten des Inokulums handeln könnte, wurde durch die Tatsache entkräftet, dass drei der Proben (8 bis 16 Tage p.i.) unter identischen Bedingungen aber ohne Verwendung der Reverse Transkriptase negativ waren (nicht dargestellt).

Die Kultivierung der transfizierten Zellen mit PMA erbrachte keine neuen Erkenntnisse. Zu keinem Zeitpunkt p.i. waren morphologische Unterschiede in der Differenzierung zwischen Mock- und HCV-transfizierten Zellen zu beobachten (nicht dargestellt).

4.2.5.3 Reinfektion von U937-Zellen

Um zu überprüfen, ob bei der Transfektion der U937-Zellklone aus 4.2.5.2 tatsächlich infektiöse Virionen entstanden waren und zu versuchen, das Virus gegebenenfalls an die Zellen anzupassen, wurde wie folgt verfahren: Zunächst wurden aus den Zellsuspensionen der HCV-transfizierten Zellen aus 4.2.5.2, die 16 Tage p.i. eingefroren wurden, durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen Zellysate hergestellt. Dann wurden je 5×10^5 RLI-negative bzw. RLI-positive U937-Zellen mit 400 μL Zellysat für sieben Stunden inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Erhaltungsmedium kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. wurde schließlich die Zellzahl der Ansätze bestimmt und jeweils eine Probe für die RNA-Extraktion entnommen (siehe Abb. 4.2-6). Als Negativkontrolle dienten Zellklone, die mit dem Zellysat Mock-transfizierter Zellen inokuliert wurden.

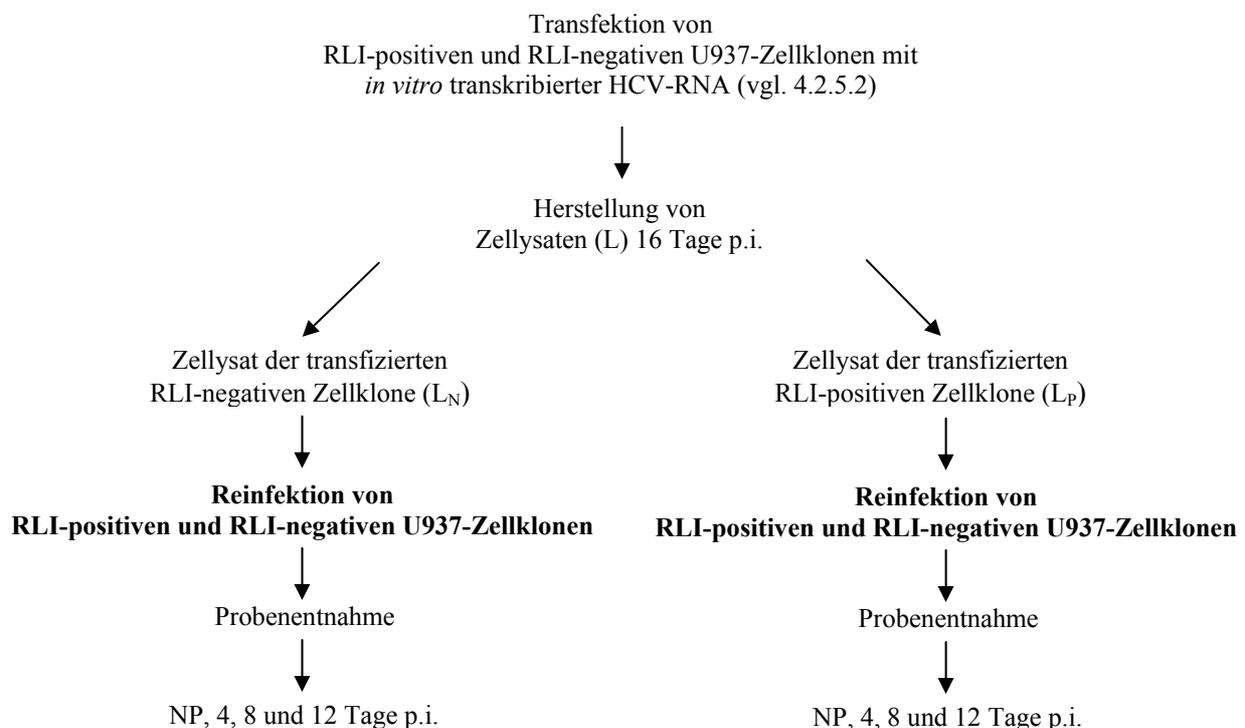


Abb. 4.2-6: Fließschema der Reinfektion von RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellklonen mit den Zellysaten aus 4.2.5.2.

Bei den reinfizierten, RLI-negativen U937-Zellklonen konnte weder in den Zellen, die mit dem Zellysat der HCV-transfizierten RLI-negativen U937-Zellen infiziert wurden, noch in den Ansätzen, die mit dem Zellysat der RLI-positiven Zellen inokuliert wurden HCV-RNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2-7A). Im Gegensatz dazu war in den reinfizierten, RLI-positiven U937-Zellen, die mit dem Lysat der HCV-transfizierten RLI-negativen U937-

Zellklonen aus 4.2.5.2 infiziert wurden, HCV-RNA am Nullpunkt, 4 Tage und 12 Tage nach der Infektion über die nested PCR detektierbar (siehe Abb. 4.2-7B). Demnach sind bei der ersten Infektion aus 4.2.5.2 tatsächlich infektiöse Virionen entstanden.

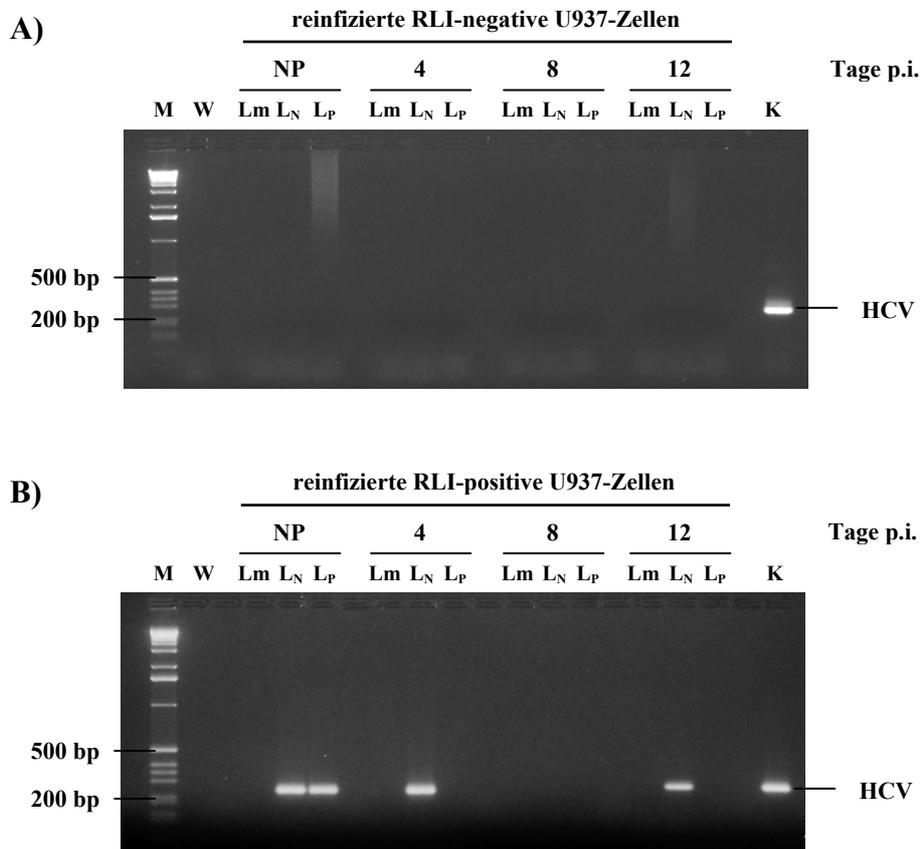


Abb. 4.2-7: Nachweis von HCV-Positivstrang-RNA in reinfizierten RLI-negativen bzw. RLI-positiven U937-Zellklonen über die nested PCR. 2×10^5 U937-Zellen wurden mit je 400 μ L Zellysats (L) der transfizierten Zellen aus 4.2.5.2 infiziert (Lm: Lysat der Mock-transfizierten RLI-neg. Zellklone; L_N: Lysat der HCV-transfizierten RLI-neg. Zellklone; L_P: Lysat der HCV-transfizierten RLI-pos. Zellklone). Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Tagen p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 μ L Zellextrakt. Je 1 μ g RNA wurde in die RT-PCR eingesetzt und je 1 μ L des RT-PCR-Produktes in die nested PCR. (A) Reinfizierte RLI-negative U937-Zellklone, (B) reinfizierte RLI-positive U937-Zellklone. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: 5 μ L RNA-Extrakt der HCV-Frischplasmaprobe Nr. 4)

Aufgrund der Tatsache, dass in den gesamten Infektionsansätzen zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme die Zellzahl annähernd gleich war, konnte auch ein direkter Vergleich der Replikationseffizienz zwischen den RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellklonen vorgenommen werden. Demnach konnte sich das Hepatitis C-Virus in den RLI-positiven U937-Zellklonen hier offensichtlich besser vermehren als in den RLI-negativen Zellklonen (siehe Abb. 4.2-7B).

Auf eine weitere Infektion von U937-Zellen mit Überständen aus diesem Reinfektionsansatz zur Adaptation des HCV wurde aber verzichtet, da aufgrund der sehr starken Proliferation der monozytären Zellen davon auszugehen war, dass sich die geringe Anzahl an Virionen schnell aus der Probe verdünnen würde und das Virus entsprechend nicht mehr nachweisbar wäre.

Insgesamt gesehen konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl FRhK4-Zellen als auch U937-Zellen permissiv für das Hepatitis C-Virus sind. Eine Adaptation des Virus, verbunden mit einer erhöhten Virusproduktion, gelang aber nicht.

4.3 Nachweis von HCV-RNA in transfizierten Zellen über den HDA und die PCR

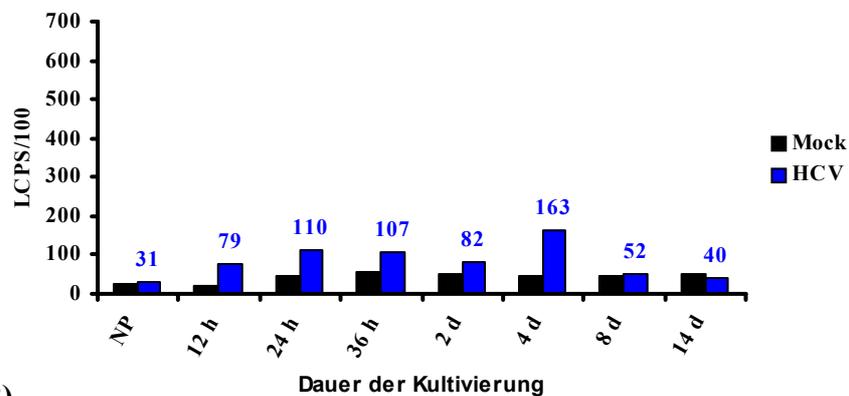
In einem letzten Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die neu etablierte Methode des HDA (siehe 4.1) tatsächlich für den Nachweis des Hepatitis C-Virus in Zellkulturen eignet und mit der herkömmlichen Methode der PCR konkurrieren kann. Dafür wurden RLI-positive sowie RLI-negative FRhK4- und U937-Zellklone mit HCV-RNA transfiziert und der Infektionserfolg über den HDA und die PCR kontrolliert.

4.3.1 Transfektion von FRhK4-Zellklonen

RLI-negative und RLI-positive FRhK4-Zellklone einer 6 cm Schale wurden mit Mock bzw. je 10 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA über die DEAE-Dextran-Methode transfiziert (siehe 3.12.1.1). Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Ansätze zweimal gespült und in Selektionsmedium kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Nullpunkt, 12 h, 24 h, 36 h, 2 d, 4 d, 8 d und 14 d p.i.) wurde die RNA aus den Zellen extrahiert. Es folgte der Nachweis des Replikationsintermediates von HCV mit der Negativstrang-spezifischen Sonde S/200-3 über den HDA, wobei jeweils 1 µg RNA-Extrakt eingesetzt wurde. Als Negativkontrollen wurden, neben der Substratkontrolle, alle Mock-Ansätze mit ausgewertet, um zu überprüfen, ob es zu unspezifischen Reaktionen der Sense-Sonde mit der zellulären RNA kam. Die Resultate der Mock-Kontrollen wurden dabei zur besseren Übersicht in der Grafik mit dargestellt. Ein Ergebnis wurde als positiv bewertet, wenn die Lumineszenz in dem jeweiligen HCV-Ansatz mindestens doppelt so groß war, wie der höchste Wert der mitgeführten Negativkontrollen.

Wie die Resultate der Abb. 4.3-1 zeigen, lagen die gemessenen Lumineszenzwerte der HCV-transfzierten RLI-negativen FRhK4-Zellen nur geringfügig über den Werten der Mock-infizierten Zellen (siehe Abb. 4.3-1A). Da die höchste mitgeführte Negativkontrolle in dem HDA einen Wert von 165 LCPS/100 besaß (siehe Abb. 4.3-1B; Mock, 2 d p.i.), war somit bei den HCV-transfzierten RLI-negativen Ansätzen keine Probe positiv. Im Gegensatz dazu lagen die Werte in den HCV-transfzierten RLI-positiven FRhK4-Zellen mit 376 LCPS/100 am Tag vier und 682 LCPS/100 am Tag acht teilweise deutlich über dem zweifachen Wert der höchsten mitgeführten Mock-Kontrolle (siehe Abb. 4.3-1B). D.h. am vierten und achten Tag p.i. konnte in den transfzierten RLI-positiven FRhK4-Zellklonen über den HDA tatsächlich HCV-Negativstrang-RNA nachgewiesen werden.

A)



B)

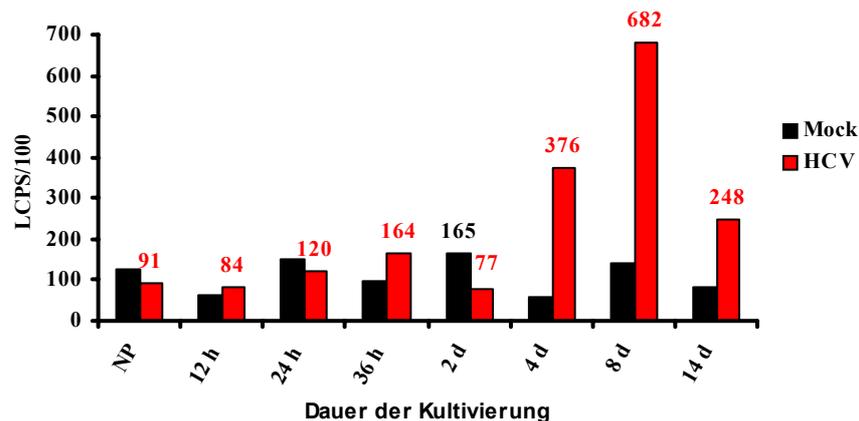


Abb. 4.3-1: Nachweis des Replikationsintermediates von HCV in transfzierten RLI-negativen bzw. RLI-positiven FRhK4-Zellklonen über den HDA. 10 fmol der Negativstrang-spezifischen Sonde S/200-3 wurden mit je 1 µg RNA-Extrakt der entsprechenden Mock- (schwarze Balken) oder der HCV-transfzierten RLI-negativen (blaue Balken) bzw. RLI-positiven FRhK4-Zellklone (rote Balken) hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 1416cx97 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (71 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. (A) transfzierte RLI-negative FRhK4-Zellen, (B) transfzierte RLI-positive FRhK4-Zellen. (NP: Nullpunkt)

Eine Auswertung der Ansätze über die nested PCR scheiterte. Es kam zu einer Kontamination der Proben während der Amplifikation der viralen Nukleinsäure (nicht dargestellt). Da eine Wiederholung der PCR nicht möglich war (die RNA-Extrakte waren teilweise aufgebraucht), konnten die Ergebnisse des HDA somit nicht mit denen der PCR verglichen werden.

4.3.2 Reinfektion von FRhK4-Zellen

Mit den Überständen der HCV-transfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklone aus 4.3.1, die sieben (Ü7) und 14 Tage p.i. (Ü14) gewonnen wurden, erfolgte die Reinfektion eines RLI-positiven Zellklones. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (NP, 4, 8 und 12 d p.i.) wurde jeweils ein Zellysat hergestellt und die virale RNA über die nested PCR detektiert. Dabei konnte am Nullpunkt (direkt nach der siebenstündigen Infektion) und 16 Tage p.i. sowohl HCV-Positivstrang (siehe Abb. 4.3-2B) als auch HCV-Negativstrang über die nested PCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-2A).

