

Die GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C:

Untersuchungen zur Molekularbiologie,

Pathogenese, Epidemiologie und Diagnose.

---

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorgelegt von

Alexandra Hofmann

am 01. Dezember 2000

Prüfungskommission: Prof. Dr. Lutz Gürtler (Vorsitz)

PD Dr. Ruth Brack-Werner

Prof. Dr. Charles N. David

Prof. Dr. Wolfhard Bandlow (Protokoll)

Prof. Dr. Gert Frösner (Gast)

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2001

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 (3) der Promotionsordnung vom 27.11.1991 von Prof. Dr. Lutz Gürtler betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich mich bisher noch nie einem Promotionsverfahren unterzogen habe. Die hier als Dissertation vorgelegte Arbeit wurde noch nie in einem anderen Prüfungsverfahren zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt.

Ich habe die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.“

München, den 01. Dezember 2000

Alexandra Hofmann

**Meiner Familie und Gottfried**

# DANKSAGUNG

Die zurückliegenden vier Jahre am Lehrstuhl für Virologie des *Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und medizinische Mikrobiologie* waren eine bereichernde und schöne Zeit für mich. Insbesondere die drei Jahre im Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ boten mir die Möglichkeit, viele hilfsbereite, aufgeschlossene und interessierte Menschen kennenzulernen. Im folgenden möchte ich jenen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. L. Gürtler, meinem Doktorvater, danke ich für die Möglichkeit, am Max von Pettenkofer-Institut zu promovieren. Während der gesamten Zeit konnte ich stets seine kompetente Hilfe und Diskussionsbereitschaft in fachlichen Dingen in Anspruch nehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Frösner, meinem Arbeitsgruppenleiter, möchte ich mich für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten, sowie die freundliche Überlassung eines medizinisch und methodisch äußerst vielseitigen Themas bedanken. Mit seiner Betreuung und Hilfe konnte ich stets rechnen. Desweiteren förderte er wichtige Kooperationen und Kontakte. Danke auch für die vielen Einladungen zu Weihnachtessen und zu Laborausflügen per Schlauchboot auf der Isar.

Herrn Prof. Dr. J. Heesemann danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“. Dadurch war es mir möglich, eine Vielzahl von Erfahrungen, sowohl in arbeitstechnischer als auch kollegialer Hinsicht, zu sammeln.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch noch allen Kollegen des Graduiertenkollegs für die Hilfe, die Diskussionsbereitschaft und den Erfahrungsaustausch in fachlichen Dingen, sowie für die Freundschaft und die vielen gemeinsamen Erlebnisse und Abende danken. Sie werden in meiner Erinnerung bleiben.

Bei Dr. H. Nitschko bedanke ich mich für die vielen Tips und Lösungsansätze bei so mancherlei methodisch bedingten Problemen.

Frau H. Breitschopf danke ich für die sehr gute Einführung in die Technik der *in situ*-Hybridisierung.

Dr. R. Zachoval danke ich für die engagierte Unterstützung hinsichtlich der Bereitstellung von Leberbiopsien und dem Auffinden geeigneter PMBC-Spender. An dieser Stelle ein herzlicher Dank auch an Dr. T. Tucker und Prof. Dr. R. Penning für das zur Verfügung stellen histologischer Schnitte und Gewebeproben der verschiedensten Organe.

Frau Dr. G. Hellein, Herrn Prof. Dr. W. Schramm, Herrn Dr. M. Wächtler, Dr. F.M. Zwiebel und Dr. G. Massenkeil danke ich für die Überlassung von Patientenserum zur Untersuchung der Epidemiologie und Übertragung von GBV-C.

Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock danke ich für die Einführung in die Methode der Zelltrennung mit Hilfe des MACS-Systems und die Bereitstellung der Zelltrennungsapparatur.

Mein Dank gilt auch Dr. J. Haas für die Weitergabe seines Wissens und seiner Erfahrungen in der Zellkultur von PBMCs und Fr. Elisabeth Kremmer für die Herstellung der monoklonalen Antikörpern.

Einen herzlichen Dank den Kollegen der Arbeitsgruppe „Hepatitis“ für eine freundschaftliche und unkomplizierte Atmosphäre, sowie die stetige Hilfe und Diskussionsbereitschaft: meiner direkten Labornachbarin Judith Seebach; Tatiana Firsova, u.a. auch für so manche kulinarischen Genüsse der russischen Küche; Elena Roguinskaia, insbesondere für ihre fachliche Unterstützung bei der Etablierung des ELISA; sowie den „Ehemaligen“ Gerhard Dobler, Erna Donnerbauer und Helmut Walter. Allen zusammen nochmals ein „Herzliches Dankeschön“ für die schöne gemeinsame Zeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Heike Gehringer, Carine Menard und Eva Hellebrand für die seelische und freundschaftliche Unterstützung beim Auftreten so mancher typischer „Doktorandenprobleme“, sowie meinem guten Freund und Studienkollegen aus Regensburger Zeiten - Thomas Dams.

Zuletzt sämtlichen nicht genannten Mitgliedern des Lehrstuhls ein „Herzliches Dankeschön“.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Historische Hinweise auf ein neuartiges Hepatitisvirus .....	2
2. Isolierung des GB-Virus-A (GBV-A) und GB-Virus-B (GBV-B) .....	3
3. Isolierung des humanen GB-Virus-C (GBV-C)/Hepatitis G-Virus (HGV).....	3
4. Molekularbiologie der GB-Viren.....	5
4.1 Das GB-Virus-A und GB-Virus-B.....	5
4.2 Das GB-Virus-C.....	7
5. Pathologie der GB-Viren .....	12
5.1 Das GB-Virus-A und GB-Virus-B: die GB-Hepatitis der Tamarine .....	12
5.2 Das GB-Virus-C.....	14
6. Ziel dieser Arbeit .....	18
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>A. Material</b> .....	<b>21</b>
1. Chemikalien .....	21
2. Organismen.....	22
2.1 Bakterien .....	22
2.2 Zellen .....	22
3. Plasmide und Oligodesoxynukleotide.....	22
3.1 Plasmide .....	22
3.2 Oligodesoxynukleotide .....	22
3.2.1 Allgemeine Primer/Oligodesoxynukleotide .....	23
3.2.2 Spezielle Primer/Oligodesoxynukleotide .....	23
4. Proteine, Enzyme und Antikörper.....	27
4.1 Proteine und Enzyme .....	27
4.2 Antikörper .....	27
5. Standards, Kits und Teste .....	28
5.1 Standards .....	28
5.2 Kits und Teste .....	28
6. Medien, Zusätze und Antibiotika.....	28
6.1 Medien und Zusätze .....	28
6.1.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	28
6.1.2 Medium und Zusätze zur Zellkultur von PBMCs .....	29

6.2 Antibiotika.....	30
7. Puffer und Stammlösungen.....	30
7.1 Puffer für gentechnische Methoden .....	30
7.2 Puffer für proteinchemische Methoden.....	31
7.3 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Auftrennung von PBMCs .....	33
7.4 Puffer und Stammlösungen für die <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	33
7.5 Allgemeine Stammlösungen .....	35
7.5.1 Silberfärbung .....	35
7.5.2 Coomassie-Färbung.....	35
7.5.3 SDS-PAGE-Stammlösungen .....	35
7.5.4 Tris-Tricin-PAGE-Stammlösungen.....	36
7.5.5 Weitere Stammlösungen .....	36
8. Probenmaterial .....	37
8.1 Seren.....	37
8.2 Gewebe.....	37
9. Material für die Gewebepreparation .....	38
10. Verbrauchsmaterial .....	39
11. Geräte.....	39
<b>B. Methoden.....</b>	<b>40</b>
<b><i>Mikrobiologische Methoden</i></b>	
1. Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	40
<b><i>Molekulargenetische Methoden</i></b>	
2. Isolierung von Nucleinsäuren aus Bakterien .....	41
2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
3. Handhabung von Nucleinsäuren.....	42
3.1 Extraktion von Nucleinsäuren aus Serum bzw. Gewebe .....	42
3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nucleinsäuren .....	42
3.3 Fällung von Nucleinsäuren .....	42
3.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren .....	42
3.5 Umschreibung/Reverse Transkription (RT) von RNA .....	42
4. <i>In vitro</i> Modifikation von DNA.....	43
4.1 Enzymatischer Verdau von DNA.....	43
4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	44
4.3 Ligation von DNA-Fragmenten .....	44
5. Agarosegel-Elektrophorese von Nucleinsäuren.....	44
5.1 Analytische Agarosegel-Elektrophorese .....	44



5.2 Präparative Agarosegel-Elektrophorese.....	45
6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
7.1 PCR-Ansätze.....	45
7.2 Semiquantitative PCR.....	46
7.3 PCR-Programme.....	46
8. Transformation von <i>E. coli</i> .....	47
8.1 Transformation in CaCl <sub>2</sub> -kompetente <i>E. coli</i> .....	47
8.2 Transformation in One Shot™ Cells (INVαF <sup>+</sup> oder TOP10F <sup>+</sup> ).....	47
9. Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	47

### ***Proteinchemische Methoden***

10. Proteinexpression in <i>E. coli</i> mit Hilfe des pBAD/His A, B, C-Expressionssystems .	48
10.1 Optimierung der Expressionsbedingungen (Pilot Expression).....	48
10.2 Proteinexpression (Scale-Up Expression).....	48
10.3 Herstellung des Zellysates und Bindung an Säule.....	48
10.4 Säulenpräparation und Proteinreinigung.....	49
11. Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	49
12. Analyse von Proteinen/Peptiden.....	49
13. Herstellung monoklonaler Antikörper.....	50
14. Proteinrestriktion mit Hilfe spezifischer Endoproteinasen.....	50
15. SDS-PAGE.....	50
16. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	51
16.1 Coomassie-Färbung.....	51
16.2 Silberfärbung.....	51
17. Färbung von Nitrocellulose-Transfermembranen.....	51

### ***Immunologische Methoden***

18. Western Blot (Immunoblot).....	52
19. ELISA.....	52
19.1 Durchführung des ELISA “μPLATE Anti-Hgenv”.....	52
19.2 Durchführung des etablierten ELISAs.....	52

### ***Zellbiologische Methoden***

20. Isolierung von PBMCs aus Blut.....	53
21. Bestimmung der Zellzahl.....	53
22. Zelltrennung mit MACS.....	54
23. Zellkultur von PBMCs.....	54
24. Berechnung “1 Genomäquivalent/x Zellen”.....	54
25. <i>In vitro</i> -Infektion von humanen PBMCs durch GB-Virus-C.....	55

## ***Methode der in situ-Hybridisierung***

26. Sondenpräparation .....	56
26.1 Herstellung der Template-DNA für die RNA-Transkription .....	56
26.2 DIG-RNA-Labeling .....	57
26.3 Säulenreinigung von DIG-markierten RNA-Sonden .....	57
26.4 Bestimmung der Konzentration an DIG-markierter RNA .....	58
27. Gewebepräparation .....	58
28. <i>In situ</i> -Hybridisierung .....	59
28.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte .....	59
28.2 Hybridisierung .....	60
28.3 Stringentes Waschen und Nachweis der RNA .....	60

## ***Experimente mit Krallenaffen***

29. Inokulation, Blutabnahme und Gewebeentnahme .....	60
30. ALT-Wert-Bestimmung .....	61

## ***III. Ergebnisse*** ..... 62

### **A. Das GB-Virus-A und GB-Virus-B**..... 62

1. Reinisolierung des GB-Virus-A und GB-Virus-B .....	62
1.1 Reinisolierung des GB-Virus-A und Studien zur Kreuzimmunität.....	62
1.2 Reinisolierung des GB-Virus-B und Studien zur Kreuzimmunität.....	68
2. Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A und GB-Virus-B .....	74
2.1 Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A .....	74
2.1.1 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde ....	75
2.1.2 Gewinnung der Gewebeprobe.....	78
2.1.3 Der Replikationsort von GBV-A.....	80
2.2 Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-B .....	84
2.2.1 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde ....	84
2.2.2 Gewinnung der Gewebeprobe.....	87
2.2.3 Der Replikationsort von GBV-B.....	88

### **B. Das humane GB-Virus-C**..... 91

1. Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-C .....	91
1.1 Nachweis des Replikationsortes mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	91
1.1.1 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde ....	91
1.1.2 Herstellung HBV-spezifischer Sonden als Positivkontrolle der Hybridisierung .	98
1.1.3 Gewinnung der Gewebeprobe.....	100
1.1.4 Der Replikationsort von GBV-C.....	101

1.1.5 Abschließende Untersuchungen zur Spezifität der GB-Hybridisierungssonden .	103
1.2 Nachweis des GB-Virus-C-Genoms in PBMCs.....	103
1.3 <i>In vitro</i> -Infektion von PBMCs durch GB-Virus-C.....	109
1.4 Epidemiologische Studie mit knochenmarktransplantierten Patienten .....	114
2. Herstellung rekombinanter Proteine zum Nachweis von Antikörpern gegen GBV-C	117
2.1 Gewinnung und Präparation von GBV-C-Amplifikaten.....	118
2.2 Präparation der Expressionsvektoren .....	120
2.3 Ligation der GBV-C-Amplifikate und Transformation .....	121
2.4 Optimierung der Expressionsbedingungen .....	123
2.5 “Scale-Up” Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine .....	125
2.6 Herstellung und Austestung monoklonaler Anti-E2-Antikörper .....	127
2.7 Charakterisierung der Bindedomäne des Anti-E2-Antiköpers “1F6” .....	128
2.8 Etablierung eines GBV-C-ELISA-Testsystems .....	132
3. Untersuchungen zur Prävalenz und Übertragung des GB-Virus-C .....	133
<b><i>IV. Diskussion</i></b> .....	<b>138</b>
<b>A. Das GB-Virus-A und GB-Virus-B</b> .....	<b>138</b>
1. Reinisolierung der GB-Viren GBV-A und GBV-B .....	138
2. Challenge-Experimente mit GBV-A und GBV-B .....	138
3. Bestimmung des Replikationsortes von GBV-A und GBV-B .....	139
<b>B. Das humane GB-Virus-C</b> .....	<b>140</b>
1. Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C .....	140
2. Diagnostischer Nachweis einer GB-Virus-C-Infektion .....	145
3. Prävalenz des GB-Virus-C.....	147
<b>C. Ausblick</b> .....	<b>148</b>
<b><i>V. Zusammenfassung</i></b> .....	<b>149</b>
<b><i>VI. Literatur</i></b> .....	<b>151</b>
<b><i>VII. Anhang</i></b> .....	<b>165</b>
<b>A. Abkürzungen</b> .....	<b>165</b>
<b>B. Vektoren</b> .....	<b>166</b>
<b>C. Publikationen</b> .....	<b>170</b>

## I. EINLEITUNG

Die Virushepatitiden A-E stellen heute weltweit eine der wichtigsten Infektionserkrankungen dar. Es konnten bisher fünf verschiedene, primär hepatotrope, virale Hepatitisserreger (Tab.I.1) identifiziert werden, die zusammen für ca. 80-90 % aller Virushepatitiden verantwortlich sind. Daneben gibt es zahlreiche nicht primär hepatotrope Viren, bei denen, unter Mitbeteiligung anderer Organsysteme, auch die Leber betroffen sein kann (sogenannte "Begleithepatitis", z.B. CMV, EBV, Parvovirus B19, Coxsackieviren, Viren, die hämorrhagische Fieber auslösen).