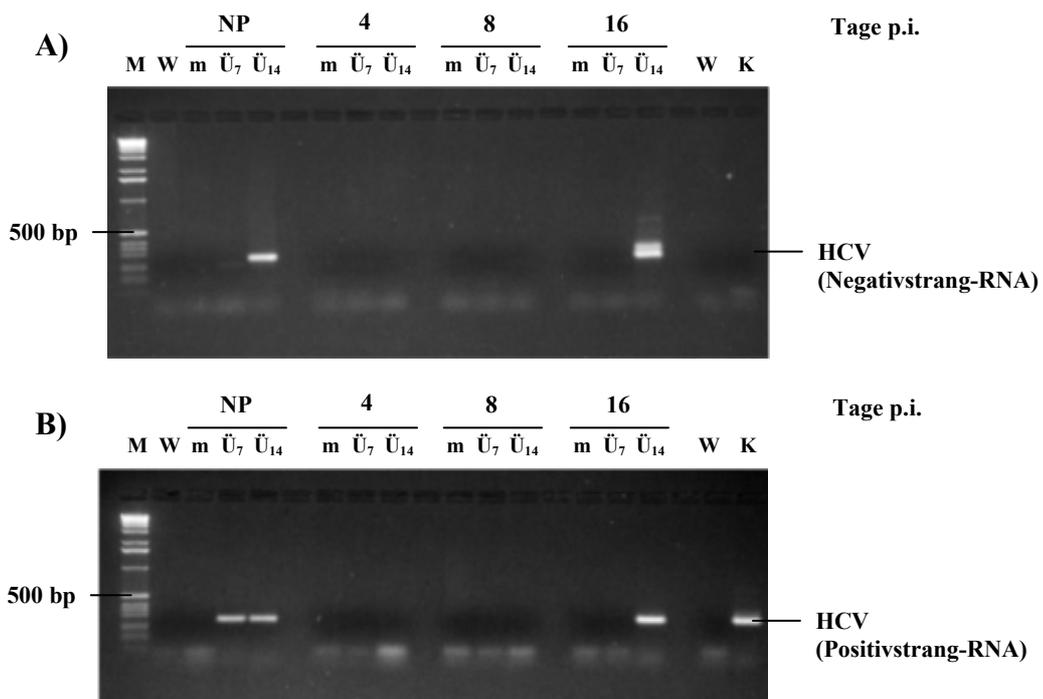


Abb. 4.3-2: Nachweis von HCV-Negativstrang- und HCV-Positivstrang-RNA in reinfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklonen über die nested PCR. RLI-positive FRhK4-Zellen wurden mit jeweils 500 µL Überstand der transfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellen aus 4.3.1 für 7 h infiziert (m: Reinfektion mit Überstand der Mock-transfizierten Zellen 16 d p.i.; Ü₇ bzw. Ü₁₄: Reinfektion mit Überstand der HCV-transfizierten Zellen 7 bzw. 14 d p.i.). Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Tagen p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 µL Zellextrakt. Je 3 µg RNA wurden in die reverse Transkription eingesetzt und 5 µL des RT-Produktes in die erste PCR. (A) Nachweis des HCV-Negativstranges, (B) Nachweis des HCV-Positivstranges. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: 5 µL RNA-Extrakt der HCV-Frischplasmaprobe Nr. 4)

Im Gegensatz dazu konnte in den gleichen Proben über den HDA keine HCV-RNA detektiert werden (nicht dargestellt).

4.3.3 Transfektion von U937-Zellklonen

RLI-negative und RLI-positive U937-Zellklone wurden mit je 10 µg infektiöser HCV-RNA mit dem TransMessenger Reagenz transfiziert, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. Zellextrakte hergestellt wurden (vgl. 4.2.5.2). Die erste Probenentnahme (Nullpunkt) erfolgte dabei etwa acht Stunden nach der Transfektion.

Beim Nachweis des Replikationsintermediates über die nested PCR wurde in den HCV-transfizierten RLI-positiven Zellklonen nur am Nullpunkt HCV-Negativstrang detektiert (vgl. Abb. 4.2-5B). In den RLI-negativen Klonen konnte hingegen zu allen Zeitpunkten nach der Transfektion Negativstrang-RNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-3).

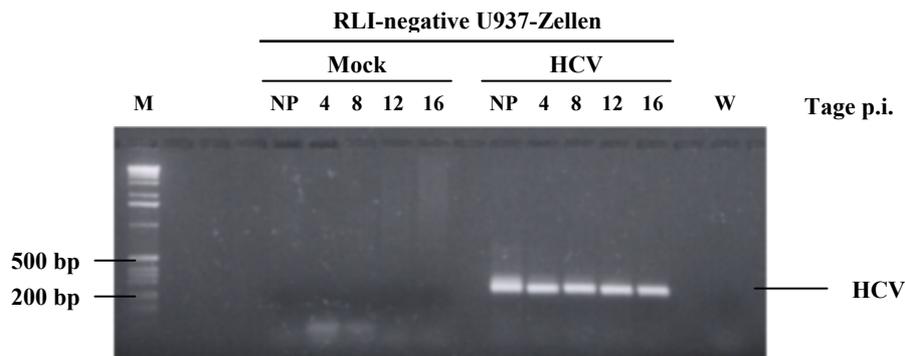


Abb. 4.3-3: Nachweis von HCV-Negativstrang-RNA in transfizierten RLI-negativen U937-Zellklonen über die RT-PCR. 2×10^5 U937-Zellen wurden mit je 10 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA transfiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Tagen p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 µL Zellextrakt. Nach einem anschließenden DNase-Verdau der Proben wurde je 1 µg RNA in die reverse Transkription eingesetzt und 5 µL des RT-Produktes in die erste PCR. Je 1 µL der cDNA aus der ersten PCR wurde für die nested PCR verwendet. Als Kontrolle für die Spezifität der Reaktion wurden 5 µL RNA-Extrakt der HCV-Frischplasmaprobe Nr. 4 mit in die RT-PCR eingesetzt. Die Proben fielen negativ aus (vgl. Abb. 4.2-5B). (M: Marker; W: Wasserkontrolle)

Eine Auswertung der Proben von den transfizierten RLI-negativen U937-Zellklonen über den HDA ist in der Abb. 4.3-4 wiedergegeben. Wiederum wurden die Mock-Kontrollen mit aufgeführt und ein Ergebnis als positiv bewertet, wenn die Lumineszenz doppelt so groß war, wie die der höchsten Negativkontrolle. Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass die gemessenen Werte der Sense-Sonde mit der zellulären RNA (Mock) erstmals unter der Substratkontrolle lagen, so dass alle Lumineszenzwerte der HCV-transfizierten U937-Zellen als positiv bewertet werden konnten. D.h. die Ergebnisse des HDA stimmten mit dem PCR-Ergebnis überein.

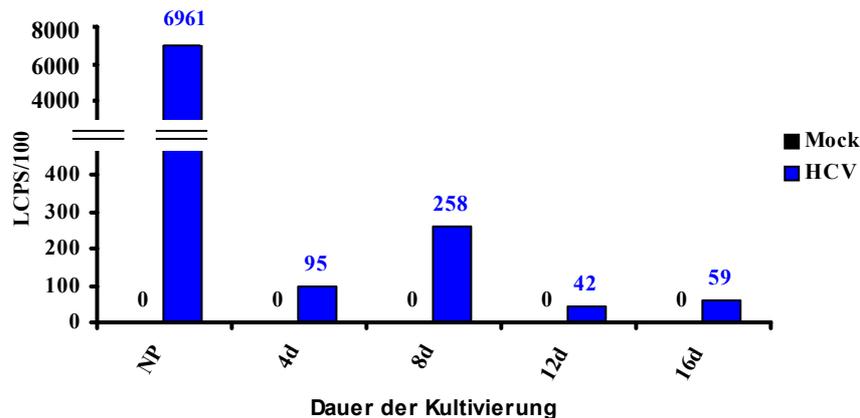


Abb. 4.3-4: Nachweis des Replikationsintermediates von HCV in transfizierten RLI-negativen U937-Zellen über den HDA. 5 fmol der Negativstrang-spezifischen Sonde S/200-Q2 wurden mit je 1 µg RNA-Extrakt der Mock- bzw. der HCV-transfizierten U937-Zellklone hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (40 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. (NP: Nullpunkt)

Bei der Betrachtung der Resultate fällt aber sofort der enorm hohe Wert von 6961 LCPS/100 auf, der direkt nach der Transfektion (acht Stunden p.i.) in den U937-Zellen gemessen wurde. Die übrigen Lumineszenzwerte der HCV-transfizierten Zellen waren im Vergleich dazu sehr niedrig. Vier Tage p.i. wurde nur eine Lumineszenz von 95 LCPS/100 gemessen, die acht Tage p.i. nochmals auf 298 LCPS/100 anstieg. Im weiteren Verlauf der Kultivierung fiel der Wert dann wieder deutlich ab und lag bei etwa 50 LCPS/100.

Ob es sich beim gemessenen Wert am Nullpunkt um das Replikationsintermediat oder möglicherweise um eine Fehlhybridisierung der Sense-Sonde mit der eingebrachten *in vitro* transkribierten HCV-RNA handelte, war zunächst unklar. Um dies zu überprüfen wurde daher ein weiterer Ansatz mit FRhK4-Zellen durchgeführt, in dem die Zellen, im Gegensatz zur Transfektion aus 4.3.1, insgesamt nicht zwei sondern ebenfalls für acht Stunden vor der ersten Probenentnahme kultiviert wurden (siehe 4.3.4).

4.3.4 Zweite Transfektion von FRhK4-Zellklonen

Ein RLI-negativer und zwei RLI-positive FRhK4-Zellklone (Zellklon Nr. 6 und Nr. 8) wurden mit Mock bzw. 5 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA mit dem TransMessenger Reagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach etwa achtstündiger Inkubation der Ansätze wurde die erste Probe genommen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4 d, 8 d, 12 d und 16 d p.i.)

weitere Zellextrakte hergestellt. Die RNA wurde aus den einzelnen Proben extrahiert, es folgte ein DNase-Verdau und der Nachweis der viralen RNA über die nested PCR oder den HDA.

Der Nachweis des Replikationsintermediates über die strangspezifische PCR, zeigte in allen HCV-transfizierten Zellen lediglich am Nullpunkt eine Bande (siehe Abb. 4.3-5). Dass es sich dabei eventuell um restliches, linearisiertes Plasmid aus dem Inokulum handeln könnte, wurde ausgeschlossen, da eine nested PCR mit den identischen Proben ohne die Reverse Transkriptase negativ ausfiel (nicht dargestellt).

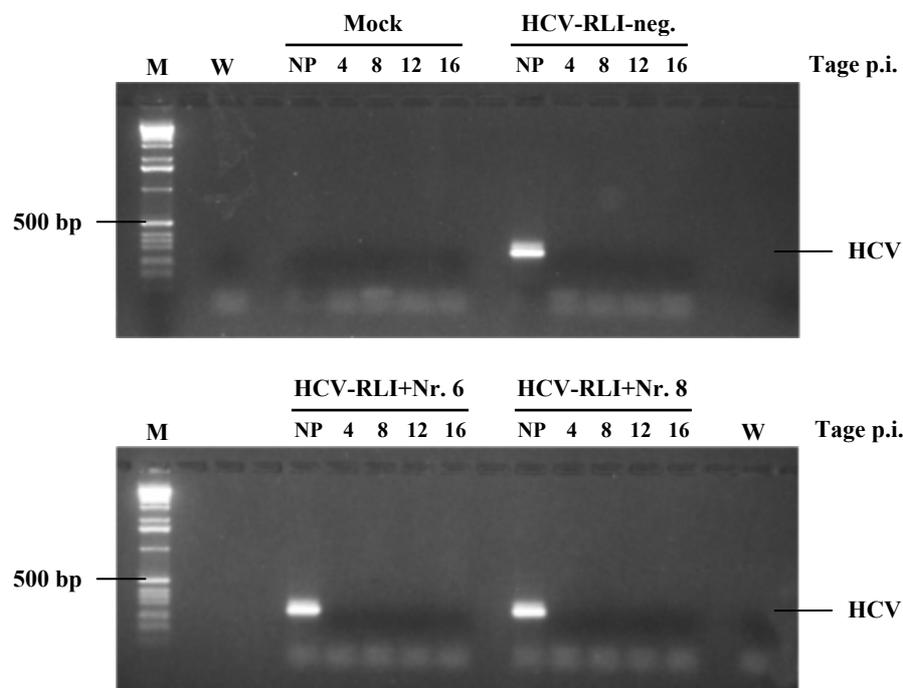


Abb. 4.3-5: Nachweis von HCV-Negativstrang-RNA in transfizierten RLI-negativen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen über die nested PCR. FRhK4-Zellklone wurden mit je 5 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA transfiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 µL Zellextrakt. Nach einem anschließenden DNase-Verdau der Proben wurden je 1 µg RNA in die reverse Transkription eingesetzt und 5 µL des RT-Produktes in die erste PCR. (M: Marker; W: Wasserkontrolle)

Die Ergebnisse des HCV-Negativstrang-Nachweises über den HDA stimmten dabei wieder mit dem PCR-Ergebnis überein. Auch hier konnte nur am Nullpunkt das vermeintliche Replikationsintermediat in den HCV-transfizierten Zellen detektiert werden (siehe Abb. 4.3-6). Die übrigen Proben waren negativ, wobei die gemessenen Werte sogar deutlich unter dem der Substratkontrolle (741 LCPS/100) lagen.

Obwohl die Resultate des HDA und der PCR erneut identisch waren, was eigentlich dafür spricht, dass hier direkt nach der Infektion möglicherweise doch die Negativstrang-RNA des HCV detektiert wurde, konnte ein falsch-positives Ergebnis der beiden Methoden nicht ausgeschlossen werden. Nähere Erkenntnisse sollte daher noch eine 14-Stunden-Kinetik liefern (siehe 4.3.5).

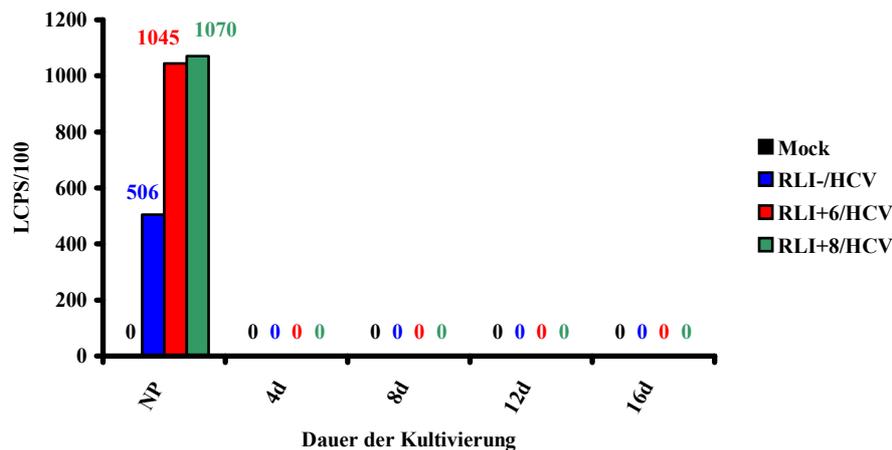


Abb. 4.3-6: Nachweis des Replikationsintermediates von HCV in transfizierten FRhK4-Zellen über den HDA. 2,5 fmol der negativstrangspezifischen Sonde S/200-Q2 wurden mit je 1 µg RNA-Extrakt der Mock- bzw. HCV-transfizierten FRhK4-Zellklone hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (741 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. (NP: Nullpunkt)

Neben dem Nachweis des Replikationsintermediates erfolgte mit den Ansätzen erstmals auch der Nachweis der Positivstrang-RNA des HCV über den HDA. Aufgrund der Tatsache, dass die Transfektion der Zellen mit *in vitro* transkribierter HCV-RNA erfolgte, musste aber mit einer sehr hohen Reaktion der Antisense-Sonde mit Resten des Inokulums gerechnet werden. Es überraschte daher auch nicht, dass die Lumineszenzwerte kurz nach der Transfektion mit etwa 32.000-43.000 LCPS/100 in den HCV-transfizierten Zellen enorm hoch waren (siehe Abb. 4.3-7; Nullpunkt).

Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahmen die Werte dann zunehmend ab und lagen schließlich 16 Tage p.i. bei den Mock transfizierten Zellen bzw. dem transfizierten RLI-negativen Zellklon unter der Substratkontrolle. Im Gegensatz dazu konnte bei den transfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklonen nach 16tägiger Kultivierung mit 178 LCPS/100 (Zellklon Nr. 8) und 2778 LCPS/100 (Zellklon Nr. 6) noch eine z.T. recht hohe Lumineszenz gemessen werden.

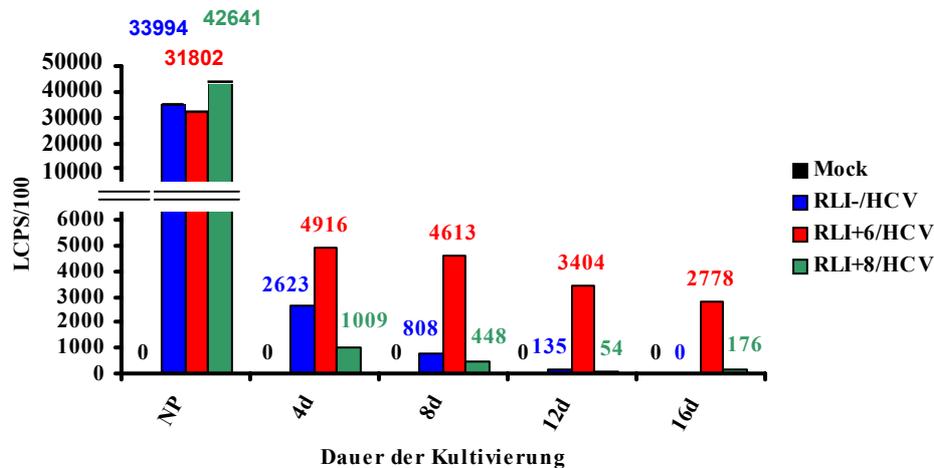


Abb. 4.3-7: Nachweis des Positivstranges von HCV in transfizierten FRhK4-Zellen über den HDA. Jeweils 5 fmol der Positivstrang-spezifischen Antisense-Sonde AS/588 wurden mit je 1 µg RNA-Extrakt der Mock- bzw. HCV-transfizierten FRhK4-Zellklone hybridisiert. Zum Nachweis der DNA:RNA-Hybride wurde der Anti-Hybrid-Antikörper mit der Lot.-Nr. 5366cx01 verwendet. Dargestellt sind die Lumineszenzwerte pro Sekunde geteilt durch 100 (LCPS/100), wobei der Wert der Substratkontrolle (420 LCPS/100) bereits abgezogen wurde. (NP: Nullpunkt)

Insgesamt gesehen ist es somit gelungen, über den HDA sowohl den Negativstrang als auch den Positivstrang des HCV in transfizierten Zellen nachzuweisen.