**Tab.I.1** Entdeckung und familiäre Zuordnung der Hepatitisviren A-E.

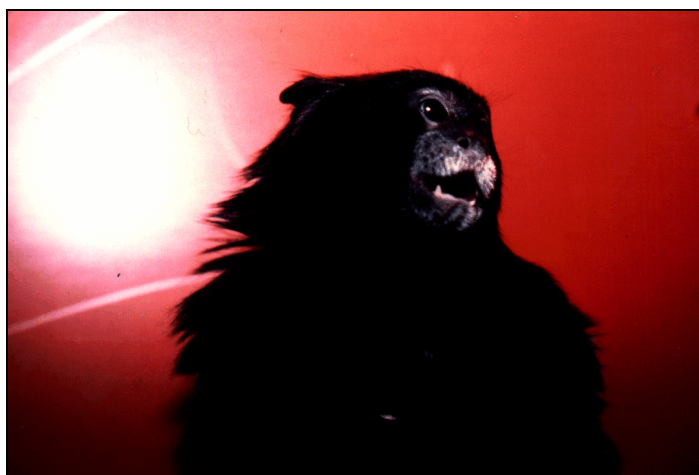
<b>Erreger</b>	<b>Virusfamilie</b>	<b>Entdeckung</b>	
Hepatitis-A-Virus (HAV)	Picornaviridae	1973	Entdeckung in Stuhlproben (Feinstone <i>et al.</i> )
Hepatitis-B-Virus (HBV)	Hepadnaviridae	1964	Entdeckung des Hepatitis B Oberflächenantigens (HBsAg) (Blumberg <i>et al.</i> )
		1971	Entdeckung des vollständigen Viruspartikels (Dane <i>et al.</i> )
Hepatitis-C-Virus (HCV)	Flaviviridae	1974	Erste Hinweise auf HCV, beschrieben als sogenannte Non-A-Non-B-Hepatitis
		1989/90	Identifizierung von HCV (Choo <i>et al.</i> , 1989; Choo <i>et al.</i> , 1990)
Hepatitis-D-Virus (HDV)	Hepadnaviridae	1977	Entdeckung in Patienten mit chronischer Hepatitis-B (Rizzetto <i>et al.</i> )
Hepatitis-E-Virus (HEV)	Caliciviridae	1990/91	Entdeckung von HEV (Reyes <i>et al.</i> , 1990; Reyes <i>et al.</i> , 1991)

10-20 % der verbleibenden Virushepatitiden können trotz zuverlässiger Teste keinem der bisher bekannten viralen Hepatitisserreger zugeordnet werden (Non-A-E-Hepatitis). In vielen klinischen Studien wurden Patienten mit erhöhten Aminotransferase-Spiegeln (Marcellin *et al.*, 1993) und chronischer (Alter *et al.*, 1992) oder fulminanter Hepatitis (Kuwada *et al.*, 1994) gefunden. So entstand die Vermutung, daß zumindest noch ein bis dahin unbekannter Erreger humaner viraler Hepatitiden existieren sollte. Ein im Jahr 1995 entdecktes, dem der Familie der *Flaviviridae* angehörenden Hepatitis-C-Virus ähnliches Virus, von den beiden Erstbeschreibern als "GB-Virus-C" (GBV-C) bzw. "Hepatitis-G Virus" (HGV) bezeichnet, wurde als möglicher Auslöser dieser bis dahin ätiologisch ungeklärten Erkrankung diskutiert.

## 1. Historische Hinweise auf ein neuartiges Hepatitisvirus

Erstmalige Vermutungen über die mögliche Präsenz eines weiteren viralen Hepatitisserregers kamen im Jahre 1964 auf, als ein 34-jähriger Chirurg aus Chicago mit den Initialen "G.B." an einer akuten Hepatitis unbekannter Ätiologie erkrankte.

Der damals an der Universität von Illinois tätige Virologe Dr. Friedrich Deinhardt, von 1977-1992 Direktor des Max von Pettenkofer-Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München, inokulierte 1967, auf der Suche nach einem Tiermodell für die damals bekannten viralen Erreger der Hepatitis A und B, südamerikanische Krallenaffen (s. Abb.I.1) mit Akutserum (dritter Tag der Gelbsucht) des Chirurgen "G.B."



**Abb.I.1**

Südamerikanischer Krallenne (Tamarin) der Spezies *Sanguinus fuscicollis*. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Judith Seebach zur Verfügung gestellt.

Die Krallenaffen entwickelten daraufhin eine klinisch, laborchemisch und histologisch dokumentierte Hepatitis, was sich in erhöhten Leberenzym-Werten, insbesondere des Enzymes Alanin-Amino-Transferase (ALT), zeigte. Ebenso war eine Passagierung des "GB-Agens" in Krallenaffen möglich (Deinhardt *et al.*, 1967). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das GB-Hepatitis-Agens humanen Ursprungs war oder es sich möglicherweise um ein endogenes aktiviertes Affenvirus handelte (Parks *et al.*, 1969). Aufgrund serologischer und physikalischer Eigenschaften sowie durch Kreuzinfektionsexperimente konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem "GB-Agens" um keinen der bis dahin bekannten viralen Hepatitisserreger (Hepatitis-A-Virus und Hepatitis-B-Virus) handelte (Deinhardt *et al.*, 1975). Infolge späterer Untersuchungen konnte auch eine Identität mit dem 1989 entdeckten Hepatitis-C-Virus, damals bezeichnet als "Non-A-Non-B-Hepatitis-Virus", und dem 1990 entdeckten Hepatitis-E-Virus ausgeschlossen werden. Trotz aller Bemühungen gelang es F. Deinhardt bis zu seinem Tod im Frühjahr 1992 nicht, den Erreger der GB-Hepatitis der Krallenaffen zu identifizieren.

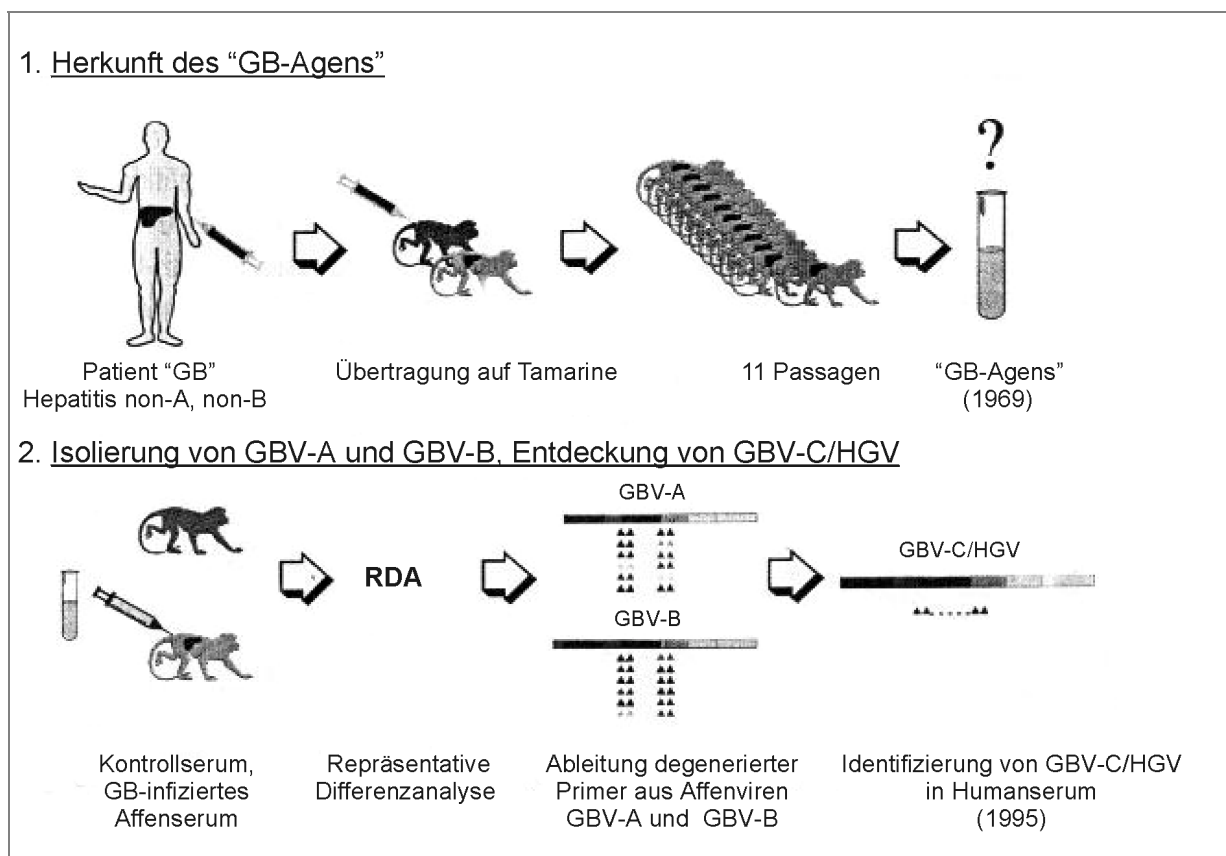
## **2. Isolierung des GB-Virus-A (GBV-A) und GB-Virus-B (GBV-B)**

Fast 30 Jahre nach den ersten Hinweisen auf das Vorhandensein eines neuen viralen Hepatitisregens gelang Wissenschaftlern der Firma Abbott Laboratories, North Chicago, die Identifizierung viraler Nukleinsäuren in dem Serum eines mit dem GB-Hepatitis-Agens infizierten Tamarinen (Simons *et al.*, 1995). Die Isolierung wurde mittels einer neuen Technologie, der sogenannten "Repräsentativen Differenzanalyse" (Representational Difference Analysis, RDA) nach Lisitsyn *et al.* (Science, 1993) durchgeführt, bei der durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) selektiv Nukleinsäuren amplifiziert werden, die in einer Probe vorhanden sind und in einer ansonsten identischen Kontrolle fehlen. Unter Verwendung von Serumproben eines Tamarins vor (Kontrolle) und nach Infektion mit dem GB-Agens (Probe) konnten sieben cDNA-Klone mit viralen Sequenzen isoliert werden (s. Abb.I.3). Die Sequenzanalyse der cDNA-Klone führte zu dem überraschenden Ergebnis, daß das GB-Hepatitis-Agens zwei verwandte, jedoch verschiedene Viren enthielt, die als "GB-Virus-A" (GBV-A) und "GB-Virus-B" (GBV-B) bezeichnet wurden (Simons *et al.*, 1995). Studien zur Übertragung des GB-Hepatitis-Agens in Tamarinen mit anschließender molekularer und serologischer Analyse konnten dieses Ergebnis bestätigen (Schlauder *et al.*, 1995). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem Hepatitis-C-Virus wurden sie vorläufig als neuer Genus in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet und als mögliche Agentien für Non-A-E-Hepatitisfälle diskutiert. Zur Untersuchung dieser möglichen Beteiligung an Non-A-E-Hepatitisiden, wurden unter Verwenden rekombinanter Proteine beider Viren (Core und Nicht-Struktur (NS)-Proteine NS3, NS4, NS5 des GBV-B; NS-Proteine des GBV-A; vgl. Kap.I.4) Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays (ELISAs) etabliert. Die ELISAs zeigten, daß GB-inokulierte Tamarine mit einer spezifischen, jedoch wieder abklingenden Antikörper-Antwort gegenüber rekombinantem GBV-B-Proteinen reagieren. Durch mit reverser Transkription gekoppelte Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) konnte zusätzlich in Tamarinseren einige Wochen nach Inokulation virale RNA von GBV-A und/oder GBV-B nachgewiesen werden (Simons *et al.*, 1995)

## **3. Isolierung des humanen GB-Virus-C (GBV-C)/Hepatitis G-Virus (HGV)**

Mit Hilfe der für GBV-A und GBV-B etablierten ELISAs sollte nun auch die Prävalenz von virusspezifischen Antikörpern in Patientenseren (Blutspender und Hepatitis-Risikogruppen) bestimmt werden. Es konnte jedoch bei keinem der ELISA-positiven Patienten in der PCR die RNA von GBV-A oder GBV-B nachgewiesen werden. Aufgrund der zusätzlich fehlenden

Korrelation zu klinischen Daten einer Virushepatitis wurde gefolgert, daß der eingesetzte ELISA keine spezifischen, sondern mit Epitopen von GBV-A bzw. GBV-B kreuzreagierende Antikörper erkannt hatte und diese Antikörper-Reaktion durch ein mit GBV-A bzw. GBV-B verwandtes Virus hervorgerufen worden sein könnte. Unter dieser Annahme wurden die immunreaktiven Seren erneut in der RT-PCR getestet, wobei nun anstelle von spezifischen Primern (Erkennung der exakten Zielsequenz) degenerierte Primer (Erkennung auch nah verwandter RNA-Sequenzen) für das mutmaßliche Helikase-Gen (vgl. Kap.I.4) von GBV-A, GBV-B und HCV, eingesetzt wurden (vgl. Abb.I.2). Mit Hilfe dieser Methode gelang es, aus einer Serumprobe eines westafrikanischen Patienten mit aplastischer Anämie ein RNA-Fragment zu amplifizieren, das eine virusähnliche Sequenz mit einer Identität von 59.0 %, 53.7 % und 47.9 % auf Nukleinsäureebene und von 64.2 %, 57.3 % und 50.4 % auf Aminosäureebene zu GBV-A, HCV-1 und GBV-B aufwies. Weitere molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß es sich hierbei um ein neues humanes Virus handelte, das vorläufig als “GB-Virus-C” (GBV-C) bezeichnet wurde (Simons *et al.*, 1995).



**Abb.I.2** Entdeckung der GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C.

Mittels repräsentativer Differenzanalyse (RDA) konnten die Viren GBV-A und GBV-B im Serum mit dem “GB-Agens” infizierter Tamarine identifiziert werden. In humanen Seren, die in einem ELISA mit rekombinanten Proteinen von GBV-A/GBV-B reagierten, wurde durch PCR mit degenerierten Primern ein drittes Virus, das GB-Virus-C, identifiziert (nach Kekulé *et al.*, 1997).

Einer anderen Forschergruppe mit Wissenschaftlern der Firmen Genelabs Technologies und Boehringer Mannheim gelang es auf ähnlichem Wege, nach Inokulation von Primaten mit Serum eines afrikanischen Patienten mit akuter Hepatitis unklarer Ätiologie, ein weiteres mit GBV-A, GBV-B und HCV verwandtes Virus zu isolieren, daß als "Hepatitis-G-Virus" (HGV) bezeichnet wurde (Linnen *et al.*, 1996)<sup>(1)</sup>. Nach Analyse der RNA-Genome von GBV-C und HGV (85.5 % Nukleinsäure-Identität und 100 % Aminosäure-Identität bezüglich der angenommenen NS3-Helikase-Region) stellte sich heraus, daß es sich um Isolate desselben Virus handelte (Linnen *et al.*, 1996). Nachdem GBV-C keine Hepatitis verursacht, ist die Übereinkunft getroffen worden, die Bezeichnung "HGV" vorerst nicht weiter zu gebrauchen. Deswegen wird in dieser Arbeit der Name GBV-C verwendet.

## **4. Molekularbiologie der GB-Viren**

### **4.1 Das GB-Virus-A und GB-Virus-B**

#### *Genomorganisation*

Die Genome von GBV-A/GBV-B konnten bereits vollständig sequenziert werden (Muerhoff *et al.*, 1995). Es handelt sich um einzelsträngige lineare RNA-Moleküle mit Plusstrang-Orientierung und einer Länge von 9.493 bzw. 9.143 Nukleotiden für GBV-A bzw. GBV-B. Ein einziger "Offener Leserahmen" (Open Reading Frame, ORF) codiert hierbei für ein Vorläufer-Polyprotein von 2.972 bzw. 2.864 Aminosäuren Länge für GBV-A bzw. GBV-B. Aus Vergleichen der Hydropathie-Profile von GBV-A, GBV-B, HCV (Hepatitis C-Virus), BVDV (Bovines Virusdiarrhoe-Virus) und YFV (Yellow Fever Virus) konnte eine ähnliche Struktur und Organisation des Polyproteins von GBV-A und GBV-B, insbesondere mit HCV-1, festgestellt werden. Im aminoterminalen Bereich werden, entsprechend zu HCV, die Strukturproteine Core, Envelope-1 (E1) und Envelope-2 (E2), im carboxyterminalen Bereich die Nichtstruktur-Proteine NS2, NS3, NS4 und NS5 codiert (vgl. Abb.I.3). Das Core-Protein konnte bisher nur bei GBV-B eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich hierbei, übereinstimmend mit HCV, um ein stark basisches Protein. Für GBV-A konnte bisher kein Core-ähnlicher Bereich gefunden werden. Die verfügbaren Sequenzinformationen (Simons *et*

---

<sup>(1)</sup> Der Buchstabe "F" im Alphabet der Hepatitisviren wurde bereits im Jahre 1994 (Deka *et al.*, 1994) vorläufig an ein anderweitiges hepatotropes, enteritisch übertragbares Virus vergeben (Hepatitis-F-Virus; HFV). Anschließend Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen.



*al.*, 1996) über den 5'-terminalen Bereich des Genoms reichen derzeit nicht aus, um den Übergang zwischen Core-Region und 5'-nichttranslatierter Region (5'-NTR) einerseits und dem E1-Leserahmen andererseits zu lokalisieren. Bei den Strukturproteinen E1 und E2 handelt es sich, analog zu HCV, vermutlich um Bestandteile der Virushülle. Aufgrund einer 60 %igen Aminosäure-Identität zu den Nichtstruktur-Proteinen von HCV wird für die NS-Proteine von GBV-A und GBV-B angenommen, daß sie eine ähnliche biochemische Funktion besitzen. So würde das hydrophobe NS2-Protein eine Protease-Funktion, das hydrophile NS3-Protein eine Protease/Helikase-Funktion und das hydrophile NS5B-Protein eine Replikase-Funktion übernehmen. Für NS4 (hydrophob) und NS5A (hydrophil) ist, entsprechend zu HCV, bisher keine Enzymfunktion bekannt. Bei GBV-B wird jedoch von einer eventuellen Prozessierung des NS4 in NS4A und NS4B ausgegangen.

Der gesamte ORF von GBV-A/GBV-B wird durch sogenannte nichttranslatierte Regionen, der 5'-NTR und 3'-NTR eingegrenzt. Nur bei GBV-B konnte durch die vorhandene Abgrenzung der Core-Region die Länge des 5'-NTR mit 445 Nukleotiden festgelegt werden. Zusätzlich konnten durch den Vergleich des 5'-NTR von GBV-B mit dem 5'-NTR von HCV konservierte Sequenzen und nah verwandte Sekundärstrukturen festgestellt werden. Ausgehend davon wurde, entsprechend zu HCV, auf eine "Internal Ribosom Entry Site" (IRES) vermittelte Translationsinitiation geschlossen wurde (Simons *et al.*, 1996). Für GBV-A wird, trotz abweichender Sekundärstruktur des 5'-NTR zu HCV, eine ähnliche Form der Translationsinitiation angenommen.

Hinsichtlich der proteolytischen Prozessierung der Polyproteine von GBV-A und GBV-B wird von einem Mechanismus ausgegangen, der dem von HCV ähnlich ist (Muerhoff *et al.*, 1995). So wurden u.a. Sequenzmotive innerhalb des Polyproteins von GBV-A und GBV-B nachgewiesen, die Sequenzmotiven an den Prozessierungsstellen innerhalb der NS-Proteine von HCV ähneln. Für die Spaltung der Struktur- und Nichtstruktur-Proteine sind vermutlich, entsprechend zu HCV, sowohl Wirts- als auch virale Proteasen (z.B. Serin-Protease, codiert durch den N-Terminus des NS3) verantwortlich.

### *Phylogenetische Analyse*

Zueinander und zu HCV zeigen GBV-A und GBV-B bezüglich ihrer Nukleotidsequenz eine signifikante, jedoch begrenzte Ähnlichkeit innerhalb der NS3- (Helikase) und der NS5B- (RNA-abhängige RNA-Polymerase) Region (s. Tab.I.2).

**Tab.I.2** Nukleotidsequenz-Identität von GBV-A/GBV-B mit HCV innerhalb der NS3- und NS5B-Region (modifiziert nach Muerhoff *et al.*, 1995).

	NS3-Region (Helikase)	NS5B-Region (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
<b>GBV-A zu HCV-1b</b>	53 %	55 %
<b>GBV-B zu HCV-1b</b>	62 %	48 %

Nach Aminosäuresequenz-Vergleichen zeigen GBV-A und GBV-B zu anderen Plusstrang-RNA-Viren, v.a. jedoch zu den der Familie der *Flaviviridae* angehörenden Viren (z.B. BVDV Bovine Virus Diarrhoe Virus; HCHV, Schweine-Cholera Virus; YFV, Yellow Fever Virus; WNV, West Nil Fever Virus) geringe Ähnlichkeit, insbesondere in Bezug auf bestimmte Sequenzmotive innerhalb der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und der Helikase. Die größte Verwandtschaft besteht jedoch zu HCV (s. Tab.I.3).

**Tab.I.3** Aminosäuresequenzidentität von GBV-A/GBV-B mit HCV-Genotypen, Flaviviren und Pestiviren hinsichtlich der kompletten ORF-Sequenz (modifiziert nach Muerhoff *et al.*, 1995).

	HCV-Genotypen (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b)	BVDV	HCHV	YFV	WNV	GBV-A
<b>GBV-A</b>	26-31 %	20 %	20 %	19 %	19 %	
<b>GBV-B</b>	27-33 %	22 %	21 %	19 %	20 %	27%

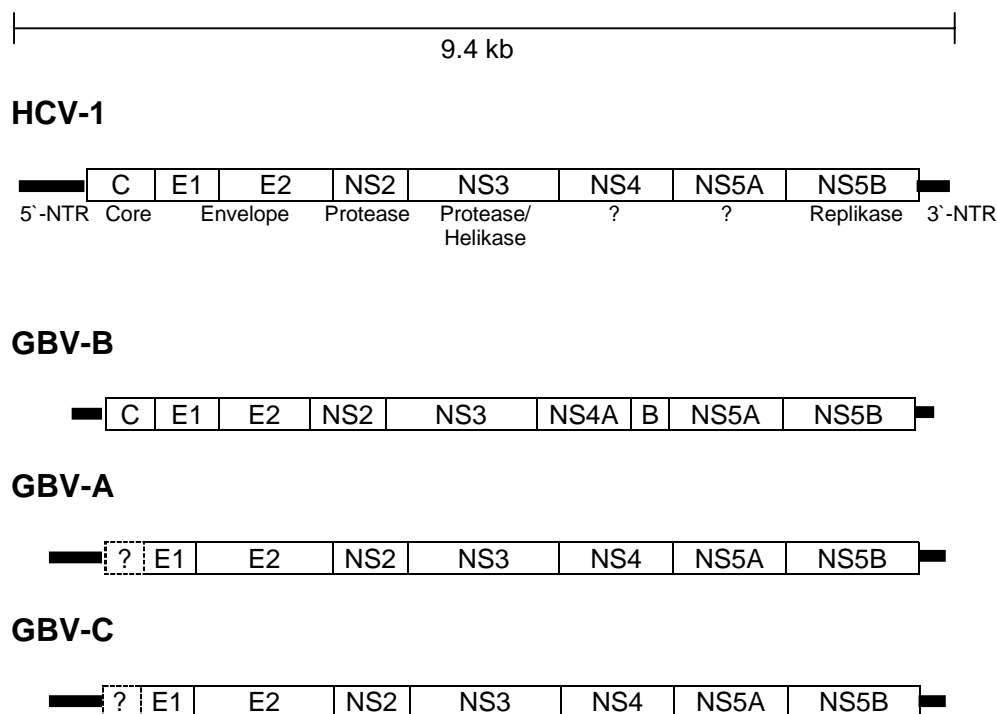
Aufgrund der ähnlichen Genomorganisation, sowie der bestehenden, jedoch limitierten Sequenzidentität zu HCV wurden das GB-Virus-A und das GB-Virus-B nicht als neuer Genotyp von HCV, sondern als neuer Genus, vorläufig als “GB-Virus” bezeichnet, in die Familie der *Flaviviridae* eingeordnet. Phylogenetische Analysen der beiden GB-Viren untereinander ergaben eine über den gesamten ORF gemittelte Aminosäure-Identität von 27 %. Aufgrund dieser Divergenz werden GBV-A und GBV-B als zwei unterschiedliche Vertreter des Genus “GB-Virus” der Familie der *Flaviviridae* betrachtet.

## **4.2 Das GB-Virus-C**

### *Genomorganisation*

Das Genom von GBV-C konnte bereits vollständig sequenziert werden (Leary *et al.*, 1996; Linnen *et al.*, 1996; Okamoto *et al.*, 1997). Es handelt sich, den beiden anderen GB-Viren entsprechend, um ein einzelsträngiges lineares RNA-Molekül mit Plusstrang-Orientierung mit einer Länge von 9.125 Nukleotiden. Ein einziger ORF codiert für ein Vorläufer-Polypeptid

von 2.906 Aminosäuren Länge. Hinsichtlich der Genomorganisation ähnelt GBV-C sowohl den beiden bisher bekannten GB-Viren als auch HCV (vgl. Abb.I.3).