4.3.5 Durchführung einer 14-Stunden-Kinetik

In einem abschließenden Versuch sollte nun geklärt werden, ob es sich bei dem mehrfach beobachteten positiven Ergebnis etwa acht Stunden nach der Transfektion tatsächlich um das Replikationsintermediat des HCV handelte, oder ob hier möglicherweise ein falsch-positives Ergebnis der Negativstrang-spezifischen PCR und des HDA vorlag.

Zu diesem Zweck wurden RLI-positive FRhK4-Zellen mit Mock bzw. 5 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA mit dem TransMessenger Reagenz transfiziert und in Selektionsmedium kultiviert. Über einen Zeitraum von 14 Stunden wurde die RNA im Abstand von jeweils zwei Stunden aus den Zellen extrahiert. Es folgte ein DNase-Verdau der Proben und die Durchführung einer Negativstrang-spezifischen nested PCR mit je 1 µg RNA-Extrakt.

Bis auf den Zeitpunkt unmittelbar nach der Transfektion konnte in allen HCV-transfizierten Ansätzen, die von 2 bis 14 Stunden p.i. untersucht wurden, HCV-Negativstrang detektiert werden (siehe Abb. 4.3-8; HCV). Die Proben von drei entsprechenden Mock-Kontrollen waren hingegen negativ (siehe Abb. 4.3-8; Mock). Da alle Proben unter identischen PCR-Bedingungen aber ohne die Verwendung der Reversen Transkriptase ebenfalls negativ waren

(nicht dargestellt), konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den PCR-Produkten um amplifiziertes Plasmid aus Resten des Inokulums handelte.

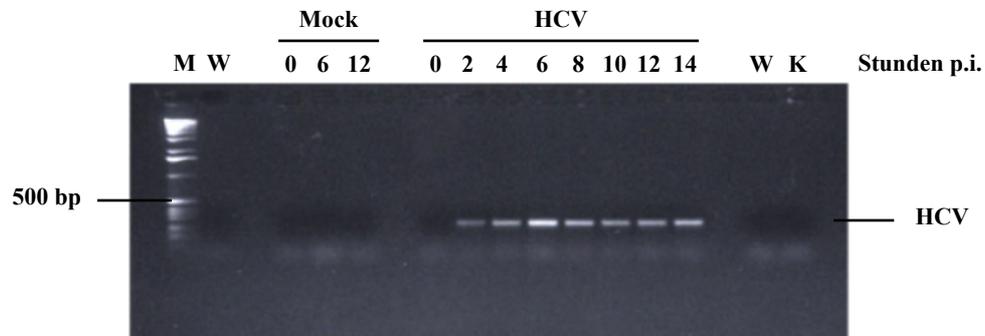


Abb. 4.3-8: Nachweis von HCV-Negativstrang-RNA in transfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellen über die nested PCR. Die RLI-positiven FRhK4-Zellklone wurden mit je 5 µg *in vitro* transkribierter HCV-RNA transfiziert. Die Extraktion der viralen Nukleinsäure erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. nach der modifizierten RNA-Extraktion nach Chomczynski aus jeweils 200 µL Zellextrakt. Nach einem anschließenden DNase-Verdau der Proben wurden je 1 µg RNA in die reverse Transkription eingesetzt und 5 µL des RT-Produktes in die erste PCR. (M: Marker; W: Wasserkontrolle; K: 9 µL RNA-Extrakt der HCV-Frischplasma-probe Nr. 4)

5 DISKUSSION

Nach der molekularen Charakterisierung des Hepatitis C-Virus durch CHOO et al. im Jahre 1989 (Choo et al., 1989) und der raschen Entwicklung der ersten serologischen Tests für die Immundiagnostik (Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989) wurde klar, dass das HCV bis zum Ende der 80iger Jahre das beherrschende äthiologische Agens der Posttransfusionshepatitiden darstellte (Alter et al., 1990; Weiner et al., 1990). Durch die konsequente Anwendung der serologischen Nachweisverfahren seit April 1991 sowie die Einführung der PCR zum Nachweis der viralen RNA für Blutspender im Oktober 1999, konnte aber das Risiko einer Übertragung durch Blutprodukte in den Industrieländern auf ein Minimum (1:200.000) reduziert werden (Schreier & Höhne, 2001). Dennoch sind etwa 3 % der Weltbevölkerung mit HCV infiziert, was vor allem wegen der hohen Wahrscheinlichkeit chronischer und teilweise progredienter Verläufe ein großes medizinisches und gesundheitspolitisches Problem darstellt (Schreier & Höhne, 2001).

Die Gründe für die hohe Rate an persistenten Infektionen sind bis heute nicht geklärt. Eine mögliche Ursache könnte hier die Heterogenität des HCV-Genoms und die Entstehung von Quasispezies sein (Martell et al., 1992; Weiner et al., 1992; Farci et al., 1994; Alter, 1995). Außerdem spielt möglicherweise die Hemmung der PKR durch die viralen Proteine E2 und NS5A bzw. die ausgesprochen geringe Replikation des HCV in diesem Zusammenhang eine Rolle (Gale et al., 1998; Taylor et al., 1999, Bartenschlager & Lohmann, 2000). Eine weitere Erklärung für die Persistenz könnte auch in den verschiedenen extrahepatischen Manifestationen des Virus liegen (vgl. 1.5).

In vielen Arbeitsgruppen erfolgten die Studien zu den extrahepatischen Manifestationen des HCV über den Nachweis des Replikationsintermediates, um falsch-positive Ergebnisse, verursacht durch Kontaminationen mit genomischer HCV-RNA, auszuschließen. Obwohl dabei in den meisten Fällen eine strangspezifische RT-PCR zum Einsatz kam, waren die Ergebnisse sehr widersprüchlich. Einige Forscher berichteten beispielsweise über den Nachweis der Negativstrang-RNA in PBMC chronisch HCV-infizierter Patienten (Wang et al., 1992; Willemis et al., 1994; Navas et al., 1994; Lerat et al., 1996; Muratori et al., 1996; Mellor et al., 1998), andere Kollegen hingegen konnten das virale Replikationsintermediat des HCV nicht in diesen Zellen detektieren (Lanford et al., 1995; Laskus et al., 1997).

Das Problem stellt hierbei die Negativstrang-spezifische PCR per se dar. Ein großer Nachteil der Methode ist das regelmäßige Auftreten falsch-positiver Ergebnisse durch unerwünschte Nebenreaktionen bei der reversen Transkription oder Kontaminationen während der Durchführung (Willems et al., 1993; Lanford et al., 1994; Lerat et al., 1996). Hinzu kommt die fehlende Standardisierung der Methode (Gowans, 2000). Es sind zwar mittlerweile verschiedene Verfahren etabliert worden, um die Strangspezifität während der RT-PCR zu erhöhen (Lanford et al., 1994; Lanford et al., 1995; Mellor et al., 1998; Sangar & Carroll, 1998; Craggs et al., 2001), dennoch ist es bisher nicht gelungen, ein einheitliches und allgemein akzeptiertes Verfahren zu entwickeln, das die Reproduzierbarkeit der Resultate gewährleistet.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ein zuverlässiges Nachweissystem speziell für die Detektion des Negativstranges von HCV zu etablieren, das als alternative Methode zur PCR in der Grundlagenforschung angewendet werden kann und eine gute Standardisierung in der Durchführung ermöglicht.

5.1 Etablierung eines PCR-unabhängigen Nachweissystems für HCV

Für die alternative Methode zum Nachweis des Hepatitis C-Virus wurde das Verfahren des Hybrid-Detection-Assays (HDA) von SCHMITZ und DOTZAUER gewählt, das bereits zur Detektion des Replikationsintermediates von HAV im Zellkultursystem eingesetzt wurde (Schmitz & Dotzauer, 1998).

Der HDA basiert auf der Hybridisierung der Target-RNA mit einer einzelsträngigen, 5'-biotinylierten DNA-Sonde. Die Hybridmoleküle werden an einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert und schließlich mit einem spezifischen, AP-gekoppelten DNA:RNA-Hybrid-Antikörper detektiert (Schmitz & Dotzauer, 1998).

Für die Etablierung des neuen Nachweissystems mussten also zunächst HCV-spezifische, 5'-biotinylierte ssDNA-Sonden in Sense- und Antisense-Orientierung hergestellt werden, deren Qualität anschließend im HDA über ebenfalls synthetisch hergestellte HCV-spezifische RNA-Transkripte überprüft werden sollte.

Aufgrund der starken Heterogenität des HCV-Genoms war es für die Konstruktion der HCV-spezifischen DNA-Sonden sehr wichtig, eine möglichst hoch konservierte Region als Zielsequenz für die Sonden auszuwählen. Dies sollte gewährleisten, dass der HDA später zum Nachweis verschiedener HCV-Genotypen geeignet ist. Dementsprechend wurde nur die 5'NTR/Core-Region der Subtypen 1a, 1b, 2a, 2b und 3a über das Computerprogramm Blast

am NCBI miteinander verglichen und daraus ein 429 bp-langer Bereich (nt 155 - nt 584 der cDNA des p90/HCV) mit einer Sequenzhomologie von 88-100 % als Target für die Herstellung der Sonden ausgewählt (siehe Tab. 4.1-1). Die Synthese der Sonden erfolgte schließlich mittels einer Run-Off-PCR (Sturzl & Roth, 1990).

5.1.1 Konstruktion HCV-spezifischer Sense-Sonden

Für die Herstellung der Sense-Sonden zum Nachweis des Negativstranges von HCV wurde das 429 bp-lange Template aus der 5'NTR/Core-Region des p90/HCV isoliert und zusammen mit dem Sense-Primer (Sonde HCV-s) in die PCR eingesetzt. Erstaunlicherweise entstanden dabei nicht nur ein, sondern zwei bis drei Run-Off-Produkte, die etwa auf der Höhe von 420 bp, 350 bp und 200 bp des DNA-Größenmarkers liefen (420 nt-, 350 nt- und 200 nt-Fragment; siehe Abb. 4.1-1). Um die Stringenz der Bedingungen zu verbessern, wurde daher in weiteren Ansätzen u.a. die Annealing-Temperatur erhöht bzw. PCR-Beschleuniger hinzugefügt. Dabei entstanden jedoch keine PCR-Produkte oder immer mehr als ein PCR-Produkt (vgl. 4.1.1.2).

Die Grundvoraussetzung für die Strangspezifität der HCV-Sonden stellt aber ihre Einzelsträngigkeit dar. D.h. es musste im folgenden überprüft werden, hinter welcher Bande sich möglicherweise ein einzelsträngiges DNA-Molekül verbirgt. Zu diesem Zweck wurden alle Amplifikationsprodukte entweder im denaturierenden Probenpuffer aufgetragen oder einem Restriktionsverdau unterzogen, da sowohl eine Denaturierung als auch der Verdau zu einer Veränderung des Laufverhaltens von doppelsträngigen DNA-Molekülen im Agarosegel führt, während diese Maßnahmen keinen Effekt auf die Wanderungsgeschwindigkeit einzelsträngiger DNA-Moleküle haben.

Es stellte sich heraus, dass das 420 nt- sowie das 350 nt-Fragment durch Endonukleasen gespalten werden konnte (siehe Abb. 4.1-3). Da beide Produkte zudem unter denaturierenden Bedingungen ihr Laufverhalten veränderten (siehe Abb. 4.1-2), lagen hier offensichtlich dsDNA-Moleküle vor. Beim 420 nt-Fragment handelt es sich höchstwahrscheinlich um die ursprüngliche Template-DNA aus der Run-Off-PCR. Die Identität des doppelsträngigen 350 nt-Fragmentes konnte hingegen nicht genau geklärt werden. Denkbar wäre ein Selfpriming der Template-DNA im Verlauf der PCR, was zur Verlängerung der Matrize und schließlich zu einem partiell doppelsträngigen Hybridmolekül geführt haben könnte. Vorstellbar ist aber auch, dass möglicherweise ein Fehlpriming des Sonden-Primers mit dem inkorrekten Strang zur Entstehung des 350 nt-Fragmentes geführt hat. Auf jeden Fall war das Fragment

als Negativstrang-spezifische Sonde zum Nachweis des HCV nicht geeignet, da bei seinem Einsatz im HDA sowohl mit dem Sense-Transkript als auch mit dem Antisense-Transkript hohe Lumineszenzwerte zustande gekommen waren (nicht dargestellt).

Im Gegensatz dazu hatte weder eine Denaturierung (siehe Abb. 4.1-2) noch ein Verdau durch Restriktionsendonukleasen (siehe Abb. 4.1-3) Auswirkungen auf das Laufverhalten des 200 nt-Fragmentes der Run-Off-PCR. D.h. es handelte sich bei diesem Run-Off-Produkt um die gesuchte einzelsträngige Sense-Sonde.

5.1.2 Konstruktion HCV-spezifischer Antisense-Sonden

Die Herstellung der Antisense-Sonden für die Detektion des Positivstranges von HCV gestaltete sich, im Vergleich zur Konstruktion der Sense-Sonden, deutlich schwieriger. Unter sehr unterschiedlichen Synthesebedingungen entstanden in verschiedenen Run-Off-Ansätzen mit dem 429 bp-langen Template aus dem p90/HCV und dem Antisense-Primer (Sonde HCV-as) zunächst nur doppelsträngige Fragmente mit einer Größe von 360, 170 und 150 Nukleotiden (siehe 4.1.1.3 und Abb. 4.1-4). Anscheinend kam es im Verlauf der Run-Off-PCR in diesen Ansätzen hauptsächlich zu einem Fehl- oder Selfpriming der Template-DNA. Möglicherweise hat die Ausbildung von Sekundärstrukturen hier sogar eine korrekte Bindung des Primers und damit die Synthese der Antisense-Sonde gänzlich verhindert.

Aus diesem Grund, wurde das bisherige 429 bp-lange Template gegen ein 665 bp-großes HCV-Insert ersetzt, das die Nukleotide 59-708 der cDNA des p90/HCV umfasste. Die Verlängerung der Matrize sollte das Template etwas stabilisieren und einer schnellen Ausbildung von Sekundärstrukturen an der korrekten Primerbindungsstelle entgegenwirken. In verschiedenen Ansätzen gelang es jedoch nicht die ssDNA-Sonde in Antisense-Orientierung über die Run-Off-PCR zu synthetisieren (siehe 4.1.1.3).

In einem letzten Versuch wurde schließlich für die Synthese der Sonde nicht nur die Taq-Polymerase sondern auch die Tth-Polymerase eingesetzt. Außerdem kam, neben dem zuletzt verwendeten Sondenprimer (Sonde HCV-as), ein zusätzlicher Antisense-Primer (SHCV AS/588) zum Einsatz, der etwas weiter stromabwärts in der Core-Region des 665 bp-langen Inserts bindet. Während der Gebrauch der Taq-Polymerase nicht zum gewünschten einzelsträngigen Run-Off-Produkt führte, konnte unter annähernd identischen Versuchsbedingungen mit der Tth-Polymerase die gesuchte Antisense-Sonde synthetisiert werden (siehe

Abb. 4.1-5). Da es sich, laut Angaben der Hersteller, bei beiden Enzymen um hoch prozessive 5'-3'-DNA-Polymerasen mit gleicher Funktion und Aktivität handelt, konnte die Ursache für dieses Phänomen nicht bei den verwendeten Enzymen liegen. Eine plausible Erklärung ist vielmehr in der Zusammensetzung der mitgelieferten und jeweils eingesetzten PCR-Puffer zu suchen. Im Gegensatz zum Taq-Puffer enthält der PCR-Puffer der Tth-Polymerase eine höhere Konzentration an Kaliumchlorid und zusätzlich Rinderserumalbumin sowie Tween 20. Alle drei Substanzen können die Effizienz einer PCR-Reaktion steigern, indem sie das Enzym stabilisieren und/oder das Primer-Annealing optimieren (Henegariu et al., 1997; Lottspeich & Zorbas, 1998), was möglicherweise den Ausschlag für die erfolgreiche Synthese der Antisense-Sonde gegeben hat.

5.1.3 Überprüfung der Spezifität der konstruierten Sonden

Um die Spezifität der hergestellten Sense- (S/200-1; S/200-2; S/200-3; S/200-Q1; S/200-Q2) und Antisense-Sonden (AS/normal; AS/588) überprüfen zu können wurden zunächst HCV-spezifische RNA-Moleküle beider Polaritäten (Kontrolltranskripte) konstruiert. Sie umfassten den kompletten Bereich der HCV-Sonden und besaßen eine Länge von etwa 670 Nukleotiden. Für die Herstellung der Kontrolltranskripte wurde ein 665 bp-langes Insert aus der 5'NTR/Core-Region der HCV-cDNA des infektiösen Plasmides p90/HCV in die Vektoren pSP64 und pSP65 ligiert und somit unter die Kontrolle des SP6-Promotors gebracht (siehe 4.1.2). Die Wahl von zwei Systemen statt einem bidirektionalen Vektor sollte dabei sicherstellen, dass bei der nachfolgenden *in vitro* Transkription nur RNA-Moleküle einer definierten Polarität entstehen konnten. Bemerkenswert war, dass die Ligation von Vektor und Insert insgesamt gesehen deutlich erfolgreicher verlief, wenn die 665 bp-langen HCV-Inserts vor ihrem Verdau mit Hind III und EcoR I zunächst einer Blunt End Ligation unterzogen wurden (siehe 4.1.2). Vermutlich wurden die endständig gelegenen Restriktionsschnittstellen im unligierten Insert von den Restriktionsenzymen nicht so gut erkannt wie die Schnittstellen, die nach der Blunt End Ligation der Inserts in eine zentralere Position gebracht wurden. Der vermeintlich bessere Verdau der ligierten Insert wirkte sich somit positiv auf die gesamte Ligation von Vektor und Insert aus.