**Abb.I.3** Vermutliche Genomorganisation der GB-Viren im Vergleich zu HCV (Genotyp HCV-1).

Anhand der Protease-Schnittstellen wurde die Lage der Strukturproteine (Core, C; Envelope 1, E1; Envelope 2, E2) und Nichtstrukturproteine (NS2, Protease; NS3, Protease/Helikase; NS4, unbekannte Funktion; NS5A, unbekannte Funktion; NS5B, Replikase) ermittelt. Bei GBV-B existiert vermutlich ein abgegrenztes NS4A (modifiziert nach Leary *et al.*, 1996 und Muerhoff *et al.*, 1995).

Die Existenz eines GBV-C-Core-Proteins am aminoterminalen Ende des ORF wurde lange Zeit in Frage gestellt. Ein Grund hierfür war, daß der offene Leserahmen kurz oberhalb des E1-Proteins abgeschnitten oder gar nicht vorhanden war. Konservierte Nukleotidsequenz-Motive der entsprechenden HCV- und GBV-B-Region wurden in der 5'-terminalen Sequenz von GBV-C nicht gefunden. So entstand die Meinung, daß GBV-C kein bzw. nur eine verkürzte Form eines Core-Proteins codiert (Linnen *et al.* 1996; Leary *et al.*, 1996; Muerhoff *et al.*, 1996; Simons *et al.*, 1996). Aufgrund des erhöhten Nukleinsäurepolymorphismus am aminoterminalen Ende des ORF wurde angenommen, daß es sich um keine codierende Region handeln könnte (Okamoto *et al.*, 1997). Mittels biophysikalischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte jedoch die Existenz von Nukleokapsidpartikel mit einer Größe von ca. 50 nm im Plasma eines GBV-C infizierten Patienten (HCV-RNA negativ) gezeigt werden (Xiang *et al.*, 1999). Ebenso gelang es, aus Isolaten GBV-C infizierter

Personen, Antikörper gegen ein rekombinantes Peptid dieser vermutlichen Core-Region zu identifizieren (Xiang *et al.*, 1998). Diesen Daten zufolge wird heute davon ausgegangen, daß GBV-C oberhalb des E1 eine Core-codierende Region besitzt und diese auch *in vivo* exprimiert.

Die Strukturproteine E1 und E2 sind, analog zu GBV-A, GBV-B und HCV, vermutlich Bestandteile der Virushülle. Für die Nichtstruktur-Proteine wird aufgrund der hochkonservierten Regionen im NS3- (Helikase) und NS5B-Bereich (Replikase), sowie im aminoterminalen Bereich von NS3 (Serin-Protease) eine ähnliche biochemische Funktion wie bei HCV angenommen.

Die Translationsinitiation betreffend wird bei GBV-C, aufgrund der langen 5'NTR, ebenfalls von einem mit GBV-A, GBV-B und HCV vergleichbaren Mechanismus mittels einer "Internal Ribosom Entry Site" (IRES) ausgegangen (Simons *et al.*, 1996).

Bezüglich der proteolytischen Prozessierung des Polyproteins konnten auch bei GBV-C die für die viral codierte Serin-Protease notwendigen Erkennungssequenzen im NS-Bereich festgestellt werden. Zusätzlich konnten vier Erkennungssequenzen für eukaryotische Wirtsproteasen bestimmt werden, die v.a. für die Spaltung der Strukturproteine verantwortlich sind (Leary *et al.*, 1996).

#### *Phylogenetische Analyse*

Aminosäuresequenz-Vergleiche über den Bereich des offenen Leserahmens von GBV-C und HGV zu GBV-A, GBV-B und HCV-1 ergaben die in Tab.I.4 dargestellten Ergebnisse.

**Tab.I.4** Aminosäuresequenzidentität bezüglich der Polyproteine von HCV, GBV-A, GBV-B, GBV-C und HGV (nach Laufs *et al.*, 1997).

	HCV-1	GBV-A	GBV-B	GBV-C
<b>GBV-A</b>	26 %			
<b>GBV-B</b>	32 %	27 %		
<b>GBV-C</b>	29 %	<b>48 %</b>	28 %	
<b>HGV</b>	28 %	<b>49 %</b>	29 %	<b>95 %</b>

Diesen Daten entsprechend handelt es sich bei GBV-C und HGV mit einer Aminosäuresequenzidentität von 95 % tatsächlich um verschiedene Isolate des selben Virus. Innerhalb der GB-Viren am engsten verwandt sind GBV-C/HGV und GBV-A mit einer Aminosäuresequenzidentität von 48 % bzw. 49 %. Phylogenetisch gesehen ist GBV-C/HGV von GBV-B etwa genauso weit entfernt wie von HCV. Desweiteren zeigen GBV-C/HGV und GBV-A

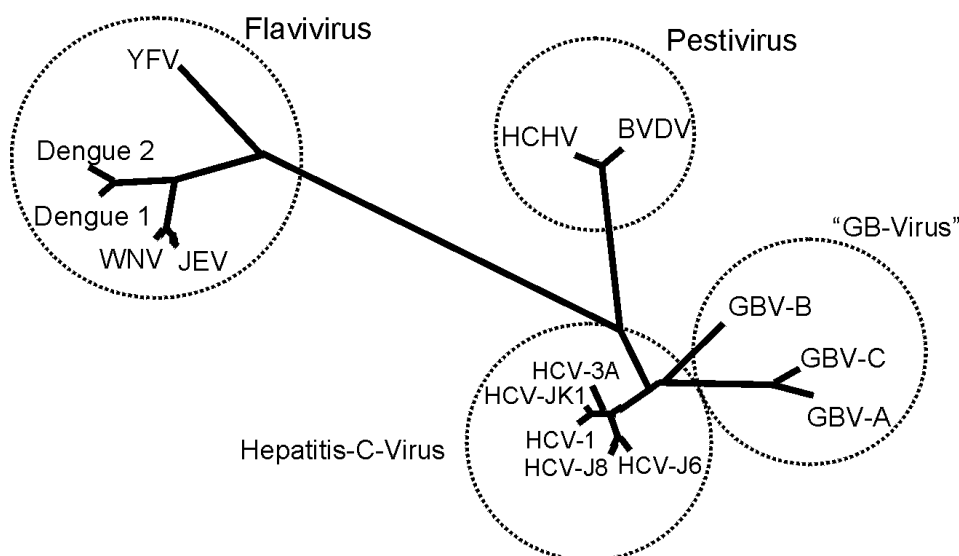
annähernd die gleiche Identität zu GBV-B. Insgesamt gesehen konnte bestätigt werden, daß es sich bei GBV-A, GBV-B und GBV-C/HGV nicht um Genotypen eines einzigen "GB-Virus" handelt (s. Abb.I.4).

Zur exakteren Bestimmung des Verwandtschaftsgrades des GBV-C zu den oben genannten Viren wurden aus Aminosäuresequenz-Vergleichen des gesamten ORF die Aminosäureaustausche pro Position berechnet (Leary *et al.*, 1996). Hieraus ergab sich, übereinstimmend mit der Aminosäuresequenz-Identität (Tab.I.4), daß GBV-C den größten Verwandtschaftsgrad zu GBV-A und eine beinahe gleichgroße evolutionäre Distanz zu GBV-B und HCV besitzt. Die hohe Zahl an Aminosäureaustauschen von GBV-A, GBV-B und GBV-C gegenüber den HCV-Genotypen ließ die Schlußfolgerung zu, daß die GB-Viren als eigenständige Viren von der Gruppe der Hepatitis-C-Viren abzugrenzen sind (Leary *et al.* 1996).

**Tab.I.5** Phylogenetische Distanzen bezüglich der Polyproteine der GB-Viren und einiger HCV-Isolate zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades (Aminosäureaustausch pro Position) (nach Leary *et al.*, 1996).

	<b>GBV-A</b>	<b>GBV-C</b>	<b>HCV-J6</b>	<b>HCV-J8</b>	<b>HCV-1</b>	<b>HCV-JK1</b>	<b>HCV-3A</b>
<b>GBV-C</b>	<b>0.928</b>						
<b>HCV-J6</b>	2.412	2.149					
<b>HCV-J8</b>	2.412	2.163	0.179				
<b>HCV-1</b>	2.388	2.116	0.359	0.365			
<b>HCV-JK1</b>	2.408	2.127	0.366	0.379	0.174		
<b>HCV-3A</b>	2.443	2.158	0.388	0.396	0.325	0.323	
<b>GBV-B</b>	2.688	2.470	1.699	1.687	1.712	1.717	1.738

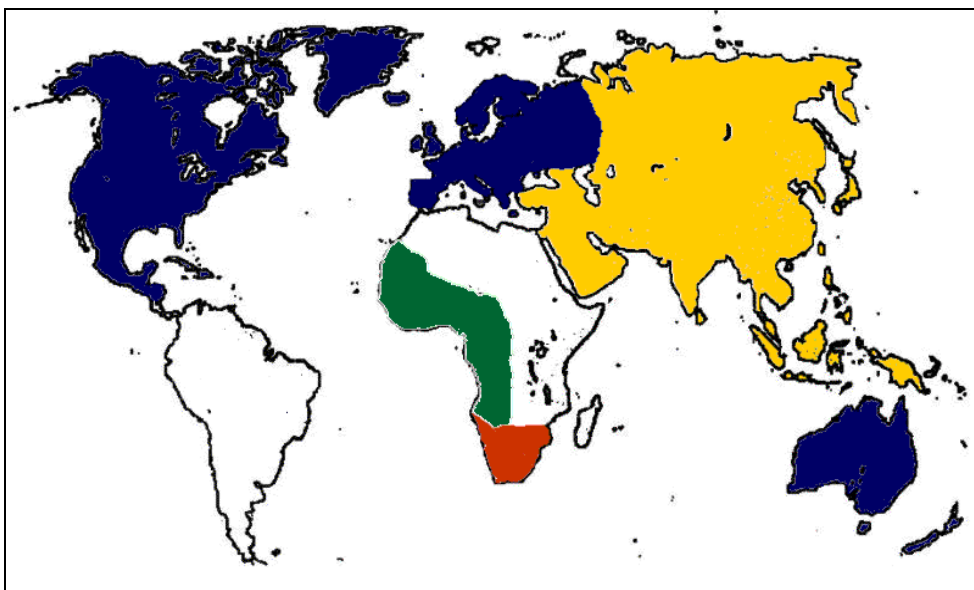
Im Vergleich zu anderen bekannten Flaviviren konnte folgender phylogenetischer Stammbaum erstellt werden (s. Abb.I.4):



**Abb.I.4** Phylogenetischer Stammbaum der Flaviviren.

Die GB-Viren wurden innerhalb der Familie der Flaviviren (*Flaviviridae*) als eigener Genus neben den Genera Flavivirus (YFV, Yellow Fever Virus; WNV, West-Nil-Fieber-Virus; JEV, Japan-Enzephalitis-Virus), Pestivirus (HCHV, Hog-Cholera-Virus; BVDV, Bovines Virusdiarrhoe Virus) und Hepatitis C-Virus (verschiedene Genotypen) eingeordnet (nach Muerhoff *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995; Leary *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997).

Durch vielfache phylogenetische Analysen der hochkonservierten 5'-NTRs verschiedener Isolate von GBV-C konnte bis 1998 die Existenz dreier Genotypen (Hauptgruppen), bestätigt werden, die u.a. gut mit ihrem geographischen Ursprung korrelieren (Muerhoff *et al.*, 1996; Linnen *et al.*, 1997; Okamoto *et al.*, 1997; Mukaide *et al.*, 1997; Katayama *et al.*, 1998). Durch weitere Analysen der hochkonservierten 5'-NTRs war die Identifikation eines vierten, in Südafrika dominierender Genotyps möglich (Tucker *et al.*, 1999). Die geographische Verteilung der vier Genotypen ist aus Abb.I.5 ersichtlich.



**Abb.I.5** Geographische Verteilung der Genotypen von GBV-C.

Der Genotyp 1 (Subtyp 1a und 1b) dominiert in Westafrika (grün). Von hier stammt auch das GBV-C-Originalisolat. In Europa, USA und Australien überwiegt der Genotyp 2 (einschließlich des HGV-Originalisolates) mit den Subtypen 2a und 2b (blau). In Asien wird der Genotyp 3 (gelb) und in Südafrika der Genotyp 4 (rot) von GBV-C gefunden.

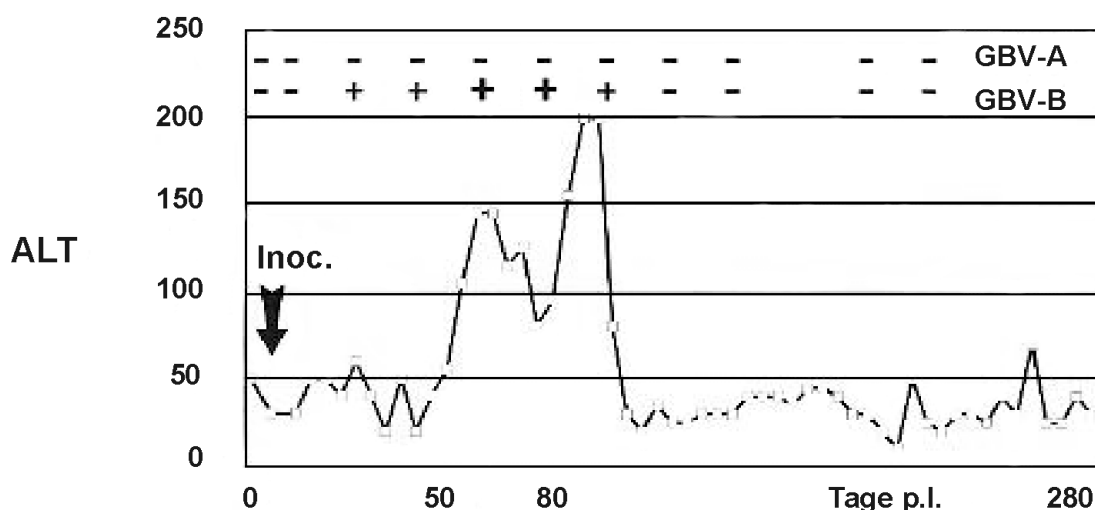
## **5. Pathologie der GB-Viren**

### **5.1 Das GB-Virus-A und GB-Virus-B: die GB-Hepatitis der Tamarine**

Zur Erforschung der Pathophysiologie des GB-Virus-A und GB-Virus-B wurden in Tamarinen (Krallenaffen der Spezies *Saguinus fuscicollis*) Studien zur Übertragung des GB-Agens durchgeführt (Schlauder *et al.*, 1995; persönliche Mitteilung G. Frösner & A. Kekulé, Max von Pettenkofer-Institut, 1995-1997).