Die Überprüfung der Spezifität der HCV-Sonden erfolgte schließlich mit unterschiedlichen Konzentrationen der synthetisch hergestellten Kontrolltranskripte über den HDA. Es zeigte sich, dass sowohl die Sense- als auch die Antisense-Sonden sehr spezifisch für ihre jeweiligen Kontrolltranskripte waren. Die Kreuzreaktion der Sense-Sonden mit dem Sense-Transkript

lag insgesamt zwischen 0 % und maximal 4 % (siehe Tab. 4.1-2 bis Tab. 4.1-4). Die Fehlhybridisierungen der Antisense-Sonden mit den Kontrolltranskripten in Antisense-Orientierung lag hingegen stets unter 1 % (siehe Tab. 4.1-5).

Auffallend waren dabei die Unterschiede zwischen den Sense-Sonden, die über eine normale Phenol/Chloroform-Extraktion (S/200-1, S/200-2 und S/200-3) oder den Kit der Firma Qiagen (S/200-Q1 und S/200-Q2) aufgereinigt wurden. Beispielsweise waren die maximalen Lumineszenzwerte der herkömmlich aufgereinigten Sense-Sonde (S/200-3) mit dem Antisense-Transkript, trotz der höheren Sondenkonzentration, deutlich niedriger als die vergleichbaren Werte mit den über den Kit aufgereinigten Sonden (siehe Tab. 4.1-4). 10 fmol der Sense-Sonde S/200-3 erreichten hier mit dem Kontrolltranskript in Negativstrangorientierung eine Lumineszenz von 89.434 LCPS/100 bei einer Kreuzreaktion von 0,54 %. Eine Hybridisierung von nur 2 fmol der Sense-Sonde S/200-Q2 mit der gleichen Menge Antisense-Transkript führte hingegen in demselben HDA zu einem Lumineszenzwert von 154.995 LCPS/100 bei einer Kreuzreaktion von 0,52 %. Die Ursache ist sicherlich im Reinheitsgrad der unterschiedlich aufgereinigten Sonden begründet, da die übrigen Versuchsbedingungen identisch waren. Möglicherweise sind bei der herkömmlichen Isolierung über eine Phenol/Chloroform-Extraktion u.a. Phenolreste in der Probe zurück geblieben, die die Hybridisierung der Sonde mit der Target-RNA negativ beeinflusst hat. D.h. je nach Art der Aufreinigung benötigt man mehr oder weniger der konstruierten Sonden, um vergleichbar hohe Messwerte zu erzielen.

Interessant war außerdem, dass Sonden, die unter identischen Bedingungen synthetisiert und isoliert wurden, ebenfalls geringfügige Unterschiede in ihrer Qualität vorwiesen (vgl. S/200-Q1 und S/200-Q2; Tab. 4.1-4). Zudem konnte auch mit ein und derselben Sonde von HDA zu HDA eine Schwankung in den Signalintensitäten beobachtet werden, obwohl die identische Menge an Sonde und Kontrolltranskript verwendet wurde. Das zeigt, dass Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Sondenkonzentration und kleine Abweichungen in der Versuchsdurchführung des jeweiligen HDA zusätzlich einen geringen Einfluss auf die Lumineszenzwerte haben können.

Ein wichtiger Faktor für die Signalstärke in einem HDA stellt auch die Qualität des Antikörpers dar. In dieser Arbeit erzielte der Antikörper mit der Lot-Nr. 5366cx01 deutlich höhere Lumineszenzwerte als der Antikörper mit der Lot-Nr. 1416cx97 (vgl. S/200-3 in Tab. 4.1-3 und Tab. 4.1-4).

Aufgrund der unterschiedlichen Parameter, die die Spezifität einer Sonde beeinflussen können, sollten daher die absoluten Messwerte nur innerhalb eines HDA verglichen werden. Außerdem muss die Qualität jeder konstruierten Sonde in mehreren Vorversuchen überprüft und ihre geeignete Konzentration stets individuell ermittelt werden, bevor sie für weitere Versuche zum Einsatz kommt. Die Kreuzreaktion sollte dabei so klein wie möglich ausfallen. In dieser Arbeit wurden dementsprechend nur noch Sonden verwendet, bei denen die Fehlhybridisierung unter 2 % lag.

Eine wichtige Voraussetzung für den Nachweis der viralen RNA in biologischem Probenmaterial über den HDA ist, dass es nicht zu einer übermäßigen Fehlhybridisierung der spezifischen Sonden mit zellulärer RNA kommt. Zusätzlich ist bei der Detektion des Replikationsintermediates immer mit einem hohen Überschuss an Positivstrang-RNA zu rechnen. Im Lebergewebe von Schimpansen oder HCV-infizierten Patienten konnte beispielsweise die virale Plusstrang-RNA in einer maximal zehnfach höheren Menge als der Negativstrang nachgewiesen werden (Shimizu et al., 1992; Lanford et al., 1995; Craggs et al., 2001). In PBMC betrug das Verhältnis von Plus- zu Minusstrang-RNA sogar bis 1:100 (Wang et al., 1992; Lerat et al., 1996). Es wurde daher in weiteren Versuchen getestet, welchen Einfluss der Zusatz von zellulärer RNA auf die Spezifität der Sonden hat und inwieweit sich ein 50facher Überschuss der Kontrolltranskripte in Positivstrang-Orientierung auf die Detektion des Antisense-Transkriptes auswirkt. Zusätzlich wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Sense-Sonde mit dem vollständigen HCV-Genom (isoliert aus der Plasmaprobe Nr. 4) hybridisiert.

Während nach der Hybridisierung der Sense-Sonde S/200-1 mit 3 µg der HCV-RNA aus dem Blutplasma eines chronisch infizierten Patienten (HCV-Plasmaprobe Nr. 4) keine Kreuzreaktion beobachtet werden konnte (siehe 4.1.4; 3 µg HCV-RNA entsprechen einer Menge von etwa 900 fmol), war in einem weiteren HDA mit der S/200-3 Sonde eine Fehlhybridisierung von nur 0,3 % mit 1 µg HCV-RNA des gleichen Patienten zu verzeichnen (siehe Tab. 4.1-6). Bei der hohen Konzentration der viralen RNA ein sehr gutes Ergebnis.

Etwas anders verhielt es sich bei der Hybridisierung der Sonden mit zellulärer RNA. In verschiedenen HDA trat nach der Reaktion der Antisense-Sonde AS/588 mit 1 µg zellulärer RNA eine Kreuzreaktion von 0,7-0,9 % und mit der Sense-Sonde S/200-3 von immerhin 2,7 % auf, während mit der Sense-Sonde S/200-Q2 kein Lumineszenzsignal messbar war (siehe Tab. 4.1-6). Zunächst wurde ein Sonden-spezifisches Phänomen vermutet. Weitere

Untersuchungen zeigten jedoch, dass nach einer Hybridisierung von ein und derselben Sonde mit 1 µg zellulärer RNA, unabhängig von der verwendeten Zelllinie, die Kreuzreaktion recht unterschiedlich ausfiel (vgl. Tab. 4.1-6, Tab. 4.1-7, Abb. 4.1-9 und Abb. 4.1-10). Dementsprechend wichtig war es daher, für die spätere Detektion von HCV in Zellextrakten, diese Kontrolle stets mitzuführen und gegebenenfalls von den anderen Lumineszenzwerten abzuziehen, wenn der Wert über dem der Substratkontrolle liegen sollte.

In einem weiteren Experiment wurde schließlich überprüft, welchen Einfluss ein 50facher Überschuss des Sense-Transkriptes auf die Detektion des Antisense-Transkriptes hat. In zwei unabhängig voneinander initiierten HDA mit jeweils 10 fmol Sense-Sonde S/200-3, 1 µg zellulärer RNA und 100 amol des Negativstrang-Transkriptes konnten keine signifikanten Auswirkungen auf den Nachweis des Antisense-Transkriptes durch die erhöhte Menge des Sense-Transkriptes beobachtet werden (siehe Tab. 4.1-7). Im Gegensatz dazu nahmen die Lumineszenzwerte nach der Hybridisierung von 2,5 fmol Antisense-Transkript mit der 50fachen Menge des Sense-Transkriptes (im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe des Überschusses) um etwa 30 % ab (siehe Tab. 4.1-7). Vermutlich kam es beim Einsatz von 2,5 fmol des Antisense-Transkriptes und dem 50fachen Überschuss des Sense-Transkriptes vermehrt zu einer Hybridisierung der beiden komplementären Transkripte miteinander, was dazu führte, dass die Sense-Sonde insgesamt weniger Target-Moleküle binden konnte. Bei einer verringerten Transkriptmenge, trat dieser Effekt nicht mehr auf, da vermutlich die räumliche Nähe zwischen den komplementären Transkripten nicht mehr so stark gegeben war und sich die stärkere Bindungsaffinität zwischen der Sonde und dem Antisense-Transkript durchsetzte.

5.1.4 Überprüfung der Sensitivität der konstruierten Sonden

Nachdem die Spezifität der HCV-spezifischen Sonden überprüft wurde, erfolgte die Untersuchung ihrer Sensitivität. Zu diesem Zweck wurden exemplarisch zwei Sense-Sonden (S/200-1 und S/200-Q2) und eine Antisense-Sonde (AS/588) mit einer abnehmenden Menge der Kontrolltranskripte inkubiert und das Ausmaß der Hybridisierung über den HDA ausgewertet.

Die Nachweisgrenzen der Sonden für die Detektion des jeweils komplementären Kontrolltranskriptes lagen zwischen 20 und 50 amol (siehe Abb. 4.1-6 bis Abb. 4.1-8). Damit lag die Nachweisgrenze der HCV-spezifischen Sonden noch unter dem Detektionslimit von 100 amol für die HAV-spezifische Negativstrang-Sonde (Schmitz & Dotzauer, 1998).

Aufgrund der Tatsache, dass der Level einer HCV-Replikation *in vivo* und *in vitro* ausgesprochen gering ist, werden für die Detektion des HCV im biologischen Probenmaterial äußerst sensitive Methoden benötigt (Sangar & Carroll, 1998; Gowans, 2000). Entscheidend war daher die Frage, inwieweit die Anwesenheit der zellulären RNA eines Zellextraktes die bereits ermittelte Sensitivität der Sonden beeinflussen könnte.

Erfreulicherweise lag die Nachweisgrenze der Sense- und Antisense-Sonden trotz der Zugabe von 1 µg zellulärer RNA weiterhin zwischen 20 und 50 amol (siehe Abb. 4.1-9 und Abb. 4.1-10), d.h. der Zusatz von zellulärer RNA zur Probe hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Sensitivität der Sonden.

Insgesamt gesehen ist es also gelungen mit dem Hybrid-Detection-Assay eine PCR-unabhängige Methode zu etablieren, die spezifisch für den Nachweis von HCV-RNA geeignet war.

Als untere Nachweisgrenze für den HDA wurde die Menge von 20 amol ermittelt. Obwohl der Assay damit nicht das Detektionslimit einer PCR von ungefähr 10-100 Kopien (Wick, 2000; Schweitzer & Kingsmore, 2001) bzw. 0,02-0,2 zmol erreicht, ist die Methode verhältnismäßig sensitiv. Außerdem besitzt der HDA gegenüber einer RT- bzw. nested PCR viele Vorteile.

Im Vordergrund steht hier die Möglichkeit zur direkten Quantifizierung der Target-RNA, was u.a. neue Erkenntnisse bezüglich der Replikationskinetik des HCV liefern könnte. Ein weiterer Vorteil liegt in der schnellen und einfachen Durchführung des Assays und der damit verbundenen guten Standardisierung der Methode. Außerdem können, im Vergleich zur PCR, deutlich mehr Proben gleichzeitig bearbeitet werden, was die Auswertung der Ergebnisse in der Grundlagenforschung prinzipiell erleichtert. Ein weiterer großer Vorteil des HDA gegenüber der PCR ist auch die geringere Kontaminationsanfälligkeit des Assays. Der verwendete Hybrid-AK bindet zudem nicht an ssDNA oder ssRNA (Schmitz, 1997; Schmitz & Dotzauer, 1998), so dass weder die konstruierten HCV-spezifischen Sonden noch zelluläre RNA-Moleküle auf diese Weise zu unspezifischen Reaktionen führen können. Verunreinigungen mit Plasmid-DNA (DNA:DNA-Hybrid) oder virale RNA:RNA-Hybride können mit dem Antikörper ebenfalls nicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da derartigen Hybriden das Biotin fehlt, um an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte binden zu können.

Ob sich jedoch das neu etablierte, PCR-unabhängige Nachweisverfahren aufgrund der äußerst geringen Vermehrung des HCV tatsächlich zum Nachweis der viralen RNA *in vitro* eignet

und mit der sehr sensitiven Methode der PCR konkurrieren kann, wurde zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit untersucht.

5.2 Studien zur Entwicklung eines *in vitro* Systems

Neben der Etablierung des PCR-unabhängigen Nachweissystems für das Hepatitis C-Virus, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, ein Zellkultursystem für HCV zu schaffen, in dem sich das Virus im erhöhten Maße replizieren kann. Wie wichtig die Etablierung eines derartigen *in vitro* Systems ist, verdeutlicht u.a. die Tatsache, dass es eine Schutzimpfung gegen HCV bislang nicht gibt und viele chronisch HCV-infizierte Patienten auf die zur Verfügung stehende Standardtherapie nicht reagieren (Pawlotsky, 2000).

Die aktuelle Standardtherapie einer HCV-Infektion besteht aus einer Behandlung mit pegyliertem Interferon-alpha (PEG-IFN) in Kombination mit Ribavirin. Die Verknüpfung des Interferons mit Polyethylenglykol (PEG) erhöht dabei lediglich das Molekulargewicht des Proteins und trägt somit zu einer längeren Verweildauer des Wirkstoffes im Blut bei (McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Di Bisceglie & Hoofnagle, 2002).

Warum die Kombinationstherapie nur bei etwa 50-60 % der chronisch HCV-infizierten Personen mit einer dauerhaften Eliminierung des Virus verbunden ist, konnte bis heute nicht genau geklärt werden. Man weiß aber, dass der Erfolg einer Therapie sowohl vom Genotyp als auch von der Viruslast im Blut des Patienten abhängt. Infektionen mit den Genotypen 2 bzw. 3 gehen z.B. mit einer kurzen Erkrankungsdauer und einer geringen Viruskonzentration im Serum einher (Martinot-Peignoux et al., 1998; McHutchison et al., 1998; Poynard et al., 1998; Pawlotsky, 2000).

Eine große Rolle in diesem Zusammenhang spielt sicherlich auch die genetische Komplexität des HCV. In einigen Studien korrelierte beispielsweise eine hohe Anzahl von Quasispezies zu Beginn der Therapie mit einer Interferonresistenz (Pawlotsky et al., 1998; Pawlotsky, 2000). Zusätzlich scheint auch die Sequenz des NS5A von HCV einen Einfluss auf den Therapieerfolg mit Interferon zu haben (Enomoto et al., 1996; Pawlotsky et al., 1998).

Unterstützt wird diese Hypothese durch *in vitro* Experimente mit dem HCV-Nichtstrukturprotein. Diese zeigten, dass das NS5A (sowie das E2-Protein) die Interferon-induzierte PKR hemmt, was einen prinzipiellen Mechanismus der Resistenz des HCV gegenüber Interferon darstellen könnte (Gale et al., 1997; Gale et al., 1998; Taylor et al., 1999). Welche Faktoren jedoch letztlich für die häufig beobachtete Interferonresistenz entscheidend sind, ist nach wie

vor unklar. Es besteht also ein dringender Bedarf an Aufklärung und wirksameren Medikamenten.

Da man aber aufgrund eines fehlenden Zellkultursystems weder die genauen Zusammenhänge der Pathogenese des HCV kennt, noch über ausreichende Informationen über die Replikation und die Morphogenese des Virus verfügt, ist die Entwicklung neuer Therapeutika extrem schwierig.

Aus diesem Grund war es eine weitere Intention dieser Arbeit, ein Zellkultursystem für das Hepatitis C-Virus zu entwickeln, das eine hohe Produktion infektiöser Virionen erlaubt. Der Nachweis des HCV erfolgte dabei zunächst ausschließlich über die PCR, da der HDA als alternative Methode zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand.

5.2.1 Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis des HCV

Aufgrund der Schwierigkeiten, die sich anfänglich bei der Detektion der HCV-RNA aus definitiv HCV-haltigen Plasmaproben über die PCR ergaben (siehe 4.2.1), musste vorab die RNA-Extraktionsmethode verbessert werden, um einen zuverlässigen Nachweis des Virus über die hausinterne PCR gewährleisten zu können. Einen deutlichen Effekt auf die Sensitivität der Methode nach Chomczynski hatte hierbei eine Anpassung der Konzentrationen der verwendeten Substanzen des eingesetzten Lysepuffers (siehe Abb. 4.2-1) sowie die Zugabe von Glykogen kurz vor der Fällung der Nukleinsäure im Verlauf der Extraktion (siehe Abb. 4.2-2). Bei der Modifikation des Lysepuffers war vermutlich die erhöhte Menge an Guanidiniumisothiocyanat (hemmt RNasen) ausschlaggebend. Der Zusatz von Glykogen als sogenanntes Carrier-Molekül ermöglichte hingegen die verbesserte Präzipitation der sehr geringen Mengen an viraler RNA aus den HCV-haltigen Plasmaproben.