Dadurch konnte gezeigt werden, daß Tamarine etwa 4-6 Wochen nach intravenöser Inokulation mit dem, die Viren GBV-A und GBV-B enthaltenden GB-Agens eine biochemisch (deutlicher Anstieg der Leberenzym-Werte ca. 30 Tage nach Inokulation, insbesondere des Alanin-Aminotransferase-Wertes [ALT-Wert]: bis 200 IU/L) und histologisch nachweisbare Hepatitis entwickeln. In ca. 80% der Fälle heilt diese Hepatitis innerhalb von 2-3 Monaten vollständig aus, jedoch konnten auch, ähnlich der Hepatitis-C, chronische Verläufe (persistierende Infektionen) über Monate bis Jahre hinweg beobachtet werden (Schlauder *et al.*, 1995; Kekulé *et al.*, 1996). Da während der akuten Phase der GB-Hepatitis regelmäßig nur die RNA von GBV-B, jedoch nicht von GBV-A im Affenblut mittels RT-PCR (vgl. Abb.I.6) und ebenso stets nur GBV-B in der Leber der infizierten Tamarine mittels Northern-Blotting nachweisbar war, sowie eine alleinige GBV-B-, jedoch nicht GBV-A-Virämie für

eine Erhöhung der Leberenzym Spiegel ausreichend ist, wurde vermutet, daß GBV-B das kausale Agens der GB-Hepatitis bei Tamarinen darstellt (Schlauder *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995).



**Abb.I.6** Typischer Verlauf einer akuten GB-Hepatitis in Krallenaffen der Spezies *Sanguinus fuscicollis*.

Etwa 4-6 Wochen nach Inokulation mit dem GBV-A und GBV-B enthaltenden GB-Agens (Inoc.) kommt es zu einem Anstieg der Serum-Alanin-Aminotransferase (ALT, IU/L). Mittels RT-PCR läßt sich GBV-B im Serum nachweisen, der Nachweis von GBV-A kann negativ bleiben (nach Frösner *et al.*, 1996).

Über die Pathogenese der Infektion mit GBV-A, für das bisher kein Hepatotropismus nachgewiesen werden konnte, ist bisher nichts bekannt. Es konnte jedoch bei mit GBV-A und GBV-B infizierten Tamarinen im Vergleich zu Tamarinen, die nur GBV-B infiziert waren, ein bedeutend höherer ALT-Wert festgestellt werden (188 IU/L im Vergleich zu 120 IU/L). Zusätzlich ist sowohl ein früherer Beginn der Leberenzymhöhung als auch ein früheres Erreichen des ALT-Maximalwerts bei für beide Viren positiven Tamarinen im Vergleich zu nur für GBV-B positiven Tamarinen feststellbar. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, daß die Schwere einer GB-Hepatitis in Zusammenhang mit der Menge beider Viren steht (Schlauder *et al.*, 1995).

Mittels der für GBV-A und GBV-B etablierten ELISAs (Pilot-Matias *et al.*, 1996b) konnte eine vorübergehende Immunantwort (Antikörpernachweis bis maximal 2 Monate nach Klärung der Virusinfektion) gegenüber GBV-B-Antigenen festgestellt werden, wodurch die Tiere vor einer Reinfektion mit dem GB-Virus-B, bestätigt durch einen negativen GBV-B-RNA-Nachweis, geschützt waren. Der Nachweis einer Antikörperreaktion gegenüber GBV-A



blieb negativ und somit auch der Schutz vor einer Reinfektion (Schlauder *et al.*, 1995; Pilot-Matias *et al.*, 1996a).

## **5.2 Das GBV-C**

### *Nachweismethoden*

Zur Untersuchung der Pathologie des humanen GBV-C sollten bestimmte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Prinzipiell können Virusinfektionen durch verschiedene Labormethoden (z.B. Virusisolierung in Zellkultur, Antikörpernachweis mittels Western Blot oder ELISA, Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz, Nukleinsäurenachweis mittels PCR oder *in situ*-Hybridisierung) diagnostiziert werden.

Für GBV-C gelang es, verschiedene PCRs unter Verwendung von Primerpaaren aus den Nichtstrukturregionen NS3, NS5A sowie aus dem 5'-NTR zu etablieren (Schlueter *et al.*, 1996; Leary *et al.*, 1996; Kekulé *et al.*, 1997). Mit den einzelnen Primersets können hierbei vergleichbare Resultate mit einer ähnlichen Sensitivität wie bei der zum Nachweis von HCV eingesetzten PCR erzielt werden (Nachweisgrenze: ca. 500 Virusgenome/ml Serum). Trotz der Vielfalt an vorhandenen Primern und PCR-Varianten konnte jedoch nicht davon ausgegangen werden, daß auch tatsächlich alle vorhandenen GBV-C-Isolate erfaßt werden.

Aufgrund der bekannten Genomsequenz und der Bestimmung antigener, d.h. immuno-reaktiver Regionen von GBV-C (Pilot-Matias *et al.*, 1996a) gelang es Wissenschaftlern der Firma Abbott Laboratories, North Chicago (Surowy *et al.*, 1997; Dille *et al.*, 1997) und der Firma Boehringer Mannheim (Tacke *et al.*, 1997), rekombinantes GBV-C-E2-Hüllprotein, das u.a. auch zum Nachweis infektionsspezifischer Antikörper geeignet ist, zu exprimieren, aufzureinigen und anschließend bei der Etablierung eines ELISA einzusetzen. Hiermit stand nun ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Anti-E2-Antikörper zur Verfügung, das zusammen mit der bereits etablierten RT-PCR für epidemiologische Studien zur Untersuchung akuter und bereits abgelaufener GBV-C-Infektion eingesetzt werden konnte. Für das Core-Protein von GBV-C, das bei den Flaviviren im allgemeinen stark immunogen ist, konnte allerdings, aufgrund der immer noch fehlenden Identifizierung dieses Bereiches, bisher kein serologisches Nachweisverfahren etabliert werden. In letzter Zeit gelang es jedoch, weitere Proteine des GBV-C zu exprimieren und in Form eines rekombinanten „Vier-Antigen-Immunoblotes“ (Antigene der Strukturproteine E1 und E2 und der Nichtstrukturproteinen NS3 und NS4) für Seroprävalenz-Studien einzusetzen (Schröter *et al.*, 1999).

### *Epidemiologie und Übertragungswege*

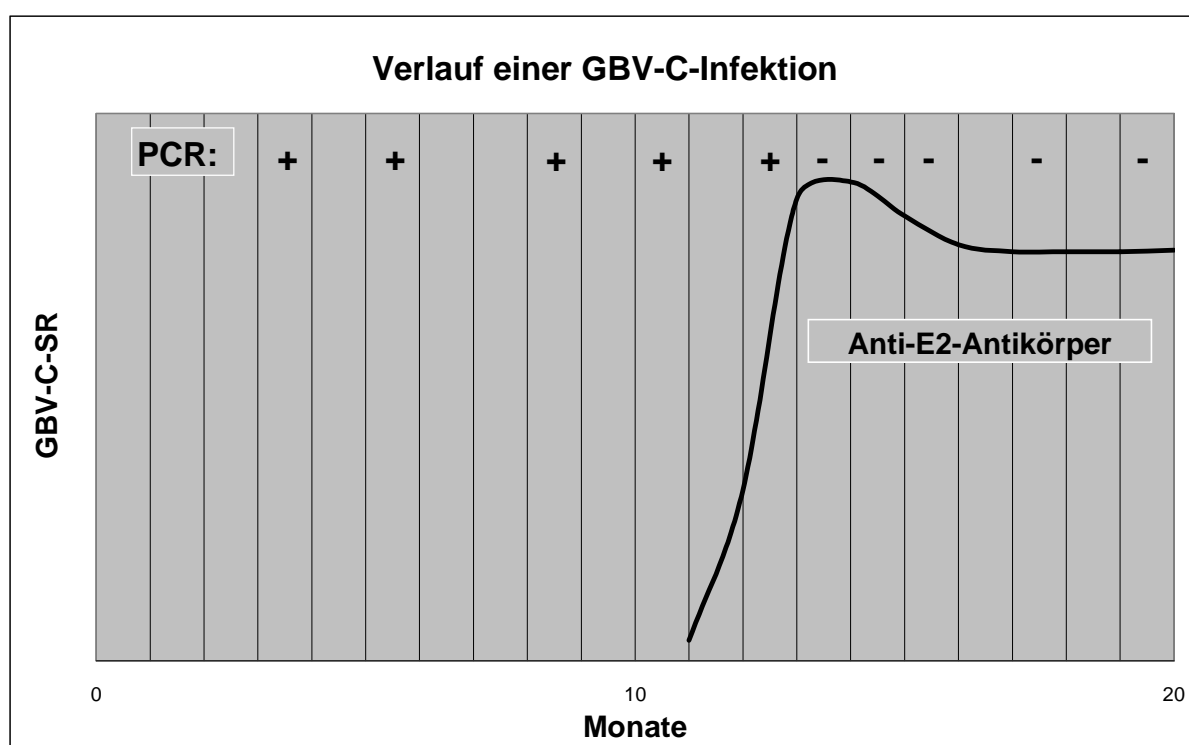
Epidemiologische Studien auf der gesamten Welt ergaben eine Prävalenz des GBV-C von 1-4 % bei gesunden Blutspendern (Dawson *et al.*, 1996; Masuko *et al.*, 1996; Jarvis *et al.*, 1996; Stark *et al.*, 1996). In Patientengruppen mit einem hohem Risiko für eine parenterale Virusexposition, wie z.B. bei Patienten mit mehrfachen Bluttransfusionen, Patienten mit einer mit Blutübertragung assoziierten Hepatitis, Hämophilie-Patienten, i.v.-Drogenabhängigen, Hämodialyse-Patienten, Patienten mit chronischer Hepatitis-B oder -C, sowie Patienten mit Nieren-, Leber- bzw. Knochenmarkstransplantation, kann eine noch wesentlich höhere Prävalenz von GBV-C als in der Normalbevölkerung nachgewiesen werden (Aikawa *et al.*, 1996; Alter *et al.*, 1996; Masuko *et al.*, 1996; Kekulé *et al.*, 1997; Karayiannis *et al.*, 1997; Laufs *et al.*, 1997; Papaevangelou *et al.*, 1997). Dadurch wurde auf eine wichtige Rolle der parenteralen Übertragung von GBV-C durch Blut und Blutprodukte geschlossen. Die relativ hohe Durchseuchung der Normalbevölkerung konnte dadurch nicht erklärt werden. Es mußte deshalb zumindest ein zusätzlicher Übertragungsweg existieren. Epidemiologische Studien zur Prävalenz von GBV-C unter nicht i.v.-drogenabhängigen Homosexuellen und Prostituierten (Kao *et al.*, 1997; Scallan *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 1999) ließen auf eine mögliche Rolle der sexuellen Übertragung von GBV-C aufgrund der hohen Durchseuchungsraten innerhalb dieser Personengruppen schließen. Anderweitige Übertragungsmechanismen konnten identifiziert werden, u.a. die sogenannte vertikale Mutter-Kind-Übertragung. Hierbei werden insbesondere neugeborene Kinder von Müttern mit einer hochtitrigen Virämie perinatal infiziert (Feucht *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1996; Fischler *et al.*, 1997; Viazov *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998). Letztendlich steht nach dem Nachweis von GBV-C in humanem Speichel (Chen *et al.*, 1997; Seemayer *et al.*, 1997) auch die Tröpfchen-Infektion zur Übertragung zur Diskussion.

### *Klinischer Verlauf einer GBV-C-Infektion*

Die meisten GBV-C-Infektionen verlaufen subklinisch oder vollkommen asymptomatisch. Nach Infektion mit GBV-C kann mittels PCR regelmäßig eine Virämie festgestellt werden. Dabei lassen sich im Normalfall die Virusgenome erstmals ein bis vier Wochen nach Infektion im Serum nachweisen. Der anfänglich niedrige Titer erreicht innerhalb der folgenden ein bis zwei Wochen mit  $10^4$  bis  $10^5$  Genomäquivalente/ml einen Höchstwert, der in der gleichen Größenordnung wie bei HCV liegt (Kekulé *et al.*, 1997). Mit Ausnahme einiger Fälle mit einer leichten Erhöhung des ALT-Spiegels bleiben die ALT-Werte dabei meistens im Normalbereich. In über 90 % aller Fälle GBV-C-infizierter Patienten kann sich

eine, entsprechend zu GBV-B in Tamarinen, über Monate bis Jahre hinweg andauernde persistierende Infektion entwickeln, die jedoch meistens mit normalen ALT-Spiegeln verbunden ist (Linnen *et al.*, 1996; Masuko *et al.*, 1996).

Der Verlust der GBV-C-RNA (Virusklärung) geht meist mit dem Auftreten spezifischer Antikörper gegen das E2-Hüllprotein einher (Dille *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 1997, Thomas *et al.*, 1998), was auf eine Eliminierung des Virus durch Anti-E2-Antikörper schließen lässt (Lou *et al.*, 1997) (vgl. Abb.I.7). Bis heute bleibt jedoch unklar, ob die Existenz dieser Anti-E2-Antikörper eine lebenslange Immunität verleiht.



**Abb.I.7** Typischer Verlauf einer GBV-C-Infektion mit Viruselimination.

Nach einer individuell unterschiedlich langen GBV-C-Virämie, die über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis zu mehreren Jahren andauern kann, kommt es zur Bildung spezifischer Antikörper, die gegen das E2-Antigen von GBV-C gerichtet sind (GBV-C-SR: GBV-C-Seroreaktivität). Nach Auftreten der Immunantwort ist die GBV-C-RNA mittels RT-PCR nicht mehr im Blut nachweisbar.

Trotz der Vielfalt an bisherigen Erkenntnissen zum Verlauf, der Epidemiologie und den Übertragungswegen einer GBV-C-Infektion, bleibt die Frage bezüglich der klinischen Relevanz einer GBV-C-Virämie und der pathologischen Effekte weiterhin völlig offen. Aufgrund der ähnlichen Genomorganisation mit HCV und GBV-B und der bekannten Pathologie von HCV und GBV-B, wurde GBV-C oft mit der Pathogenese verschiedener Lebererkrankungen in Zusammenhang gebracht.

---

a. GBV-C in der Ätiologie akuter und chronische Non-A-E Hepatitiden

Das GB-Virus-C wurde desöfteren im Zusammenhang mit akuter bzw. chronischer Non-A-E Hepatitis beschrieben (Fiordalisi *et al.*, 1996; Alter H.J. *et al.*, 1997; Alter M.J. *et al.*, 1997; Miyakawa *et al.*, 1997; Yashina *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Frider *et al.*, 1998). Die Meinungen waren jedoch, bezüglich einer kausalen Assoziation von GBV-C in der Ätiologie akuter bzw. chronischer Non-A-E Hepatitiden, gespalten, u.a. auch durch den stark divergierenden Prozentsatz der für GBV-C-RNA positiven Patienten (3-39 %). Während die einen GBV-C als wichtigen neuen viralen Erreger in diesem Zusammenhang sahen (Fiordalisi *et al.*, 1996), betrachteten andere (Yashina *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Frider *et al.*, 1998) GBV-C zwar als möglichen, jedoch nicht als Hauptverursacher von bisher ätiologisch unklaren Fällen akuter und chronischer Non-A-E Hepatitis.

b. GBV-C in der Ätiologie fulminanter Non-A-E Hepatitiden

Wie schon bei der Assoziation von GBV-C mit akuter und chronischer Non-A-E Hepatitis erwähnt, bleibt auch die Frage bezüglich einer Assoziation von GBV-C in der Ätiologie fulminanter Hepatitiden weiterhin unklar. Nachdem Yoshida *et al.* (1995) als erster GBV-C eine wichtige Rolle in der Ätiologie fulminanter Non-A-E Hepatitiden zusprach (50% aller fulminanten Hepatitis-Fälle korrelieren mit GBV-C-Nachweis), zeigten hingegen weitere Studien eine eher unwahrscheinliche Assoziation von GBV-C mit fulminanten Hepatitiden (Kao *et al.*, 1996; Kanda *et al.*, 1996; Moaven *et al.*, 1996; Sallie *et al.*, 1996; Moaven *et al.*, 1997; Hadziyannis, 1997). Es scheint, daß das Vorhandensein einer GBV-C-Infektion eher ein erhöhtes Risiko einer parenteralen Virusexposition widerspiegelt, als die mögliche Ursache einer fulminanten Lebererkrankung zu sein. Dennoch sollte, bis zur völligen Klärung dieser Frage, GBV-C als potentieller Auslöser oder Cofaktor fulminanter Hepatitiden in Einzelfällen diskutiert werden.

c. GBV-C und Koinfektion mit Hepatitis B oder Hepatitis C

GBV-C-RNA wird bei Patienten mit vorliegender HBV-Infektion oder HCV-Infektion wesentlich häufiger als bei Patienten mit Non-A-E Hepatitis nachgewiesen (Zhang *et al.*, 1997). Auch andere Studien belegen eine häufig auftretende Koinfektion von HCV bzw. HBV und GBV-C (Yashina *et al.*, 1997; Colombatto *et al.*, 1997; Fabris *et al.*, 1998). Dies läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf den für diese Viren gemeinsamen parenteralen Infektionsmodus zurückführen. Desweiteren konnte durch Studien gezeigt werden, daß eine Koinfektion mit GBV-C keinen Einfluß auf den weiteren klinischen Verlauf der

Hepatitis B oder Hepatitis C, den ALT-Spiegel und die Schwere der Hepatitis, d.h. auf histologische Leberveränderungen, die Virämie und den Erfolg der Interferonbehandlung hat (Berg *et al.*, 1996; Pawlotsky *et al.*, 1996; Alter *et al.*, 1997a; Bralet *et al.*, 1997; Francesconi *et al.*, 1997; Thomas H.C. *et al.*, 1997; Yashina *et al.*, 1997; Manolakopoulos *et al.*, 1998; Masahide *et al.*, 1998). Die Vermutung, daß es sich bei GBV-C nicht um das gesuchte Agens ätiologisch unklarer viraler Hepatitiden handeln kann, wird durch diese Daten zusätzlich unterstützt.

#### d. GBV-C und Lebertransplantationen

Die klinische Bedeutung von GBV-C in Zusammenhang mit Lebertransplantation wurde relativ schnell in Frage gestellt. Die hohen Prävalenzen von bis zu 70 % in Patienten nach Lebertransplantation wurden als Folge vielfacher Blutübertragungen erklärt (Berg *et al.*, 1996; Berenguer *et al.*, 1996; Kallinowski *et al.*, 1996; Haagsmas *et al.*, 1997; Karayiannis *et al.*, 1998). Desweiteren konnte sogar in diesen immunsupprimierten Patienten kein klinisch signifikanter Einfluß von GBV-C bezüglich einer Erkrankung der Leber mindestens bis zwei Jahre nach der Transplantation festgestellt werden (Moaven *et al.*, 1997).

Auf der Suche nach weiterer Pathogenese einer GBV-C-Infektion wurde eine bestimmte Form der „Aplastische Anämie“ ins Gespräch gebracht, die sogenannte „Hepatitis assoziierte aplastische Anämie“. Diese Erkrankung tritt selten nach einer vorausgegangenen Hepatitis auf. Das dafür verantwortliche Agens konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden. Bei der Untersuchung von Patienten mit aplastischer Anämie konnte desöfteren eine GBV-C-Infektion festgestellt werden (Zaidi *et al.*, 1996; Byrnes *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Moriyama *et al.*, 1997). In den meisten Fällen war es möglich, die GBV-C-Infektion in Zusammenhang mit nach dem Beginn der aplastischen Anämie erhaltenen Blutübertragungen (GBV-C-infiziert) zu bringen (Brown *et al.*, 1997; Moriyama *et al.*, 1997). In anderen Fällen blieb jedoch die Frage, ob GBV-C für die vorliegende aplastische Anämie verantwortlich ist, unbeantwortet (Zaidi *et al.*, 1996; Byrnes *et al.*, 1996).

## **6. Ziel dieser Arbeit**

Die vorliegende Dissertation ist in folgende Hauptthemenbereiche gegliedert:

- A. Das GB-Virus-A und GB-Virus-B
- B. Der humane Vertreter der GB-Viren, das GB-Virus-C.

Zu den unter Punkt A. angegebenen, im Tamarinen vorhandenen Vertretern der GB-Viren sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

- Reinisolierung der bisher nur gemeinsam im sogenannten "GB-Agens" vorhandenen Viren GBV-A und GBV-B.
- Untersuchung der Kreuzimmunität des GB-Virus-A und GB-Virus-B nach der Reinisolierung.
- Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A zur Gewinnung von Hinweisen auf die Pathologie einer GBV-A-Infektion.
- Überprüfung der Leber als Replikationsort des GB-Virus-B. Die GBV-B-Infektion stellt die Ursache der GB-Hepatitis in Tamarinen dar.

Hinsichtlich des humanen Vertreters der GB-Viren, dem GB-Virus-C, bedurfte, im Hinblick auf die Ähnlichkeit mit HCV und die bekannte Pathologie von GBV-B, insbesondere die Frage nach assoziierten Krankheitsbilder und damit der klinischen Relevanz einer Aufklärung. Würde es sich bei GBV-C tatsächlich um einen neuen Erreger der viralen Hepatitis handeln, so müsste wegen der hohen Prävalenz der Infektion bei Blutspendern (1-4 %) die GBV-C-Testung sofort in das Blutspender-Screening eingeführt werden. Diese Krankheitsassoziation war jedoch bereits bei Beginn der Arbeit unwahrscheinlich. So konnten mittels RT-PCR weder eindeutige Ergebnisse zu einer Replikation des Agens in humaner Leber noch in experimentell infizierten Schimpansen gewonnen werden. Desweiteren wurde durch die hohe Sequenzhomologie von GBV-C mit GBV-A, das seinerseits auch keine Hepatitis verursacht, eine Assoziation einer GBV-C-Infektion mit einer Lebererkrankung zunehmend in Frage gestellt. Dennoch war ein möglicher Zusammenhang mit Hepatitiden in Betracht zu ziehen und das GB-Virus-C als potentiell humanpathogen einzustufen, da auch eine Reihe anderer, nicht primär hepatotroper Viren mit akuter oder sogar fulminanter Hepatitis assoziiert sein können, wie z.B. das Gelbfieber-Virus, Cytomegalie-Virus oder Epstein-Barr-Virus. Da sich ein Virus in der Regel in den Organen vermehrt, in denen es eine Erkrankung auslöst, war es Ziel dieser Arbeit, den oder die Replikationsorte von GBV-C zu ermitteln. Eine fehlende Vermehrung in Leberzellen schließt einen Hepatotropismus des Virus weitestgehend aus. Eine mögliche Vermehrung in anderen Organen ermöglicht die gezielte Suche nach einem eventuellen Zusammenhang der GBV-C-Infektion mit bisher ätiologisch nicht geklärten Erkrankungen dieser Organe.

Ein zweiter Schwerpunkt lag in der Etablierung diagnostischer Nachweismethoden für GBV-C (ELISA, Western Blot, Immunfluoreszenz). Hierzu sollten verschiedene Bereiche der

beiden Hüllproteine in einem geeignetem Vektorsystem exprimiert, anschließend aufgereinigt und monoklonale Antikörper gegen diese Proteine gewonnen werden.

Schließlich sollten Studien zur Prävalenz der GBV-C-Infektion innerhalb verschiedener Bevölkerungsgruppen Hinweise auf weitere Übertragungswege neben dem etablierten Weg der parenteralen Übertragung liefern. Dabei sollten auch die Risikogruppen einer GBV-C-Infektion in der deutschen Bevölkerung besser definiert werden.

Sämtliche Daten sollten letztendlich zum besseren Verständnis der Biologie, insbesondere der Pathogenese der GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C beitragen.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### A. MATERIAL

#### 1. Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
ABTS <sup>®</sup> Solution (Substrat)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Agarose Sea Kem <sup>®</sup> Le	Biozym (Hess. Oldendorf)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Bacto Agar	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Trypton	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Baculovirus-Agarose	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
BioRad Protein Assay-Farbstoffkonzentrat (Bradford-Stammlösung)	BioRad (München)
Blocking-Reagens	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bovine Serum Albumine (BSA)	Roche Diagnostics (Mannheim)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma (Deisenhofen)
Dextransulfat	Pharmacia (Freiburg)
3, 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma (Deisenhofen)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreitol (DDT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Glutardialdehyd	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Imidazol	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Kanamycin (Kan)	Sigma (Deisenhofen)
Lymphoflot	Biotest AG (Dreieich)
Mineralöl	Sigma (Deisenhofen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roche Diagnostics (Mannheim)
4-Nitro-Blue-Tetrazolium-Chlorid (NBT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Phenol	Biomol (Hamburg)
PonceauS-Konzentrat (10x)	Sigma (Deisenhofen)
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	BioRad (München)
Tricine	Biomol (Hamburg)
Twueen 20	Serva (Heidelberg)
Ultra-pure Protogel	National Diagnostics (Atlanta, USA)
[30% (w/v) Acrylamid/0.8% (w/v) Bisacrylamid- Stammlösung]	

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und haben, wenn nicht anders erwähnt, den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung von Pufferlösungen wurde quarzbidestilliertes Wasser (Ampuwa) der Firma Fresenius (Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Die speziell für die *in situ*-Hybridisierung benötigten Puffer wurden mit RNase-freiem, DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.