Insgesamt gesehen gelang es durch die beschriebenen Veränderungen eine RT-PCR zu etablieren, mit der nun eine zuverlässige Detektion des HCV im biologischen Probenmaterial möglich war.

5.2.2 Infektion von Fibroblasten und FRhK4-Zellen mit HCV

Nach der erfolgreichen Optimierung der RT-PCR zur Detektion des HCV wurden Haut- und Knochenmarkfibroblasten sowie fetale Nierenzellen des Rhesusaffens (FRhK4-Zellen) mit HCV infiziert. Die Infektion der Knochenmarkfibroblasten und der FRhK4-Zellen erfolgte dabei im Rahmen eines zufälligen Screenings, die Hautfibroblasten wurden hingegen ganz gezielt infiziert, da eine Studie von ZIBERT et al. bereits Hinweise für eine mögliche Replika-

tion des HCV in Hautfibroblasten lieferte (Zibert et al., 1995). Der Infektionserfolg der einzelnen Ansätze wurde jeweils mittels nested PCR überprüft.

Während die Infektion der beiden Fibroblastenzelllinien erfolglos verlief (siehe 4.2.2.1 und 4.2.2.2), konnte in den Zellextrakten der FRhK4-Zellen, die mit einer HCV-haltigen Plasmaprobe infiziert wurden, in der ersten und dritten Woche p.i. überraschenderweise HCV-RNA nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.2-1). Aufgrund der Tatsache, dass in dem gleichen Ansatz direkt nach der Infektion und zwei Wochen p.i. keine virale RNA detektiert werden konnte, war dies ein erster kleiner Hinweis auf eine für HCV permissive Zelllinie.

5.2.3 Infektion von FRhK4-Zellen und RLI-positiven FRhK4-Zellklonen mit HCV

Für die Bestätigung der bisherigen Ergebnisse sollten bei der nachfolgenden HCV-Infektion, neben den FRhK4-Zellen, auch ein FRhK4-Zellklon mitgeführt werden, der stabil mit dem RNase L-Inhibitor (RLI, RLI-positiver FRhK4-Zellklon) transfiziert war (Gotter, 1999).

Der RLI gehört zu den Komponenten des 2'-5'-Oligoadenylatsystems (2-5A-System; vgl. Abb. 1.4-1) und verhindert durch seine reversible Bindung an die RNase L deren Aktivierung und damit den Abbau der viralen und zellulären RNA (Bisbal et al., 1995; Bisbal et al., 2001).

Ein Grund für die Berücksichtigung von RLI-positiven FRhK4-Zellklonen im Rahmen einer HCV-Infektion waren Studien von GOTTER und KURTH, die zeigten, dass die Replikation verschiedener Hepatitis A-Virusvarianten in einem RLI-positiven Zellklon (Nr. 6) erhöht ist (Gotter, 1999; Kurth, 2001). Für den Einsatz der RLI-positiven FRhK4-Zellklone sprach außerdem die Tatsache, dass auch andere Viren, wie das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) und Enzephalomyokarditisviren (EMCV), über die Hochregulation des RLI und die damit einhergehende Inhibition der RNase L-Aktivität ihre Virusproduktion steigern konnten (Martinand et al., 1998; Martinand et al., 1999). Eine Untersuchung von YU et al. zeigte zudem, dass in Leberbiopsien chronisch HCV-infizierter Patienten die Expression des RLI (bei gleichbleibendem RNase L-Level) vermindert war (Yu et al., 2000), was für eine Beteiligung des 2-5A-Systems bei der Regulation der Replikation des HCV spricht. Es war also naheliegend, dass ein RLI-positiver FRhK4-Zellklon die Vermehrung des HCV fördern und damit die Chance für die Etablierung eines Zellkultursystems verbessern könnte.

Da die von GOTTER hergestellten RLI-positiven FRhK4-Zellklone jedoch nur über die Neomycin-Resistenz des transfizierten Plasmides selektioniert wurden (Gotter, 1999), erfolgte

zuvor die Kontrolle der erfolgreichen Insertion des RLI-ORF sowie die anschließende Überprüfung der RLI-Expression ausgewählter Zellklone.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Insertion des RLI-ORF wurde aus den zur Verfügung stehenden zehn RLI-positiven FRhK4-Zellklonen (Gotter, 1999) die DNA extrahiert und mit Hilfe unterschiedlicher Primerkombinationen aus dem pcDNA 3 und dem RLI eine PCR initiiert. Nur vier der untersuchten RLI-positiven FRhK4-Zellklone (Zellklon Nr. 6, 7, 8 und 10) enthielten dabei das RLI-ORF, wobei im Zellklon Nr. 6 der CMV-Enhancer und -Promotor nicht integriert waren (siehe Tab. 4.2-2). Demnach ist eine Selektion von transfizierten Zellen über eine Antibiotikaresistenz noch kein endgültiger Beweis für eine erfolgreiche Transfektion von Zellen. Dieses Ergebnis erklärt zudem einen bereits gescheiterten Versuch, das RLI-ORF auf Genomebene im RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 nachzuweisen (Kurth, 2001), da bei den Studien Primerkombinationen zum Einsatz kamen, von denen einer stets innerhalb des CMV-Promotors binden sollte.

Unklar war aber noch, ob die erfolgreiche Insertion des RLI-ORF im RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6, Nr. 8 und Nr. 10 gleichzeitig mit einer Steigerung der RLI-Expression verbunden war. Bevor die HCV-Infektion durchgeführt wurde, erfolgte daher in zwei weiteren Experimenten der Versuch, die zu erwartende Überexpression des RLI in den drei genannten RLI-positiven FRhK4-Zellklonen auf Transkriptions- und Translationsebene darzustellen. Als Kontrollansätze dienten einerseits FRhK4-Zellklone, die stabil mit dem pcDNA/RLI 3'(-) transfiziert waren (RLI-negative FRhK4-Zellklone) und andererseits nicht-transfizierte FRhK4-Zellen.

Beim Nachweis der RLI-Expression auf Transkriptionsebene, konnten zwar vereinzelt stärkere RLI-Banden in den RLI-positiven Zellklonen Nr. 6, Nr. 8 und Nr. 10 detektiert werden als in den FRhK4-Zellen oder den RLI-negativen Zellklonen (siehe 4.2.3.2), ein aussagekräftiger quantitativer Vergleich war hier aber nicht möglich. Wie bei GOTTER misslang auch die Detektion des Proteins über den Immunoblot (siehe 4.2.3.3), vermutlich durch die mangelnde Spezifität des anti-RLI-Antikörpers (Gotter, 1999). D.h. es konnte keine quantitative Aussage bezüglich der Translationseffizienz des RLI getroffen werden.

Dennoch weist das Ergebnis der PCR zum Nachweis des RLI auf Transkriptionsebene vage auf eine Überexpression der RLI-mRNA hin, wobei der Verlust des Promotors beim RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6, im Vergleich zum RLI-positiven Zellklon Nr. 8 und Nr. 10, anscheinend keine Auswirkungen hatte.

Da diese Beobachtung außerdem mit den erhöhten HAV-Titern im RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 korreliert (Gotter, 1999; Kurth, 2001; Heitmann, 2002), wurde dieser Zellklon für die nachfolgende Infektion ausgewählt.

Nach der vierstündigen Infektion von FRhK4-Zellen und dem RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6, konnte in den Zellextrakten der FRhK4-Zellen zu keinem Zeitpunkt p.i. virale RNA detektiert werden (siehe Tab. 4.2-3). Lediglich unmittelbar nach der Infektion war im Überstand HCV-RNA nachweisbar, wobei es sich aber offensichtlich um restliches Inokulum gehandelt hat. Demnach ist die zweite Infektion der FRhK4-Zellen insgesamt nicht so erfolgreich verlaufen wie die erste Infektion.

Positiv zu vermerken war jedoch, dass im HCV-infizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 nicht nur direkt nach der Infektion, sondern auch zwei und drei Wochen p.i. HCV-RNA in den Zellextrakten detektiert werden konnte, während die Zellextrakte von der ersten und der vierten Woche p.i. negativ waren (siehe Tab. 4.2-3).

Dieses Ergebnis stellt also nicht nur ein weiteres Indiz dafür dar, dass FRhK4-Zellen permissiv für das Hepatitis C-Virus sind, sondern lieferte zudem auch einen ersten Hinweis für die Hypothese, dass das HCV in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen möglicherweise etwas besser replizieren kann als in den entsprechenden Vergleichszellen.

5.2.4 Versuch einer Adaptation des HCV

In einem nachfolgenden Experiment wurde schließlich versucht, das HCV, das sich möglicherweise in geringen Mengen im Überstand der infizierten FRhK4-Zellen und -Zellklone aus 4.2.3.4 befand, über Zellpassagen anzupassen, um auf diese Weise die Virusproduktion zu erhöhen. Dabei konnte der HCV-Positivstrang in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen früher detektiert werden als in den RLI-negativen Zellklonen (siehe 4.2.4.1). Dies spricht ebenfalls dafür, dass der zusätzlich eingebrachte RLI einen positiven Einfluss auf die Replikation des HCV haben könnte.

Die HCV-infizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklone mussten jedoch in der dritten Passage abgebrochen werden, da in den Ansätzen ein CPE auftrat, der eine weitere Kultivierung der Zellen unmöglich machte. Auslöser des CPE war höchstwahrscheinlich eine HAV-Coinfektion, die aus ungeklärter Ursache sowohl in den RLI-positiven, als auch in den RLI-negativen FRhK4-Zellklonen auftrat. Diese Vermutung stützt sich dabei auf eine Studie von KURTH, in der nicht cytopathogene HAV-Varianten in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen einen CPE induzierten, während HAV-infizierte RLI-negative FRhK4-Zellklone keine Anzei-

chen einer cytophagenen Infektion entwickelten (Kurth, 2001). Es war somit nicht verwunderlich, dass die HCV-infizierten RLI-negativen FRhK4-Zellklone weiter kultiviert werden konnten. Die HCV-RNA war dabei von der vierten bis zur neunten Passage über fünf Monate lang sporadisch mit der nested PCR nachweisbar. In der 10. und 11. Passage konnte hingegen keine virale RNA mehr detektiert werden und die Ansätze wurden schließlich abgebrochen (siehe 4.2.4.1). Eine Adaptation des Virus gelang somit nicht.

Nachdem der erste Versuch einer Adaptation des HCV gescheitert war, erfolgte ein weiterer Ansatz, bei dem FRhK4-Zellen und der RLI-positive FRhK4-Zellklon Nr. 6 erneut mit den Überständen einer vorangegangenen Infektion inokuliert wurden (siehe 4.2.4.2). Dabei konnte sowohl in den FRhK4-Zellen als auch in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. HCV-RNA nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.2-4). Demnach müssen bei der ersten Infektion der FRhK4-Zellen geringe Menge infektiöser Virionen entstanden sein, die in diesem Ansatz zu einer Neuinfektion der Zellen geführt haben.

Sogar die Überstände, in denen bei der ersten Infektion der FRhK4-Zellen keine virale RNA nachweisbar war, führten hier zu einer Reinfektion der Zellen, (vgl. Tab. 4.2-1; Überstand aus der ersten und dritten Woche p.i.). Dies verdeutlicht, dass es sich um extrem geringe Mengen an Viruspartikeln in den jeweiligen Proben gehandelt haben muss, die nicht immer über die nested PCR detektiert werden konnten. Ursache dieses Problems ist die RNA-Extraktion per se, bei der geringe Unterschiede in der Durchführung bzw. der Fällung der HCV-RNA über Erfolg und Misserfolg des Nachweises entscheiden können, wenn die Menge an Template-RNA extrem niedrig ist. Dennoch zeigt dieser Versuch, dass FRhK4-Zellen tatsächlich permissiv für das Hepatitis C-Virus sind.

In einer weiteren Viruspassage mit den Überständen der reinfizierten Zellen und mehreren nachfolgenden Zellpassagen konnte jedoch keine HCV-RNA mehr detektiert werden, so dass die Adaptation des Virus erneut misslang.

Die Hypothese, dass das HCV in RLI-positiven FRhK4-Zellklonen besser repliziert als in normalen FRhK4-Zellen, konnte hier erstmals nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurde bei dieser Reinfektion in den Proben der FRhK4-Zellen häufiger HCV-RNA nachgewiesen als in den RLI-positiven Zellklonen (vgl. Tab. 4.2-4).

Das wiederum könnte bedeuten, dass die bisher beobachteten Abweichungen im Replikationsverhalten von HCV zwischen FRhK4-Zellen und -Zellklonen möglicherweise auf geringe

Unterschiede in der Vitalität der jeweiligen Zellen oder auf leichte Divergenzen in der Konfluenz der infizierten Kulturen zum Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen sind.

PIETSCHMANN et al. konnten nämlich zeigen, dass in Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden ein höherer HCV-Level detektierbar ist als in nicht proliferierenden Zellen (Pietschmann et al., 2001). Ursache hierfür ist vielleicht die Tatsache, dass sich in wachstumsarretierten Zellen generell ein höherer Level an RNase L befindet als in proliferierenden Zellen (Jacobsen et al., 1983; Krause et al., 1985), was dazu führt, dass die virale RNA unterschiedlich schnell degradiert wird (vgl. Abb. 1.4-1).

5.2.5 Transfektion von U937-Zellen und -Zellklonen

Auf der weiteren Suche nach einem Zellkultursystem wurden U937-Zellen für eine HCV-Infektion ausgewählt. U937-Zellen sind neoplastische Vorläuferzellen (Monoblasten) humaner Monozyten, die bei vielen Vertretern der *Flaviviridae* eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen (Fields, 2001). Da humane Monozyten/Makrophagen zudem scheinbar die HCV-Replikation unterstützen (Bouffard et al., 1992; Mendoza et al., 1996; Sansonno et al., 1996b; Caussin-Schwemling et al., 2001), bestand die Hoffnung, dass die Monoblasten eventuell auch die Replikation des HCV fördern könnten.

Da eine erste Infektion von U937-Zellen mit HCV bereits vage Hinweise dafür lieferte, dass die Zellen permissiv für das Virus sein könnten (siehe 4.2.5), wurden für eine zweite Infektion zunächst RLI-positive (U937-Zellen, die stabil mit dem pcDNA3/RLI 3' transfiziert waren) und RLI-negative U937-Zellklone (U937-Zellen, die stabil mit dem pcDNA3/RLI 3'(-) transfiziert waren) hergestellt, um durch das zusätzlich eingebrachte RLI möglicherweise die Replikation des HCV zu fördern und damit die Chance auf ein Zellkultursystem zu erhöhen.

Für die Herstellung der RLI-positiven sowie RLI-negativen U937-Zellklone wurden verschiedene Transfektionsmethoden eingesetzt. Während nach der Calcium/Phosphat-Transfektion kein Zellklon selektioniert werden konnte, waren es bei der Elektroporation vier positive und acht negative U937-Zellklone und nach der Transfektion mit dem Superfect-Reagenz der Firma Qiagen jeweils über 90 Zellklone (siehe 4.2.5.1).

Diese enormen Unterschiede in der Transfektionseffizienz waren überraschend, da eine Calcium/Phosphat-Transfektion bei adhärennten Zellen bislang sehr erfolgreich verlief. Für die verhältnismäßig schwierige Transfektion von nicht-adhärennten Zellen war aber offensichtlich das Superfect-Reagenz am effektivsten. Bei dem Reagenz handelt es sich, laut Angaben des

Herstellers, um spezielle Dendrimere, die mit der DNA kompakte Strukturen ausbilden und den Eintritt in die Zelle vermitteln. Nach der Aufnahme der Komplexe über die Endozytose und der Verschmelzung vom Endosom und Lysosom inhibieren die Dendrimere die lysosomalen Nukleasen und stabilisieren den Superfect/DNA-Komplex, was den Erfolg der Transfektion gegenüber der anderen Methoden offensichtlich deutlich verbesserte.

Die RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellklone wurden mit *in vitro* transkribierter, infektiöser HCV-RNA transfiziert. Im Vergleich zu vorherigen Infektionen mit dem HCV-Plasma konnte somit wesentlich mehr infektiöse RNA in die Zellen eingebracht werden, was den Infektionserfolg verbessern sollte. Die Zellen wurden für 16 Tage im Selektionsmedium kultiviert, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. eine Probe für die RNA-Extraktion entnommen und eine gewisse Anzahl der U937-Zellklone in Anwesenheit von PMA inkubiert wurde.

Agenzien wie Phorbolster (PMA) oder Vitamin D3 stoppen die Proliferation der U937-Zellen und induzieren gleichzeitig ihre Differenzierung vom Monozyten- zum Makrophagenphänotyp (Sachs, 1978; Harris & Ralph, 1985). Sollten diese Zellen tatsächlich permissiv für HCV sein, bestand die Hoffnung, dass ein Replikationsnachweis hier nicht nur über die PCR sondern zusätzlich über auftretende Differenzierungsstörungen der monozytären Zellen erfolgen könnte, wie es WÜNSCHMANN für eine HAV-Infektion zeigen konnte (Wünschmann et al., 2002).

Der Nachweis der viralen Replikation in den U937-Zellen erfolgte über die Detektion des Negativstranges von HCV mit Hilfe der strangspezifischen PCR, um zwischen der in die Zellen eingebrachten Inokulum-RNA und der neu synthetisierten viralen RNA unterscheiden zu können und einen direkten Hinweis auf eine gegebenenfalls vorliegende HCV-Replikation zu erhalten. Dabei konnte in den Zellextrakten der RLI-positiven U937-Zellklone nur direkt nach der Infektion (sieben Stunden p.i.) das Replikationsintermediat detektiert werden, während in den RLI-negativen Zellklonen zu allen Zeitpunkten p.i. die virale RNA nachgewiesen wurde (siehe Abb. 4.2-5).

Nachdem durch PCR-Kontrollen ohne die Reverse Transkriptase ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den Banden der HCV-transfizierten RLI-negativen Zellklone um restliches, amplifiziertes Plasmid aus dem Inokulum handelte (siehe 4.2.5.2), stellte sich die Frage, was in diesem Ansatz u.a. am Nullpunkt vervielfältigt wurde. Handelte es sich bereits sie-

ben Stunden nach der Transfektion um den Nachweis des Negativstranges von HCV oder kam es im Verlauf der RT-Reaktion vielleicht zu einem Fehlpriming des Sense-Primers und damit zur Amplifikation des eingebrachten Positivstranges? Die Beantwortung der Frage war zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen recht schwierig, weil ein alleiniger Nachweis der HCV-Negativstrang-RNA über die RT-PCR, trotz des Einsatzes der Tth-Polymerase, keine 100 %ige Strangspezifität gewährleistet (Gowans, 2000).

Die Tatsache, dass die Proben der RLI-positiven Zellklone bis auf den Zeitpunkt unmittelbar nach der Transfektion aber alle negativ waren (siehe Abb. 4.2-5B), spricht dafür, dass es sich bei den übrigen Banden der RLI-positiven U937-Zellklone 4, 8, 12 und 16 Tage p.i. (siehe Abb. 4.2-5A) nicht um eine Amplifikation der Inokulum-RNA handelte.

Auch eine Untersuchung von Yoo et al. unterstützt diese Vermutung. Er und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Inokulum-RNA nach einer erfolgten Transfektion von Zellen maximal etwa 11 Tage p.i. über die Positivstrang-PCR nachweisbar war (Yoo et al., 1995). D.h. bei den Banden 12 und 16 Tage nach der Transfektion handelte es sich offensichtlich um die amplifizierte RNA des HCV, die im Verlauf der Replikation des Virus gebildet wurde.

Die Kultivierung der transfizierten U937-Zellklone mit PMA brachte in diesem Zusammenhang leider keine neuen Erkenntnisse. Zu keinem Zeitpunkt p.i. konnten Unterschiede in der Differenzierung von Mock- bzw. HCV-transfizierten Zellen beobachtet werden (siehe 4.2.5.2).

Die Bestimmung der Zellzahl in den unterschiedlichen Infektionsansätzen zeigte zudem, dass bei dem RLI-positiven U937-Zellklon ein Großteil der Zellen direkt nach der Transfektion verloren gegangen war (vermutlich beim Spülen der Zellen), so dass hier ein direkter Vergleich der Replikationseffizienz zwischen dem RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellklon nicht möglich war.

Um zu überprüfen, ob bei der Transfektion der U937-Zellklone tatsächlich infektiöse Virionen entstanden waren, wurden im folgenden eine Reinfektion mit den Zellysaten der HCV-transfizierten U937-Zellklone durchgeführt (siehe 4.2.5.3).

Während in den reinfizierten RLI-negativen U937-Zellklonen keine virale RNA detektiert werden konnte, waren die reinfizierten RLI-positiven Zellklone, die mit dem Zellysate der HCV-transfizierten RLI-negativen U937-Zellklone infiziert wurden, am Nullpunkt, 4 und 12 Tage p.i. positiv (siehe Abb. 4.2-7). D.h. es müssen bei der ersten Transfektion der Zellen

infektiöse Virionen entstanden sein, die in diesem Ansatz zu einer Neuinfektion der Zellen geführt haben.

Da in den gesamten Infektionsansätzen zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme die Zellzahl zudem annähernd gleich war, konnte auch ein direkter Vergleich der Replikationseffizienz zwischen RLI-negativen und RLI-positiven U937-Zellklonen vorgenommen werden. Die Vermutung, dass sich das zusätzlich eingebrachte RLI positiv auf die Replikation des HCV auswirkt, schien sich in diesem Versuchsansatz somit zu bestätigen (siehe Abb. 4.2-7).

Aufgrund der starken Proliferation der U937-Zellen wurde jedoch auf eine weitere Infektion zur Adaptation des HCV verzichtet, da davon auszugehen war, dass sich die geringe Anzahl an Virionen schnell aus der Probe verdünnen würde.

Insgesamt gesehen zeigen die hier dargestellten Ergebnisse erstmals, dass sowohl FRhK4-Zellen als auch U937-Zellen permissiv für das Hepatitis C-Virus sind. Belegt wird dies u.a. durch die teilweise sehr lange Infektionsdauer und der Möglichkeit zur Reinfektion dieser Zellen mit Überständen oder Zellysaten aus HCV-infizierten Kulturen. Außerdem liefern die Ergebnisse erste vage Hinweise dafür, dass die RLI-positiven Zellklone möglicherweise eine HCV-Replikation fördern könnten.

Verschiedene Versuche das Hepatitis C-Virus an die FRhK4-Zellen zu adaptieren, schlugen aber fehl. D.h. die Etablierung eines Zellkultursystems verbunden mit einer erhöhten Virusproduktion misslang.

5.3 Nachweis von HCV-RNA über den HDA und/oder die PCR

In einem letzten Abschnitt dieser Arbeit sollte nun getestet werden, ob sich das neu etablierte Nachweissystem des HDA für die Detektion der HCV-RNA *in vitro* eignet und mit der sehr sensitiven Methode der PCR konkurrieren kann.

Für diese Untersuchungen wurden sowohl FRhK4-Zellen als auch U937-Zellen mit HCV-RNA transfiziert und der Infektionserfolg über den HDA bzw. die PCR kontrolliert.

5.3.1 Transfektion von FRhK4-Zellen

In einem ersten Infektionsansatz wurde zunächst getestet, ob das Replikationsintermediat des HCV nach einer Transfektion von FRhK4-Zellen mit dem HDA detektiert werden kann. Zu diesem Zweck wurden RLI-negative und RLI-positive FRhK4-Zellklone mit HCV transfiziert und die Zellextrakte im HDA analysiert.

In den Proben der HCV-transfizierten RLI-positiven FRhK4-Zellklone konnte sowohl am vierten als auch am achten Tag p.i. HCV-Negativstrang-RNA über den HDA detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren die Proben der RLI-negativen Zellklone komplett negativ (siehe Abb. 4.3-1). Das Ergebnis zeigte einerseits, dass die neu etablierte Methode des HDA zum Nachweis der HCV-RNA aus biologischem Probenmaterial geeignet ist. Andererseits bestätigt es zum wiederholten Male die Beobachtung, dass die virale RNA in den RLI-positiven Zellklonen eher nachweisbar ist als in den RLI-negativen Zellklonen.

Obwohl diese Resultate nicht mit der PCR verglichen werden konnten (es kam zu einer Kontamination der Ansätze) scheint der zusätzlich eingebrachte RLI somit tatsächlich einen positiven Einfluss auf die Replikation des HCV zu haben. Demnach waren möglicherweise nur die widersprüchlichen Ergebnisse der reinfizierten FRhK4-Zellen und -Zellklone aus 4.2.4.2 auf eine unterschiedliche Vitalität und/oder Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen, was dazu führte, dass in dem Ansatz das HCV in den FRhK4-Zellen besser replizierte als in den RLI-positiven Zellklonen.

Ein Vergleich dieser HDA-Daten mit den Studien anderer Arbeitsgruppen zeigt zudem, dass zwischen dem vierten und dem achten Tag p.i. der Level an HCV-RNA vereinzelt höher ist als zwei bis drei Tage nach der Infektion oder im weiteren Verlauf der Kultivierung (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1993; Mizutani et al., 1996; Muratori et al., 1996; Pietschmann et al., 2001). D.h. anscheinend wird bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion ein erstes Maximum der Virusreplikation erreicht.

Bei der nachfolgenden Reinfektion des RLI-positiven FRhK4-Zellklons Nr. 6 mit den Überständen der im HDA positiven FRhK4-Zellklone aus 4.3.1 konnte dann erneut am Nullpunkt und 16 Tage p.i. HCV-RNA über die nested PCR detektiert werden (siehe Abb. 4.3-2).

Ein Nachweis der viralen Nukleinsäure in den gleichen Proben über den HDA gelang hingegen nicht. D.h. das Detektionslimit des HDA war bei diesem Reinfektionsansatz erreicht, was deutlich macht, wie gering die Menge an viraler RNA in den Proben gewesen sein musste. Das Ergebnis zeigte aber auch, dass der HDA in punkto Sensitivität nicht ganz mit der nested PCR konkurrieren kann.

5.3.2 Transfektion von U937-Zellen

Bei der Transfektion von U937-Zellklonen stimmten die Ergebnisse der beiden Methoden überein. Sowohl über die PCR (siehe Abb. 4.3-3) als auch über den HDA (siehe Abb. 4.3-4)

konnte am Nullpunkt, 4, 8, 12 und 16 Tage p.i. HCV-Negativstrang-RNA in den transfizierten RLI-negativen U937-Zellklonen nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der über den HDA ermittelten Lumineszenzwerte fällt auf, dass am vierten Tag p.i. (95 LCPS/100) der Wert zunächst stark abgefallen und am achten Tag p.i. wieder leicht angestiegen war (siehe Abb. 4.3-4). D.h. es wurde zum gleichen Zeitpunkt wie im ersten HDA ein Maximum erreicht (vgl. Abb. 4.3-1B), was dafür spricht, dass hier etwa acht Tage p.i. wirklich der Negativstrang des HCV über den HDA detektiert wurde.

Betrachtet man sich jedoch den hohen Lumineszenzwert von 6961 LCPS/100, der acht Stunden nach der Transfektion im HDA gemessen wurde und vergleicht diesen Wert mit den Signalintensitäten der übrigen Proben (42-258 LCPS/100), muss erneut die Frage gestellt werden, was am Nullpunkt nachgewiesen wurde. Dass es sich bereits um große Mengen an Negativstrang-RNA des HCV handelte, die im Zuge einer rasch einsetzenden Replikation des Virus synthetisiert wurde, schien zunächst äußerst unwahrscheinlich zu sein. Die Tatsache, dass hier jedoch zwei unterschiedliche Nachweismethoden zum gleichen Ergebnis führten spricht hingegen dafür, dass hier möglicherweise doch HCV-Negativstrang detektiert wurde.

Ob es sich am Nullpunkt wirklich um das Replikationsintermediat oder möglicherweise um ein falsch positives Ergebnis gehandelt hat, konnte aber zunächst nicht geklärt werden.

5.3.3 Zweite Transfektion von FRhK4-Zellen

In einer weiteren Transfektion von FRhK4-Zellen wurde erstmals der Versuch unternommen, den Positivstrang des Hepatitis C-Virus über den HDA zu detektieren, andererseits erfolgte erneut der Nachweis des Replikationsintermediates von HCV über den HDA und die PCR. Im Gegensatz zur ersten Transfektion von FRhK4-Zellen aus 4.3.1 wurden die FRhK4-Zellen nach ihrer Transfektion nicht für zwei sondern für acht Stunden vor der ersten Probenentnahme kultiviert, um die Ergebnisse mit denen der transfizierten U937-Zellen vergleichen zu können.

Beim Nachweis des Positivstranges von HCV über den HDA waren die Lumineszenzwerte am Nullpunkt erwartungsgemäß sehr hoch, da hier die restliche Inokulum-RNA detektiert wurde (siehe Abb. 4.3-7). Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahmen die Werte dann aber zunehmend ab, wobei nach 16tägiger Kultivierung nur noch in den RLI-positiven FRhK4-Zellklonen HCV-RNA detektiert werden konnte, während die negativen Zellklone sowie die Mock-transfizierten Zellen negativ waren. Aufgrund der bereits erwähnten Untersuchung von YOO et al., die zeigte, dass die Inokulum-RNA maximal 11 Tage nach der Transfektion von

Zellen über die PCR nachweisbar war (Yoo, 1995), kann davon ausgegangen werden, dass es sich 16 Tage nach der Transfektion um die virale RNA des HCV handelte, die im Verlauf der Replikation des Virus gebildet wurde. D.h. über den HDA kann auch die Positivstrang-RNA des HCV detektiert werden. Zusätzlich weist dieses Ergebnis wiederum darauf hin, dass sich das Hepatitis C-Virus in den RLI-positiven Zellklonen besser vermehren kann als in den negativen Zellklonen.

Auffällig ist jedoch der deutliche Unterschied in den gemessenen Lumineszenzen zwischen den beiden RLI-positiven Zellklonen. Während beim RLI-positiven Zellklon Nr. 8 nach 16tägiger Kultivierung der Zellen nur eine Lumineszenz von 176 LCPS/100 messbar war, erzielte die vergleichbare Probe des RLI-positiven Zellklons Nr. 6 mit 2778 LCPS/100 einen deutlich höheren Wert (siehe Abb. 4.3-7). D.h. im Vergleich zum Zellklon Nr. 8 lag beim Zellklon Nr. 6 deutlich mehr Positivstrang-RNA vor. Ähnliche Beobachtungen konnte auch HEITMANN in ihren Studien zum Vergleich der Replikationseffizienz des HAV in den jeweiligen Zellklonen machen (Heitmann, 2002). In ihren Untersuchungen erreichten unterschiedliche Virusvarianten des HAV (HAV-GBM, HAV-7) im RLI-positiven FRhK4-Zellklon Nr. 6 ebenfalls einen deutlich höheren Titer als im Zellklon Nr. 8.

Vielleicht wirkte sich beim RLI-positiven Zellklon Nr. 8 das deutlich langsamere Wachstum der Zellen (eventuell bedingt durch die ungünstigere Integration des RLI-ORF in das zelluläre Genom) negativ auf die Replikation des HAV/HCV aus und kompensierte so den potentiellen Effekt des RLI.

Beim Nachweis des Replikationsintermediates von HCV stimmten die Ergebnisse der nested PCR erneut mit denen des HDA überein. In allen Proben konnte hier nur am Nullpunkt eine Bande bzw. eine Lumineszenz nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3-5 und Abb. 4.3-6). Da erneut zwei unterschiedliche Methoden zum gleichen Ergebnis führten, unterstützt dies die Vermutung, dass es sich bei den bisherigen Resultaten vom Nullpunkt möglicherweise doch um die Detektion des Replikationsintermediates von HCV handeln könnte und nicht um falsch-positive Ergebnisse.

Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass die in diesem HDA gemessenen Lumineszenzen am Nullpunkt (acht Stunden p.i.) in den beiden transfizierten RLI-positiven Zellklonen mit 1045 LCPS/100 bzw. 1070 LCPS/100 etwa doppelt so hoch ausgefallen waren als der Wert, der für die transfizierten RLI-negativen Zellklone ermittelt wurde (siehe Abb. 4.3-6).

5.3.4 14-Stunden-Kinetik

Um weitere Anhaltspunkte bezüglich einer frühzeitig einsetzenden Replikation des HCV zu gewinnen, wurde in einem letzten Versuch eine 14-Stunden-Kinetik durchgeführt. Dafür wurde der RLI-positive FRhK4-Zellklon Nr. 6 mit *in vitro* transkribierter HCV-RNA transfiziert und alle zwei Stunden nach der Transfektion Zellextrakte hergestellt sowie die RNA isoliert. Da die bisherigen, positiven Ergebnisse am Nullpunkt immer mit dem Zeitpunkt etwa sieben bis acht Stunden p.i. gleichzusetzen waren, sollte in der Kinetik etwa acht Stunden p.i. dementsprechend auch HCV-Negativstrang im Zellextrakt nachweisbar sein.

Bis auf den Zeitpunkt direkt nach der Transfektion (null Stunden p.i.) konnte dabei tatsächlich in allen weiteren Proben der HCV-transfizierten Ansätze (2, 4, 6, 8, 12 und 14 h p.i.) das Replikationsintermediat detektiert werden (siehe Abb. 4.3-8).

Demnach scheint die Replikation des HCV bereits unmittelbar nach der Infektion bzw. Transfektion einer Targetzelle einzusetzen, so dass in den vorherigen Ansätzen am Nullpunkt offenbar wirklich das Replikationsintermediat des HCV detektiert wurde (vgl. Abb. 4.3-3, Abb. 4.3-4, Abb. 4.3-5 und Abb. 4.3-6). Da die Proben aber aus Zeitgründen nicht mehr über den HDA ausgewertet und die Resultate dieser 14-Stunden-Kinetik auch nicht in einem zweiten Ansatz bestätigt wurden, kann ein falsch-positives Ergebnis bei den bisherigen Resultaten vom Nullpunkt letztlich nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, mit dem HDA eine PCR-unabhängige Methode zum Nachweis der HCV-RNA zu etablieren, die auch *in vitro* anwendbar ist. Die Ergebnisse zeigen, dass der HDA häufig mit den Resultaten der PCR übereinstimmte, so dass er eine alternative Methode zum Nachweis des HCV darstellt.

Da die Sensitivität des HDA, im Gegensatz zur nested PCR, jedoch nicht immer ausreichte, um die virale RNA im Probenmaterial zu detektieren, sollte der HDA zum momentanen Zeitpunkt nicht die nested PCR ersetzen. Die Methode kann aber jederzeit zur Verifizierung vorhandener Daten eingesetzt werden und wichtige Hinweise über die Replikationskinetik des HCV liefern.