## 2. Organismen

### 2.1 Bakterienstämme

<u>Bakterienstamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<i>E.coli</i> INV $\alpha$ F'	F'endA1 recA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 $\lambda$ <sup>-</sup>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<i>E.coli</i> LMG194	F' $\Delta$ lacX74 galE thi rpsL (Str <sup>R</sup> ) $\Delta$ phoA (PvuII) $\Delta$ ara714 leu::Tn10	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<i>E.coli</i> TOP10	F' mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<i>E.coli</i> TOP10F'	F' {lacI <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

### 2.2 Zellen

<u>Zellen</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Sf9-Insektenzellen	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Alexanderzellen	AG Prof. Dr. G. Frösner (Max von Pettenkofer-Institut, München)
Mononukleäre Blutzellen (PBMCs)	Gewinnung aus GBV-C infizierten bzw. nicht infizierten Blutspendern (Max von Pettenkofer-Institut, München)

## 3. Plasmide und Oligodesoxynukleotide

### 3.1 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Bezugsquelle</u>
pBAD/His A,B, C (4.1 kb)	Prokaryotische Proteinexpression	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pBAD/His lacZ (7.1 kb)	Prokaryotische Proteinexpression: Kontrollplasmid	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCR®2.1 (3.9 kb)	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCR®II (3.9 kb)	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCR®II-TOPO (3.9 kb)	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pUC18	Positivkontrolle für Transformation	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

### 3.2 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden in einem Maßstab von 200 nM bezogen und über Chromatographiesäulen aufgereinigt und entsalzt.

**3.2.1 Allgemeine Primer/Oligodesoxynukleotide**

<u>Primer/Oligodesoxy-nukleotide</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Nukleotidsequenz (5' → 3')</u>	<u>Bezugsquelle</u>
pBAD Forward Primer	Sequenzierung	ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
T7 Promotor Primer	Sequenzierung	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
M13 Reverse Primer	Sequenzierung	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Hexanukleotid-Mix	Nicht-spezifische Umschreibung	Oligodesoxynukleotide	Roche Diagnostics (Mannheim)

**3.2.2 Spezielle Primer/Oligodesoxynukleotide**

<u>Primer/Oligo-desoxynukleotide</u>	<u>Nukleotidsequenz (5' → 3')</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Nukleotid-position</u>	<u>Größe des Amplifikats (bp)</u>
<b>Human <math>\beta</math>-Actin mRNA-Primer</b>				
Actin-A1 (sense)	TGA TAT CGC CGG GCT CGT C	Mikrogen (München)		
Actin-A2 (antisense)	TCC ATC ACG ATG CCA GTG G	Mikrogen (München)		450
<b>GBV-A Diagnostik-Primer aus 5' NTR (Genbank Accession U2203)</b>				
GBA-N1 (outer sense)	CGG TCC ATC TTC CTC AAG G	Pharmacia Biotech (Freiburg)	nt 81-100	
GBA-N2 (outer antisense)	CTG CCT TTC GGC CAG TCT C	Pharmacia Biotech (Freiburg)	nt 478-460	397
GBA-N3 (inner sense)	TCG GTC CGA AAG GCG TCT G	Pharmacia Biotech (Freiburg)	nt 129-147	
GBA-N4 (inner antisense)	CAA GAG GAA CTC GCA GGA C	Pharmacia Biotech (Freiburg)	nt 460-442	331
<b>GBV-A Primer aus E2-Region (Genbank Accession U2203)</b>				
GBA-1s (outer sense)	CAT GCT GGT CCT CGA GCA GCG	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1121-1141	
GBA-3a (outer antisense)	ACT CCG GTG GTA GAA TTC GGG C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 2362-2341	1241
GBA-2s (inner sense)	AGT GGG CGA GGC TCA GAG GGG	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1172-1192	
GBA-4a (inner antisense)	GTT GGA ACA GTG GGC GGA GTC C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 2332-2311	1160

<b>GBV-A Diagnostik-Primer der NS3-Region (Genbank Accession U2203)</b>				
GBV-AS1 (sense)	TCG CTA CGG CGA CCC CAC CGG	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 4438-4458	
GBV-AA1 (inner antisense)	CGA TAG TGA TGG TCG GGT CCA GG	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 4812-4790	374
GBV-AA2 (outer antisense)	TGC CCG CTT TCC CAC GGC C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 4887-4869	449
<b>GBV-B Primer des 5'-NTR (Genbank Accession U22304)</b>				
GBB-N1 (outer sense)	TCA TGA CGC TCG CGT GAT G	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 135-153	
GBB-N2 (outer antisense)	CAC ATA TAG GTG GGC TTG C	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 359-341	224
GBB-N3 (inner sense)	CAA GCT TGA CTT GGA TGG C	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 162-180	
GBB-N4 (inner antisense)	GCG TCC TTG GTA GTG ACC G	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 301-283	139
<b>GBV-B Primer aus 5'-NTR/E1/E2 (Genbank Accession U22304)</b>				
GBB-1s (sense)	GAT CTA CTA TGC CTC TCG GGG C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1417-1438	
GBB-2s (sense)	TGG AAA CCC TAT CAG GGT GCC C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1489-1510	
GBB-3s (sense) (= GBB-N4)	CGG TCA CTA CCA AGG ACG C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 301-283	
GBB-4s (sense) (= GBB-N2)	GCA AGC CCA CCT ATA TGT G	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 359-341	
GBB-1a (antisense)	GCC GGC CAT CCA CCC GAT AAA C	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1315-1294	
GBB-2a (antisense)	GGG CAC CCT GAT AGG GTT TCC A	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1510-1489	
GBB-3a (antisense)	CTA CTA CAG GTG GTA TTG TCA GCC	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 1687-1664	
GBB-4a (antisense)	GGC GTA GCC AAA TGC AAG AGG G	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 2631-2610	

<b>GBV-B Primer der NS3-Region (Genbank Accession U22304)</b>				
GBV-BS1 (sense)	TTG CCA CGG CTA CCC CCC CTG	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 4218-4238	
GBV-BA1 (inner antisense)	CAA TGG TGA AAG TAG GGT CAA GG	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 4595-4573	377
GBV-BA2 (outer antisense)	TGC CAG CTC TCC CAC GGC C	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 4670-4652	452
<b>GBV-C Diagnostik-Primer (Khydyakov <i>et al.</i>, 1997)</b>				
Primer YK874 (=501) (outer sense)	CTG ATG TTG CTA GCC TGT GTG AGA	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 7215-7238	
Primer YK877 (=502) (outer antisense)	ACC GAC ACC TTA GAT CCC CAG CCC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 7686-7663	471
Primer YK875 (=503) (inner sense)	AGA ACC ATA CAG CCT ATT GTG ACC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 7248-7217	
Primer YK876 (=504) (inner antisense)	CCT TAC AGT CCT TAT TGC TTC CTC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 7648-7625	401
<b>GBV-C Primer aus E1- bzw. E2-Region (Genbank Accession U36380)</b>				
HG-E1s (sense)	AGC AGC GTA TTG TCA TGG TCT TCC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1089-1112	
HG-E2s (sense)	TCG CAA GGC GCG CCC GCC TC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1136-1155	
HG-E3s (sense)	CAA TAG GAC AAC TCC CTT CAC CA	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1735-1757	
HG-E4s (sense)	GGG GGC CCC TGG GCA ACC AG	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1761-1780	
HG-E9s (sense)	CCA TCA TGG CAG TCC TTC TGC TC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 528-550	
HG-E10s (sense)	GCC CCG GCC ACC CAT GCT TG	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 581-600	
HG-E2a (antisense)	GAG GCA GGG GCG CCT TGC GA	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1155-1136	
HG-E4a (antisense)	CTG GTT GCC CAG GGG CCC CC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1780-1761	
HG-E5a (antisense)	AGT GCC GAG AAG CAT GCA GTT G	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1954-1933	
HG-E6a (antisense)	CGC ACC AGA GGT TCG TAA AAC C	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 2016-1995	
HG-E7a (antisense)	GCC AAC TGG TTC ACC CAC CAC C	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 2268-2247	
HG-E8a (antisense)	ACC TCT CCA GCC ACG GCG GC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 2313-2294	

HG-E10a (antisense) [= HG-E11a (antisense)]	GAG CAG GTC TGC CAA GTC AAC CC	Pharmacia Bio- tech (Freiburg)	nt 1206-1184	
<b>HBV-Primer der PräS-Region (Genbank Accession D00329)</b>				
HBV P S9 (outer sense)	GGG TCA CCA TAT TCT TGG	Mikrogen (München)		
HBV P S10 (outer antisense)	CCC TGA GCC TGA GGG CTC CAC C	Mikrogen (München)		261
HBV P S13 (inner sense)	GGG AAC AAG AGC TAC AGC	Mikrogen (München)		
HBV P S14 (inner antisense)	AAT ACC GCC GTG TGG AGG	Mikrogen (München)		219
<b>HBV-Primer der PräS-Region und des 5' NTR (Genbank Accession D00329)</b>				
HBV-SI3 (sense)	CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	Mikrogen (München)	nt 250-276	
HBV-#1 (antisense)	CCC AAT ACC ACA TCA TCC	Mikrogen (München)	nt 760-743	493
HBV-#5 (sense)	GGG TCA CCA TAT TCT TGG	Mikrogen (München)	nt 2816-2833	
HBV-#4 (antisense)	GTC CTA GGA ATC CTG ATG	Mikrogen (München)	nt 187-170	554
<b>HCV Diagnostik-Primer aus 5' NTR (Okamoto <i>et al.</i>, 1992; Simmonds <i>et al.</i>, 1993; Stuyver <i>et al.</i>, 1993)</b>				
HCV-10 (sense)	GGC GAC ACT CCA CCA TAG AT	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 18-36	
HCV-11 (antisense)	GGT GCA CGG TCT ACG AGA CC	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 341-322	323
HCV-15 (sense)	CAC TCC CCT GTG AGG AAC T	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 38-56	
HCV-16 (antisense)	GCA CCC TAT CAG GCA GT	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 304-288	266
HCV-186a (antisense) (Okamoto <i>et al.</i> , 1992)	ATG TAC CCC ATG AGG TCG GC	Gibco, Life Technologies (Eggenstein)	nt 751-732	HCV-10: 733 HCV-15: 713

## 4. Proteine, Enzyme und Antikörper

### 4.1 Proteine/Enzyme

<u>Protein/Enzym</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Alkalische Phosphatase (AP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ampli Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer (Überlingen)
Benzonase	Merck (Darmstadt)
DNase I, RNase frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Endoproteinase Asp-N	Roche Diagnostics (Mannheim)
Endoproteinase Glu-C	Roche Diagnostics (Mannheim)
Endoproteinase Lys-C	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase A	Sigma (Deisenhofen)
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
Superscript™ II RT	Gibco BRL, Life Technologies (Eggenstein)
Sp6-RNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

### 4.2 Antikörper

<u>Eingesetzter Antikörper</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<b>Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragments</b> (Anti-DIG-AP-Fab-Fragments)	<i>in situ</i> -Hybridisierung und Dot Blot	Roche Diagnostics (Mannheim)
<b>Anti-human-IgG-Peroxidase</b> (Anti-human-IgG-POD)	ELISA und Western Blot	Roche Diagnostics (Mannheim)
<b>Anti-human-IgG-Peroxidase</b> (Anti-human-IgG-POD)	ELISA und Western Blot	Mikrogen (München)
<b>Anti-human-IgG-Peroxidase</b> (Anti-human-IgG-POD)	ELISA und Western Blot	Dako
<b>Anti-mouse-IgG-Peroxidase</b> (Anti-mouse-IgG-POD)	Western Blot	Roche Diagnostics (Mannheim)
<b>Anti-rat-IgG-Peroxidase</b> (Anti-rat-IgG-POD)	Western Blot	Roche Diagnostics (Mannheim)
<b>Anti-rat-Ig-Peroxidase-Fab-Fragments</b> (Anti-rat-Ig-POD-Fab Fragments)	Western Blot	Roche Diagnostics (Mannheim)
<b>Anti-Xpress-Antibody</b>	Western Blot	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<b>Anti-E2-Antibody</b> (aus Ratte)	ELISA, Western Blot und Immunfluoreszenz	GSF (Elisabeth Kremmer)
<b>CD3 MicroBeads</b> (= paramagnetische Microbeads, konjugiert mit monoklonalem Maus Anti-Human CD3 Antikörper)	Magnetische Zelltrennung von PBMC's (MACS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
<b>CD19 MicroBeads</b> (= paramagnetische Microbeads, konjugiert mit monoklonalem Maus Anti-Human CD19 Antikörper)	Magnetische Zelltrennung von PBMC's (MACS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

## **5. Standards, Kits und Tests**

### **5.1 Standards**

<u>Standard</u>	<u>Restringiert mit</u>	<u>Größenbereich</u>	<u>Bezugsquelle</u>
DNA-Molekulargewicht-Marker III (0.25 µg/µl)	λ-DNA (EcoRI/HindIII)	0.12 - 21.2 kbp	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA-Molekulargewichtmarker V (0.25 µg/µl)	pBR322-DNA (HaeIII)	8 - 587 bp	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein-Standard, low range	-	14.4 - 97.4 kD	Roche Diagnostics (Mannheim)
Polypeptid SDS-PAGE Standard	-	1.4 - 26.6 kD	BioRad (Hercules, USA)

### **5.2 Kits und Tests**

<u>Kit/Test</u>	<u>Bezugsquelle</u>
ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Überlingen)
Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bac-N-Blue™ Transfection Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
DIG RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics (Mannheim)
DIG labeled Control RNA	Roche Diagnostics (Mannheim)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
pBAD/His A, B, C Vector Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp® HCV Kit	Qiagen (Hilden)
QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System	Qiagen (Hilden)
S.N.A.P. Mini Prep Kit	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
TA Cloning® Kit (mit Vektor pCR®2.1)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
TA Cloning® Kit (mit Vektor PCR®II)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
TOPO TA Cloning® Kit, Dual Promotor (mit Vektor pCR®II-TOPO)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Xpress Protein Purification System	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
µPlate Anti-HGenv (ELISA)	Roche Diagnostics (Mannheim)

## **6. Medien, Zusätze und Antibiotika**

### **6.1 Medien und Zusätze**

#### **6.1.1 Medien zur Anzucht von *E. coli***

<u>LB-Medium:</u>	1 % Bacto Tryptone
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0.5 % Bacto Yeast Extract
	1 % NaCl
	1.5 % Bacto Agar (nur für Kulturplatten)

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurden nach Bedarf Antibiotika zugegeben. Für Kulturplatten wurde der LB-Agar in Portionen in sterile Kunststoff-Kulturschalen gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die Kulturschalen bei 4°C gelagert.