Warum die Replikation des HCV in den U937- und FRhK4-Zellen generell auf einem extrem niedrigen Niveau geblieben ist und die virale RNA nur eine gewisse Zeitspanne in den Proben detektiert werden konnte bleibt unklar. Auch die Versuche anderer Arbeitsgruppen scheiterten in diesem Punkt. Es konnten zwar u.a. primäre Hepatozyten (Lanford et al., 1994) sowie

T- bzw. B-Zellen (Daudi-Zellen) mit dem HCV infiziert werden (Shimizu et al., 1992; Shimizu et al., 1993; Nakajima et al., 1996), eine Adaptation des Virus, verbunden mit einer erhöhten Produktion infektiöser Virionen, gelang aber nicht.

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass in den FRhK4-Zellen, in denen eine HAV-Coinfektion vorlag, die virale RNA mit Hilfe der PCR über einen deutlich längeren Zeitraum (insgesamt fünf Monate) sporadisch nachgewiesen werden konnte (vgl. 4.2.3.4) als in allen anderen Infektionsansätzen. D.h. die Coinfektion hatte scheinbar einen positiven Einfluss auf die HCV-Replikation.

Dieser Befund stimmt mit anderen Studien überein, die zeigten, dass das humane Immundefizienzvirus (HIV), das Hepatitis B-Virus (HBV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) ebenfalls die Vermehrung des HCV unterstützen (Fukuda et al., 1999; Bartenschlager & Lohmann, 2000; Thomas, 2002). Interessanterweise können dabei sowohl HIV als auch EBV und HAV Enzyme des Interferonsystems inhibieren, die bei der Ausbildung des antiviralen Status eine Rolle spielen. Das EBV produziert beispielsweise kurze RNA-Moleküle, die an die PKR binden und seine Aktivierung verhindern (Goodbourn, 2000). Das HIV inhibiert über unbekannte Mechanismen die PKR und induziert den RNase L-Inhibitor (RLI), den Antagonisten der RNase L, um die antivirale Antwort zu blockieren (Martinand et al., 1999). Eine HAV-Infektion führt ebenfalls zur Inhibition der Aktivierung der PKR, indem es die Phosphorylierung des Proteins verhindert (mündliche Mitteilung von I. Berg, Doktorandin am Institut für Virologie, Universität Bremen), d.h. es ist durchaus vorstellbar, dass die Hemmung der PKR und/oder der RNase L durch HIV, EBV oder HAV u.a. dafür verantwortlich war, dass die Replikation des HCV im Falle einer Coinfektion gefördert wurde.

Die Tatsache, dass eine erhöhte Expression der PKR sowie eine reduzierte Expression des RLI (bei gleichbleibendem RNase L-Level) charakteristische Merkmale der antiviralen Immunantwort in Hepatozyten chronisch infizierter Patienten darstellen (Yu, 2000), unterstützt außerdem die Hypothese, dass der RLI generell einen positiven Einfluss auf die Vermehrung des HCV haben könnte. Neben den Ergebnissen dieser Arbeit erhärtet auch eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung von HAN und BARTON den Verdacht, dass der RLI und somit das RNase L-System eine wichtige Rolle bei der Vermehrung des HCV spielen könnte (Han & Barton, 2002). Ihre Studie zeigte, dass die einzelsträngige Plusstrang-RNA des HCV ausreicht, um die RNase L zu aktivieren, wobei die mRNA des HCV-Subtyps 2a schneller degradiert wurde als die RNA des Subtyps 1a. D.h. das HCV trägt somit anscheinend wäh-

rend seiner Replikation gleichzeitig zu seiner eigenen Eliminierung bei (durch die starke Aktivierung der RNase L über die virale ssRNA und dsRNA und die Reduktion des RLI), so dass die Vermehrung des Virus insgesamt auf einem sehr geringen Level gehalten wird.

In vitro entsteht somit eventuell ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Degradation der viralen RNA, das sich, je nach verwendeter Zelllinie, früher oder später zu Gunsten der Degradation verschiebt, was dazu führt, dass das HCV in den Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu kommen *in vivo* bei einer Infektion von Hepatozyten möglicherweise mehrere Faktoren ins Spiel, die z.B. die Targetzellen zusätzlich stressen oder die Virusinfektion begünstigen (extrahepatische Manifestationen), so dass es dem Immunsystem letztlich nicht gelingt, die Viren vollständig zu eliminieren.

Insgesamt gesehen scheint aber das RNase L-System bei der Replikation des HCV eine entscheidende Rolle einzunehmen, und sollte somit bei der Entwicklung eines Zellkultursystems nicht außer Acht gelassen werden. Vielleicht könnte eine erhöhte Expression des RLI bei gleichzeitiger Hemmung der RNase L in einer Zelllinie, beispielsweise durch das Einbringen einer entsprechenden siRNA (small interfering RNA), zum Durchbruch in der Entwicklung eines Zellkultursystems führen.

Um den Einfluss des RLI genauer untersuchen und diese These überprüfen zu können, sollten daher weitere Studien vielleicht mit dem von LOHMANN et al. etablierten *in vitro* System durchgeführt werden (Lohmann, 1999). Er und seine Kollegen konstruierten sogenannte subgenomische HCV-Replikons, die sich autonom in Huh7-Zellen (Hepatomzelllinie) replizieren können (Lohmann, 1999). Da mittlerweile einzelne Huh7-Zellklone identifiziert wurden, in denen sich die HCV-Replikons sogar in hohen Titern vermehren (Blight et al., 2000; Lohmann et al., 2001; Blight et al., 2002; Blight et al., 2003), sollten mit diesem System mögliche Effekte des RLI bzw. der RNase L bezüglich der Vermehrung des Hepatitis C-Virus gut zu erkennen sein. Ob die Replikationseffizienz des HCV dann tatsächlich durch eine Überexpression des RLI und/oder die Inhibition der RNase L zu steigern ist, bleibt abzuwarten.

Auf jeden Fall sollte jeder noch so kleine Hinweis verfolgt und kein Versuch ungenutzt bleiben, um die Suche nach einem geeigneten Zellkultursystem für das Hepatitis C-Virus voran zu treiben und möglicherweise erfolgreich abschließen zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen eine PCR-unabhängige Methode zum Nachweis des HCV etabliert, die alternativ zur PCR in der Grundlagenforschung eingesetzt werden kann. Die Methode basiert auf dem Prinzip des Hybrid-Detection-Assay (HDA), bei dem die virale RNA mit einer DNA-Sonde hybridisiert und über eine Lumineszenzreaktion mit einem anti-DNA:RNA-Hybridantikörper detektiert wird.

Anhand synthetisch hergestellter HCV-spezifischer RNA-Transkripte konnte gezeigt werden, dass der hier etablierte HDA nicht nur sehr spezifisch für das Hepatitis C-Virus ist, sondern mit einer unteren Nachweisgrenze von 20 amol auch über eine hohe Sensitivität verfügt.

Bei der Detektion des viralen Replikationsintermediates in Zellextrakten HCV-transfizierter Zellen stimmten die Ergebnisse des HDA zudem häufig mit denen der etablierten hausinternen RT-PCR überein. Dies zeigt, dass der HDA auch *in vitro* anwendbar ist und sich gut für die Verifizierung von Daten eignet.

Neben der Entwicklung der alternativen Nachweismethode für das HCV, wurden in dieser Arbeit auch Studien zur Entwicklung eines Zellkultursystems durchgeführt. Obwohl dabei mit den FRhK4- sowie U937-Zellen neue Zelllinien entdeckt wurden, die tatsächlich permissiv für das Hepatitis C-Virus sind, gelang es nicht ein Replikationssystem zu etablieren, das mit einer hohen Produktion infektiöser Virionen verbunden ist.

Dennoch konnten hier erstmals Indizien dafür gesammelt werden, dass der RNase L-Inhibitor offenbar die Replikation des HCV positiv beeinflussen kann. Dies würde bedeuten, dass der RLI und somit auch das 2-5A-System vielleicht eine entscheidende Rolle bei der Vermehrung des Virus spielen könnte, was für die Entwicklung eines Zellkultursystems möglicherweise eine wichtige Erkenntnis darstellt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ali, N. & Siddiqui, A. (1995). Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol* **69**, 6367-6375.
2. Alter, H. J. (1995). To C or not to C: these are the questions. *Blood* **85**, 1681-1695.
3. Alter, H. J., Holland, P. V., Morrow, A. G., Purcell, R. H., Feinstone, S. M. & Moritsugu, Y. (1975). Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* **2**, 838-841.
4. Alter, M. J., Hadler, S. C., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Moyer, L. A., Fields, H. A., Bradley, D. W. & et al. (1990). Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *Jama* **264**, 2231-2235.
5. Alter, M. J., Margolis, H. S., Krawczynski, K., Judson, F. N., Mares, A., Alexander, W. J., Hu, P. Y., Miller, J. K., Gerber, M. A., Sampliner, R. E. & et al. (1992). The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* **327**, 1899-1905.
6. Ballardini, G., Groff, P., Pontisso, P., Giostra, F., Francesconi, R., Lenzi, M., Zauli, D., Alberti, A. & Bianchi, F. B. (1995). Hepatitis C virus (HCV) genotype, tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A,B,C, and intercellular adhesion-1 molecules. Clues to pathogenesis of hepatocellular damage and response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* **95**, 2067-2075.
7. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. & 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.
8. Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* **14**, 241-254.
9. Behrens, S. E., Tomei, L. & De Francesco, R. (1996). Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* **15**, 12-22.
10. Bergan, R., Connell, Y., Fahmy, B. & Neckers, L. (1993). Electroporation enhances c-myc antisense oligodeoxynucleotide efficacy. *Nucleic Acids Res* **21**, 3567-3573.
11. Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B. & Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* **270**, 13308-13317.

12. Bisbal, C., Salehzada, T., Silhol, M., Martinand, C., Le Roy, F. & Lebleu, B. (2001). The 2-5A/RNase L pathway and inhibition by RNase L inhibitor (RLI). *Methods Mol Biol* **160**, 183-198.
13. Bisbal, C., Silhol, M., Laubenthal, H., Kaluza, T., Carnac, G., Milligan, L., Le Roy, F. & Salehzada, T. (2000). The 2'-5' oligoadenylate/RNase L/RNase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* **20**, 4959-4969.
14. Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000). Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**, 1972-1974.
15. Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J. & Rice, C. M. (2003). Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 1a RNAs in Cell Culture. *J Virol* **77**, 3181-3190.
16. Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J Virol* **76**, 13001-13014.
17. Bolske, G. (1988). Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **269**, 331-340.
18. Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**, 495-503.
19. Bouffard, P., Hayashi, P. H., Acevedo, R., Levy, N. & Zeldis, J. B. (1992). Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* **166**, 1276-1280.
20. Brettler, D. B., Mannucci, P. M., Gringeri, A., Rasko, J. E., Forsberg, A. D., Rumi, M. G., Garsia, R. J., Rickard, K. A. & Colombo, M. (1992). The low risk of hepatitis C virus transmission among sexual partners of hepatitis C-infected hemophilic males: an international, multicenter study. *Blood* **80**, 540-543.
21. Bukh, J., Purcell, R. H. & Miller, R. H. (1992). Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4942-4946.
22. Caussin-Schwemling, C., Schmitt, C. & Stoll-Keller, F. (2001). Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol* **65**, 14-22.
23. Chang, M., Marquardt, A. P., Wood, B. L., Williams, O., Cotler, S. J., Taylor, S. L., Carithers, R. L., Jr. & Gretch, D. R. (2000). In situ distribution of hepatitis C virus

- replicative-intermediate RNA in hepatic tissue and its correlation with liver disease. *J Virol* **74**, 944-955.
24. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
 25. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989a). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.
 26. Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P. J. & et al. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2451-2455.
 27. Colombo, M., Kuo, G., Choo, Q. L., Donato, M. F., Del Ninno, E., Tommasini, M. A., Dioguardi, N. & Houghton, M. (1991) Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* **2**, 1006-1008.
 28. Craggs, J. K., Ball, J. K., Thomson, B. J., Irving, W. L. & Grabowska, A. M. (2001). Development of a strand-specific RT-PCR based assay to detect the replicative form of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods* **94**, 111-120.
 29. Cribier, B., Schmitt, C., Bingen, A., Kirn, A. & Keller, F. (1995). In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *J Gen Virol* **76**, 2485-2491.
 30. Davis, G. L. (1999). Hepatitis C Virus Genotypes and Quasispecies. *Am J Med* **107**, 21-26.
 31. Di Bisceglie, A. M. (1998). Hepatitis C. *Lancet* **351**, 351-355.
 32. Di Bisceglie, A. M. & Hoofnagle, J. H. (2002). Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S121-127.
 33. Diaz-Guerra, M., Rivas, C. & Esteban, M. (1997). Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology* **236**, 354-363.
 34. Dienstag, J. L., Purcell, H. R., Alter, H. J., Feinstone, S. M., Wong, D. C. & Holland, P. V. (1977). Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* **1**, 560-562.
 35. Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P. L., Sherlock, S., McIntyre, N. & Simmonds, P. (1994). Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* **19**, 13-18.
 36. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F. & Sato, C. (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.

37. Farci, P., Alter, H. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Cheung, L. C., Melpolder, J. C., Sacher, R. A., Shih, J. W. & Purcell, R. H. (1996). Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* **335**, 631-634.
38. Farci, P., Alter, H. J., Wong, D. C., Miller, R. H., Govindarajan, S., Engle, R., Shapiro, M. & Purcell, R. H. (1994). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated in vitro neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7792-7796.
39. Farci, P., Munoz, S. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Wong, D. C., Coiana, A., Peddis, G., Rubin, R. & Purcell, R. H. (1999). Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* **179**, 1007-1011.
40. Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzera, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H. & Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**, 339-344.
41. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* **292**, 767-770.
42. Fields, B. N. (2001). *Virology*, 4 edn: Lippincott Williams & Wilkins.
43. Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. & McKeating, J. A. (1999). Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* **73**, 6235-6244.
44. Fukuda, R., Ishimura, N., Niigaki, M., Hamamoto, S., Satoh, S., Tanaka, S., Kushiyama, Y., Uchida, Y., Iihara, S., Akagi, S., Watanabe, M. & Kinoshita, Y. (1999). Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol* **58**, 201-207.
45. Gale, M., Jr., Kwieciszewski, B., Dossett, M., Nakao, H. & Katze, M. G. (1999). Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* **73**, 6506-6516.
46. Gale, M. J., Jr., Korth, M. J. & Katze, M. G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* **10**, 157-162.

47. Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R. & Katze, M. G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* **230**, 217-227.
48. Galli, M., Zehender, G., Monti, G., Ballare, M., Saccardo, F., Piconi, S., De Maddalena, C., Bertoncilli, M. C., Rinaldi, G., Invernizzi, F. & et al. (1995). Hepatitis C virus RNA in the bone marrow of patients with mixed cryoglobulinemia and in subjects with noncryoglobulinemic chronic hepatitis type C. *J Infect Dis* **171**, 672-675.
49. Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T. & Olson, W. C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4498-4503.
50. Goeser, T., Töx, U., Müller, H. M., Arnold, J. C. & Theilmann, L. (1995). Bedeutung der Genotypen bei chronischer Hepatitis-C-Virusinfektion und Hepatitis-C-Virusbedingter Leberzirrhose in Deutschland. *Dtsch. med. Wschr.* **120**, 1070-1073.
51. Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R. E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**, 2341-2364.
52. Gotter, J. (1999). Einfluss eines RNase L-Inhibitors auf die Apoptoseinduktion durch die cytopathogene Hepatitis A-Variante HAVcyt/HB1.1. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
53. Gowans, E. J. (2000). Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis* **20**, 85-102.
54. Gradlowsky, F. (1995). Isolierung und Kultivierung humaner Knochenmarkfibroblasten aus Articulatio coxae. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
55. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1993). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* **67**, 1385-1395.
56. Hahn, C. S., Cho, Y. G., Kang, B. S., Lester, I. M. & Hahn, Y. S. (2000). The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *Virology* **276**, 127-137.
57. Hallam, N. F., Fletcher, M. L., Read, S. J., Majid, A. M., Kurtz, J. B. & Rizza, C. R. (1993). Low risk of sexual transmission of hepatitis C virus. *J Med Virol* **40**, 251-253.

58. Han, J. H., Shyamala, V., Richman, K. H., Brauer, M. J., Irvine, B., Urdea, M. S., Tekamp-Olson, P., Kuo, G., Choo, Q. L. & Houghton, M. (1991). Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1711-1715.
59. Han, J. Q. & Barton, D. J. (2002). Activation and evasion of the antiviral 2'-5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA. *Rna* **8**, 512-525.
60. Harris, P. & Ralph, P. (1985). Human Leukemic models of myelomonocytic development: A review of HL-60 and U937 cell lines. *J Leukocyte Biol* **37**, 407-422.
61. Heitmann, A. (2002). Untersuchung zur Optimierung der Nachweismöglichkeit von infektiösem Hepatitis A-Virus aus Blut, Blutprodukten und Vakzine-Pools. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
62. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* **23**, 504-511.
63. Hoofnagle, J. H. (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* **36**, S21-29.
64. Jacobs, B. L. & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339-349.
65. Jacobsen, H., Krause, D., Friedman, R. M. & Silverman, R. H. (1983b). Induction of ppp(A2'p)nA-dependent RNase in murine JLS-V9R cells during growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4954-4958.
66. Kew, M. C., Houghton, M., Choo, Q. L. & Kuo, G. (1990). Hepatitis C virus antibodies in southern African blacks with hepatocellular carcinoma. *Lancet* **335**, 873-874.
67. Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & Rice, C. M. (1997). Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* **277**, 570-574.
68. Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M. & 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.
69. Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M. & 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.

70. Koziel, M. J., Dudley, D., Wong, J. T., Dienstag, J., Houghton, M., Ralston, R. & Walker, B. D. (1992). Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* **149**, 3339-3344.
71. Krause, D., Silverman, R. H., Jacobsen, H., Leisy, S. A., Dieffenbach, C. W. & Friedman, R. M. (1985). Regulation of ppp(A2'p)nA-dependent RNase levels during interferon treatment and cell differentiation. *Eur J Biochem* **146**, 611-618.
72. 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. & et al. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **244**, 362-364.
73. Kurth, U. (2001). Einfluss des RNase L-Inhibitors (RLI) auf die Replikation des Hepatitis A-Virus in Primatenzellen. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
74. Kusumawati, A., Commes, T., Liautard, J. P. & Widada, J. S. (1999). Transfection of myelomonocytic cell lines: cellular response to a lipid-based reagent and electroporation. *Anal Biochem* **269**, 219-221.
75. Lanford, R. E., Chavez, D., Chisari, F. V. & Sureau, C. (1995). Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol* **69**, 8079-8083.
76. Lanford, R. E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C. & Kim, J. (1993). Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* **197**, 225-235.
77. Lanford, R. E., Sureau, C., Jacob, J. R., White, R. & 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.
78. Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L. F., Cianciara, J., Vargas, H. & Rakela, J. (1997). Hepatitis C virus negative strand RNA is not detected in peripheral blood mononuclear cells and viral sequences are identical to those in serum: a case against extrahepatic replication. *J Gen Virol* **78**, 2747-2750.
79. Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L. F., Nowicki, M. & Rakela, J. (2000). Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol* **74**, 1014-1017.

80. Laskus, T., Radkowski, M., Wang, L. F., Vargas, H. & Rakela, J. (1998). Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology* **28**, 1398-1401.
81. Lechner, S., Rispeter, K., Meisel, H., Kraas, W., Jung, G., Roggendorf, M. & Zibert, A. (1998). Antibodies directed to envelope proteins of hepatitis C virus outside of hypervariable region 1. *Virology* **243**, 313-321.
82. Lee, S. B. & Esteban, M. (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* **199**, 491-496.
83. Lerat, H., Berby, F., Trabaud, M. A., Vidalin, O., Major, M., Trepo, C. & Inchauspe, G. (1996). Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J Clin Invest* **97**, 845-851.
84. Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M. A., Trepo, C. & Inchauspe, G. (1998). In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* **91**, 3841-3849.
85. Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A. & Bartenschlager, R. (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* **75**, 1437-1449.
86. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**, 110-113.
87. Lottspeich, F. & Zorbas, H. H. (1998). Bioanalytik: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
88. Major, M. E., Mihalik, K., Fernandez, J., Seidman, J., Kleiner, D., Kolykhalov, A. A., Rice, C. M. & Feinstone, S. M. (1999). Long-term follow-up of chimpanzees inoculated with the first infectious clone for hepatitis C virus. *J Virol* **73**, 3317-3325.
89. Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. & 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.
90. Martinand, C., Montavon, C., Salehzada, T., Silhol, M., Lebleu, B. & Bisbal, C. (1999). RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* **73**, 290-296.

91. Martinand, C., Salehzada, T., Silhol, M., Lebleu, B. & Bisbal, C. (1998). The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 1031-1038.
92. Martinot-Peignoux, M., Boyer, N., Pouteau, M., Castelnau, C., Giuily, N., Duchatelle, V., Auperin, A., Degott, C., Benhamou, J. P., Erlinger, S. & Marcellin, P. (1998). Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* **29**, 214-223.
93. Marusawa, H., Hijikata, M., Chiba, T. & Shimotohno, K. (1999). Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* **73**, 4713-4720.
94. McGarrity, G. J., Vanaman, V. & Sarama, J. (1984). Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In Vitro* **20**, 1-18.
95. McGuinness, P. H., Bishop, G. A., McCaughan, G. W., Trowbridge, R. & Gowans, E. J. (1994). False detection of negative-strand hepatitis C virus RNA. *Lancet* **343**, 551-552.
96. McHutchison, J. G., Gordon, S. C., Schiff, E. R., Shiffman, M. L., Lee, W. M., Rustgi, V. K., Goodman, Z. D., Ling, M. H., Cort, S. & Albrecht, J. K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* **339**, 1485-1492.
97. Mellor, J., Haydon, G., Blair, C., Livingstone, W. & Simmonds, P. (1998). Low level or absent in vivo replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* **79**, 705-714.
98. Mellor, J., Holmes, E. C., Jarvis, L. M., Yap, P. L. & Simmonds, P. (1995). Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* **76**, 2493-2507.
99. Memet, S., Besancon, F., Bourgeade, M. F. & Thang, M. N. (1991). Direct induction of interferon-gamma- and interferon-alpha/beta- inducible genes by double-stranded RNA. *J Interferon Res* **11**, 131-141.
100. Mendoza, E. C., Paglieroni, T. G. & Zeldis, J. B. (1996). Decreased phorbol myristate acetate-induced release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta from peripheral blood monocytes of patients chronically infected with hepatitis C virus. *J Infect Dis* **174**, 842-844.

101. Miller, R. H. & Purcell, R. H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2057-2061.
102. Missale, G., Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M. G., Houghton, M., Fiaccadori, F. & Ferrari, C. (1996). Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* **98**, 706-714.
103. Mizutani, T., Kato, N., Saito, S., Ikeda, M., Sugiyama, K. & 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.
104. Moldvay, J., Deny, P., Pol, S., Brechot, C. & Lamas, E. (1994). Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of infected patients by in situ hybridization. *Blood* **83**, 269-273.
105. Muller, H. M., Pfaff, E., Goeser, T., Kallinowski, B., Solbach, C. & Theilmann, L. (1993). Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol* **74**, 669-676.
106. Muratori, L., Gibellini, D., Lenzi, M., Cataleta, M., Muratori, P., Morelli, M. C. & Bianchi, F. B. (1996). Quantification of hepatitis C virus-infected peripheral blood mononuclear cells by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* **88**, 2768-2774.
107. Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H. & Shimizu, Y. K. (1996). Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol* **70**, 3325-3329.
108. Navas, S., Castillo, I., Bartolome, J., Marriott, E., Herrero, M. & Carreno, V. (1994). Positive and negative hepatitis C virus RNA strands in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells in anti-HCV patients: relation with the liver lesion. *J Hepatol* **21**, 182-186.
109. NIH (2002). National Institutes of Health Consensus Development Conference: management of hepatitis C: 2002. *Hepatology* **36**, 3-20.
110. Ohto, H., Terazawa, S., Sasaki, N., Hino, K., Ishiwata, C., Kako, M., Ujiie, N., Endo, C., Matsui, A. & et al. (1994). Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **330**, 744-750.
111. Pawlotsky, J. M. (2000). Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**, 889-896.

112. Pawlotsky, J. M. (2002). Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* **36**, 65-73.
113. Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O. & Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**, 2795-2805.
114. Peters, M. G. & Terrault, N. A. (2002). Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology* **36**, 220-225.
115. Pietschmann, T., Lohmann, V., Rutter, G., Kurpanek, K. & Bartenschlager, R. (2001). Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* **75**, 1252-1264.
116. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.
117. Player, M. R. & Torrence, P. F. (1998). The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* **78**, 55-113.
118. Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperon, A., Doms, R. W., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C Virus Glycoproteins Interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* **77**, 4070-4080.
119. Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S. S., Niederau, C., Minuk, G. S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C. & Albrecht, J. (1998). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* **352**, 1426-1432.
120. Radkowski, M., Kubicka, J., Kisiel, E., Cianciara, J., Nowicki, M., Rakela, J. & Laskus, T. (2000). Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood* **95**, 3986-3989.
121. Ray, S. C., Wang, Y. M., Laeyendecker, O., Ticehurst, J. R., Villano, S. A. & Thomas, D. L. (1999). Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* **73**, 2938-2946.
122. RKI (2002). Epidemiologisches Bulletin. *Robert Koch Institut* **44**, 371-376.
123. Sachs, L. (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemia. *Nature* **274**, 535.

124. Sangar, D. V. & Carroll, A. R. (1998). A tale of two strands: reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of hepatitis C virus replication. *Hepatology* **28**, 1173-1176.
125. Sansonno, D., De Vita, S., Cornacchiulo, V., Carbone, A., Boiocchi, M. & Dammacco, F. (1996a). Detection and distribution of hepatitis C virus-related proteins in lymph nodes of patients with type II mixed cryoglobulinemia and neoplastic or non-neoplastic lymphoproliferation. *Blood* **88**, 4638-4645.
126. Sansonno, D., Iacobelli, A. R., Cornacchiulo, V., Iodice, G. & Dammacco, F. (1996b). Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV- infected patients. *Clin Exp Immunol* **103**, 414-421.
127. Santolini, E., Migliaccio, G. & La Monica, N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* **68**, 3631-3641.
128. Schmidt, W. N., Klinzman, D., LaBrecque, D. R., Macfarlane, D. E. & Stapleton, J. T. (1995). Direct detection of hepatitis C virus (HCV) RNA from whole blood, and comparison with HCV RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* **47**, 153-160.
129. Schmitz, G. (1997). Entwicklung einer neuen Methode zum Nachweis von HAV-Minus-Strang-RNA. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
130. Schmitz, G. & Dotzauer, A. (1998). Proof of hepatitis A virus negative-sense RNA by RNA/DNA-hybrid detection: a method for specific detection of both viral negative- and positive-strand RNA species. *Nucleic Acids Res* **26**, 5230-5232.
131. Schreiber, G. B., Busch, M. P., Kleinman, S. H. & Korelitz, J. J. (1996). The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* **334**, 1685-1690.
132. Schreier, E. & Höhne, M. (2001). Hepatitis C - Epidemiologie und Prävention. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **44**, 554-561.
133. Schweitzer, B. & Kingsmore, S. (2001). Combining nucleic acid amplification and detection. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 21-27.
134. Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1996). Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* **23**, 205-209.

135. Shimizu, Y. K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R. H. & 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.
136. Shimizu, Y. K., Purcell, R. H. & Yoshikura, H. (1993). Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6037-6041.
137. Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **21**, 570-83.
138. Sturzl, M. & Roth, W. K. (1990). "Run-off" synthesis and application of defined single-stranded DNA hybridization probes. *Anal Biochem* **185**, 164-169.
139. Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., Matsuura, Y. & Miyamura, T. (1999). Processing and Function of Hepatitis C Virus Proteins. *Intervirology* **42**, 145-152.
140. Tabor, E., Gerety, R. J., Drucker, J. A., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H., Jackson, D. R., April, M., Barker, L. F. & Pineda-Tamondong, G. (1978). Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet* **1**, 463-466.
141. Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I. & Okayama, H. (1991). Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* **65**, 1105-1113.
142. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K. & Shimotohno, K. (1996). Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* **70**, 3307-3312.
143. Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. & Lai, M. M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107-110.
144. Theilmann, L., Solbach, C., Töx, U., Kallinowski, B. & Goeser, T. (1995). Bedeutung der Hepatitis-C-Virus-Genotypisierung. *Münch. med. Wschr.* **137**, 699-701.
145. Thomas, D. L. (2002). Hepatitis C and human immunodeficiency virus infection. *Hepatology* **36**, 201-209.
146. Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R. & La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* **67**, 4017-4026.
147. Toubi, E., Kessel, A., Goldstein, L., Slobodin, G., Sabo, E., Shmuel, Z. & Zuckerman, E. (2001). Enhanced peripheral T-cell apoptosis in chronic hepatitis C virus infection: association with liver disease severity. *J Hepatol* **35**, 774-780.
148. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476-1483.

149. van der Poel, C. L., Cuypers, H. T. & Reesink, H. W. (1994). Hepatitis C virus six years on. *Lancet* **344**, 1475-1479.
150. van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M. & Bishop, D. H. L. e. (1999). Virus Taxonomy - Classification and nomenclature of Viruses (Seventh Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses). Virology Division. International Union of Microbiological Societies. *Academic Press, San Diego*.
151. Vento, S., Garofano, T., Renzini, C., Cainelli, F., Casali, F., Ghironzi, G., Ferraro, T. & Concia, E. (1998). Fulminant hepatitis associated with hepatitis A virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* **338**, 286-290.
152. Villano, S. A., Vlahov, D., Nelson, K. E., Cohn, S. & Thomas, D. L. (1999). Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* **29**, 908-914.
153. Wang, C., Sarnow, P. & 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.
154. Wang, J. T., Sheu, J. C., Lin, J. T., Wang, T. H. & Chen, D. S. (1992). Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* **166**, 1167-1169.
155. 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. & et al. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3468-3472.
156. Weiner, A. J., Kuo, G., Bradley, D. W., Bonino, F., Saracco, G., Lee, C., Rosenblatt, J., Choo, Q. L. & Houghton, M. (1990). Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **335**, 1-3.
157. Wick, M. J. (2000). Diagnosis of human Papillomavirus gynecologic infections. *Clin Lab Med* **20**, 271-287.
158. Willems, M., Moshage, H. & Yap, S. H. (1993). PCR and detection of negative HCV RNA strands. *Hepatology* **17**, 526.
159. Willems, M., Peerlinck, K., Moshage, H., Deleu, I., Van den Eynde, C., Vermylen, J. & Yap, S. H. (1994). Hepatitis C virus-RNAs in plasma and in peripheral blood mononuclear cells of hemophiliacs with chronic hepatitis C: evidence for viral replication in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* **42**, 272-278.

160. Wünschmann, S. (1998). Suppression der Myelopoese durch das Hepatitis-A Virus. *Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen*.
161. Wunschmann, S., Becker, B. & Vallbracht, A. (2002). Hepatitis A virus suppresses monocyte-to-macrophage maturation in vitro. *J Virol* **76**, 4350-4356.
162. Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. & 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 U S A* **94**, 8738-8743.
163. Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. (1999). In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2291-2295.
164. 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. & 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.
165. You, L. R., Chen, C. M. & Lee, Y. H. (1999). Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* **73**, 1672-1681.
166. Yu, S. H., Nagayama, K., Enomoto, N., Izumi, N., Marumo, F. & Sato, C. (2000). Intrahepatic mRNA expression of interferon-inducible antiviral genes in liver diseases: dsRNA-dependent protein kinase overexpression and RNase L inhibitor suppression in chronic hepatitis C. *Hepatology* **32**, 1089-1095.
167. Zanetti, A. R., Tanzi, E., Paccagnini, S., Principi, N., Pizzocolo, G., Caccamo, M. L., D'Amico, E., Cambie, G. & Vecchi, L. (1995). Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. *Lancet* **345**, 289-291.
168. Zehender, G., de Maddalena, C., Monti, G., Ballare, M., Saccardo, F., Piconi, S., Invernizzi, F., Monteverde, A. & Galli, M. (1995). HCV genotypes in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of patients with mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol* **13**, 87-90.
169. Zibert, A., Schreier, E. & Roggendorf, M. (1995). Antibodies in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment. *Virology* **208**, 653-661.

DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. A. Vallbracht möchte ich mich für die Überlassung des Arbeitsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Ihre Fachkompetenz und ihre Anforderungen waren für mich Ansporn und Herausforderung zugleich.

Herrn Prof. Dr. D. Blohm danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Judith Klein für ihre unermüdliche Unterstützung (nicht nur in wissenschaftlichen Fragen). Ihre freundschaftliche Art und außerordentliche Kollegialität werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Bei Herrn Michael Patrick Schmidt möchte ich mich ganz herzlich für seine ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Allen „ehemaligen“ Diplomandinnen und Diplomanden danke ich für eine gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Schönermarck und Herrn Dr. Lehmann vom DRK in Springe danke ich für die Überlassung HCV-positiver und HCV-negativer Frischplasmen.

Herrn Ph.D. Dr. A. Dotzauer danke ich für die kritische Durchsicht meines Manuskriptes.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglichten und immer für mich da waren!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Britta Becker
Kopernikusstrasse 50, 28357 Bremen
Tel. (0421) 273445
geb. am 05.07.66 in Bremen
ledig

Ausbildung

- 06/1986 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Horn in Bremen
- 08/1986 – 06/1988 Besuch der Berufsfachschule für Assistentenberufe an der Meta-Sattler-Strasse in Bremen;
Fachrichtung: Biologie/Chemie
- 06/88 Abschluss als staatlich geprüfte Biologisch-Chemisch-Technische-Assistentin
- 10/1992 – 10/1997 Studium der Biologie an der Universität Bremen
- 11/1997 – 07/1998 Durchführung der Diplomarbeit in der Virologie mit dem Thema: „Der Einfluss des Hepatitis A-Virus auf die Differenzierung humaner Monozyten/Makrophagen und die Entwicklung von Knochenmarklangzeitkulturen“
- 07/1998 Studienabschluss als Diplom-Biologin
- ### Berufserfahrung
- 10/1988 – 10/1992 Angestellte im Zentralkrankenhaus Bremen-Nord als Biologisch-Chemisch-Technische Assistentin
- 08/1998 – 09/1999 Erhalt des Glaxo Wellcome Forschungsstipendiums für Klinische Virologie und Durchführung verschiedener Studien für das Projekt „Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zum Myelotropismus des HAV/HCV *in vitro*“ an der Universität Bremen
- 10/1999 – 10/2002 Durchführung der experimentellen Arbeiten für die Promotion im Fachbereich Virologie an der Universität Bremen mit dem Thema:
„Etablierung einer PCR-unabhängigen Methode zum Nachweis des Hepatitis C-Virus und Studien zur Entwicklung eines Replikationssystems“
- ab 11/2002 Schriftliche Ausarbeitung der Dissertation
- ab 05/2003 Angestellte bei Herrn Dr. Steinmann, Mikrolab GmbH, Bremen