<u>LB<sub>LowSalt</sub>-Medium:</u>	1 % Bacto Tryptone
(Handbuch, Invitrogen)	0.5 % Bacto Yeast Extract
	0.5 % NaCl

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurden nach Bedarf Antibiotika zugegeben.

<u>RM-Medium + Glucose:</u>	1x M9 Salts
(Handbuch, Invitrogen)	2 % Casamino Acids
	0.2 % Glucose
	1 mM MgCl <sub>2</sub>

20 g/l Casamino Acids wurden eingewogen, in 890 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 55°C wurden nach Bedarf Antibiotika und die restlichen Lösungen (steril) zugegeben. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt.

<u>10x M9 Salts:</u>	6 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0.5 % NaCl
	1 % NH <sub>4</sub> Cl

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt, autoklaviert und anschließend bei Rt aufbewahrt.

<u>SOB-Medium:</u>	2 % Bacto Tryptone
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0.5 % Yeast Extract
	0.05 % NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt und das Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurde 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung und nach Bedarf Antibiotika zugegeben. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt.

<u>SOC-Medium:</u>	2 % Tryptone
(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0.5 % Yeast Extract
	10 mM NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und das Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurde sterile 1M MgCl<sub>2</sub>-, 1M MgSO<sub>4</sub>- und 2 M sterilfiltrierte Glucose-Lösung zugegeben. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt.

### **6.1.2 Medium und Zusätze zur Zellkultur von PBMCs**

<u>RPMI 1640-Medium (mit L-Glutamin):</u>	Fertigmedium (Gibco, Life Technologies; Eggenstein)
---	--

<u>L-Glutamin:</u>	Fertiglösung, 200 mM Im Verhältnis 1:100 eingesetzt. (Gibco, Life Technologies; Eggenstein)
--------------------	---

<u>Phytohämagglutinin (PHA):</u>	5 µg/µl Zugabe von 5 µg/ml RPMI 1640-Medium (Sigma; Deisenhofen)
----------------------------------	--



<u>Lipopolysaccharid (LPS):</u>	1 µg/µl Zugabe von 5 µg/ml RPMI 1640-Medium (Sigma; Deisenhofen)
<u>Interleukin-2 (IL2):</u>	10 Units/µl Zugabe von 20 U/ml RPMI 1640-Medium (Sigma; Deisenhofen)
<u>Fötale Kälber Serum (FKS):</u>	Fertiglösung Nach Hitzeinaktivierung (30 min, 56°C) Zugabe von 10 % (v/v) FKS zum Medium (Gibco, Life Technologies; Eggenstein)
<u>Penicillin/Streptomycin:</u>	Fertiglösung, siehe Kap.II.6.2

## **6.2 Antibiotika**

Selbst hergestellte Antibiotika-Stammlösungen wurden nach ihrer Herstellung sterilfiltriert (0.2µm-Filter).

### Ampicillin-Stammlösung:

50 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (Aufbewahrung bei -20°C)

Die Stammlösung wurde dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugegeben.

### Kanamycin-Stammlösung:

25 mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (Aufbewahrung bei -20°C)

Die Stammlösung wurde dem Medium im Verhältnis 1: 1000 zugegeben.

### Penicillin/Streptomycin (Fertiglösung):

10.000 Units Penicillin + 10.000 µg Streptomycin in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein)

## **7. Puffer und Stammlösungen**

Alle Puffer und Stammlösungen wurden nach ihrer Herstellung im Autoklaven sterilisiert bzw. sterilfiltriert.

### **7.1 Puffer für gentechnische Methoden**

#### **Probenpuffer für DNA-Agarosegele:**

(Sambrook *et al.*, 1989)

40 % (w/v) Saccharose  
0.25 % (w/v) Bromphenolblau  
0.25 % (w/v) Xylencyanol FF  
in TE-Puffer

#### **Puffer für alkalische Lyse:**

(Sambrook *et al.*, 1989)

Lösung I (Aufbewahrung bei 4°C):

25 mM Tris/HCl, pH 8.0  
50 mM Glucose  
10 mM EDTA, pH 8.0

Lösung II (jeweils frisch herstellen):

0.2 N NaOH  
1 % SDS

Lösung III (Aufbewahrung bei 4°C):

60 ml 5 M KaAc  
11.5 ml Eisessig  
H<sub>2</sub>O ad 100ml

**TBE-Puffer (5x):**  
(Sambrook *et al.*, 1989)  
500 mM Tris  
500 mM Borat  
10 mM EDTA

**TE-Puffer:**  
(Sambrook *et al.*, 1989)  
10 mM Tris/HCl, pH 8.0  
1 mM EDTA

## **7.2 Puffer für proteinchemische Methoden**

**Probenpuffer für SDS-PAGE (4x):**  
0.5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8  
2.0 ml Glycerol  
2.0 ml 20 %iges SDS  
1.0 ml 14 M 2-Mercaptoethanol  
+ eine Spatelspitze Bromphenolblau

**Tris-Tricin-Probenpuffer:**  
(BioRad, Standard-Anleitung)  
4.0 ml deionisiertes H<sub>2</sub>O  
2.0 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8  
2.4 ml Glycerol  
1.0 ml 10 %iges SDS  
0.2 ml 2-Mercaptoethanol  
0.4 ml 0.5 %iges Coomassie G 250

**SDS-PAGE-Laufpuffer, pH 8.5:**  
(Sambrook *et al.*, 1989)  
25 mM Tris  
192 mM Glycin  
10 % (v/v) SDS

**Tris-Tricin-Gel-Kathodenpuffer:**  
0.1 M Tris  
0.1 M Tricin  
0.1 % SDS (w/v)  
pH ~ 8.2

**Tris-Tricin-Gel-Anodenpuffer:**  
0.2 M Tris/HCl, pH 8.9

**Tris-Tricin-Gelpuffer:**  
3.0 M Tris/HCl, pH 8.45  
0.3 % SDS (w/v)

**Blotpuffer, pH 8.3:**  
(Sambrook *et al.*, 1989)  
25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

### **Puffer/Antikörper-Lösungen für Western Blot:**

**TBS-Puffer:**  
20 mM Tris/HCl, pH 7.5  
500 mM NaCl

**TBST-Puffer:**  
20 mM Tris/HCl, pH 7.5  
500 mM NaCl  
0.05 % (v/v) Tween 29

**Blocking-Puffer:**  
TBS-Puffer  
+ 3 % (w/v) BSA

**Verdünnungspuffer:**  
TBST-Puffer  
+ 1 % (w/v) BSA

**Substratpuffer (2x):**  
0.1 M Citratpuffer  
0.02 % Thimerosal

<u>Detektionslösung:</u>	25 ml Substratpuffer 25 ml H <sub>2</sub> O 10 mg Diaminobenzidin 6 µl 30 %iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<u>Anti-Xpress-Antikörper-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:5000 in Verdünnungspuffer
<u>Anti-E2-Antikörper-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:20 in Verdünnungspuffer
<u>Humanserum-Lösung:</u>	Serum-Verdünnung 1:60 in Verdünnungspuffer
<u>Anti-human-IgG-POD-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:1000 in Verdünnungspuffer
<u>Anti-mouse-IgG-POD-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:500 in Verdünnungspuffer
<u>Anti-rat-IgG-POD-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:500 in Verdünnungspuffer
<u>Anti-rat-Ig-POD-Fab-Frag.-Lösung:</u>	Antikörper-Verdünnung 1:500 in Verdünnungspuffer

**Puffer/Lösungen für ELISA „µPLATE Anti-HGenv“:**

Herstellung nach Testanleitung für ELISA „µPLATE Anti-HGenv“.

**Puffer/Lösungen für etablierten ELISA:**

<u>Blocking-Lösung:</u>	PBS, pH 7.4 + 3 % (w/v) BSA
<u>Waschpuffer:</u>	0.2 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7.4 bzw. 0.2 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7.4 0.05 % (v/v) Tween 20
<u>Verdünnungspuffer (Antigen und Antikörper):</u>	PBS, pH 7.4
<u>Verdünnungspuffer (Serum):</u>	PBS, pH 7.4 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Tween 20 5 % (v/v) 1 M Tris, pH 7.4
<u>Verdünnungspuffer (Konjugat):</u>	PBS, pH 7.4 5 % (v/v) FKS 5 % (v/v) 1 M Tris, pH 7.4 1 % (v/v) Tween 20
<u>Entwicklungslösung:</u>	ABTS-Fertiglösung
<u>Abstop-Lösung:</u>	1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**Puffer zur Proteinaufreinigung mit dem „Xpress™ Protein Purification System“:**

Herstellung nach Invitrogen (1998d).

<b><u>Dialysepuffer:</u></b>	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 0.1 % Triton X-100
------------------------------	--

**Puffer zur proteolytischen Spaltung:**

<u>Puffer für Endoproteinase AspN:</u>	50 mM Natriumphosphat, pH 8.0 1 M Harnstoff 20 mM Methylamin
<u>Puffer für Endoproteinase LysC:</u>	25 mM Tris/HCl, pH 8.5 1 mM EDTA 1 M Harnstoff 20 mM Methylamin
<u>Puffer für Endoproteinase GluC:</u>	25 mM Ammoniumcarbonat, pH 7.8 1 M Harnstoff 20 mM Methylamin

**7.3 Puffer und Lösungen für die Isolierung und Auftrennung (MACS) von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs)**

<u>Lymphoflot:</u>	Fertiglösung für Dichtegradient zur Isolierung von Lymphozyten (Biotest AG, Dreieich)
<u>PBS:</u>	8.0 g NaCl 0.2 g KCl 1.44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → in 800 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> lösen → pH 7.4 mit HCl einstellen → ad 1L mit H <sub>2</sub> O; anschließend aliquotieren und autoklavieren → bei Rt aufbewahren
<u>PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % BSA:</u>	zur Markierung und Auftrennung von Lymphozyten

**7.4 Puffer und Stammlösungen für die *in situ*-Hybridisierung**

Alle Puffer und Stammlösungen für die *in situ*-Hybridisierung (Persönliche Mitteilung, H. Breitschopf, 1997; Breitschopf *et al.*, 1992) wurden mit DEPC-behandeltem, autoklaviertem Wasser, H<sub>2</sub>O-DEPC (Sambrook *et al.*, 1989), hergestellt. H<sub>2</sub>O-DEPC zerstört RNAsen. Eine abermalige RNase-Behandlung und nochmaliges Autoklavieren war aus diesem Grunde nicht mehr nötig.

<u>H<sub>2</sub>O-DEPC:</u> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	1 ml DEPC/1 L H <sub>2</sub> O. Gut geschüttelt, ÜN bei Rt stehen gelassen und anschließend autoklaviert.
<u>Antikörper-Lösung (Dot-Blot):</u>	Anti-DIG-AP-Fab-Fragments 1:5000 in 1xMaleatpuffer
<u>Antikörper-Lösung:</u>	Anti-DIG-AP-Fab-Fragments 1:500 in Blocking Mix
<u>Blocking Mix:</u>	0.5 % Blocking Reagenz, 10 % FKS
<u>Blocking Reagenz:</u>	10 %, 1 % und 0.5 % (w/v) Blocking Reagenz wurden in 1x Maleatpuffer unter Erwärmen gelöst, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

<b><u>Dextransulfat:</u></b>	50 %ige Stammlösung; wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.
<b><u>Essigsäureanhydrid:</u></b>	0.5 % (v/v) Essigsäureanhydrid in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 (frisch hergestellt!)
<b><u>Formamid, deionisiert:</u></b>	5g Ionenaustauscher V/100 ml Formamid. Anschliessend für 30 min. auf dem Magnetrührer gerührt. Entweder sofort verwendet oder aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.
<b><u>Hybridisierungspuffer:</u></b>	2x SSC 10 % Dextransulfat 0.01 % Salmon sperm DNA 0.02 % SDS 50 % Formamid
<b><u>5x Maleatpuffer:</u></b>	500 mM Maleinsäure 750 mM NaCl pH 7.5 mit NaOH-Plätzchen einstellen
<b><u>NBT/BCIP-Färbelösung:</u></b>	100 ml NBT/BCIP-Puffer 450 µl NBT 350 µl BCIP Lösung wurde immer frisch angesetzt, da licht- und temperaturempfindlich.
<b><u>NBT/BCIP-Puffer:</u></b>	100 mM Tris/HCl, pH 9.5 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
<b><u>4% gepuffertes Paraformaldehyd:</u></b>	40 g Paraformaldehyd 500 ml 0.2 M Sörensenpuffer ad 1 L mit H <sub>2</sub> O Aufbewahrung bei 4 °C bzw. aliquotiert bei -20°C.
<b><u>Proteinase K-Stammlösung:</u></b>	1.0 % (w/v) Proteinase K in TBS. Aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.
<b><u>Salmon Sperm DNA:</u></b> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	0.5 % (w/v) Salmon Sperm DNA in H <sub>2</sub> O-DEPC. Ca. 4 h gerührt. Anschliessend wurde die Lösung viermal durch eine Subkutan-Nadel gepresst, in Safe-Lock-Reaktionsgefäßen für 10 min in kochendem Wasser denaturiert und in einem Salz/Eis oder Alkohol/Eis-Gemisch rasch abgekühlt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Die DNA wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.
<b><u>20x SSC:</u></b> (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	3.0 M NaCl 0.3 M Na-Citrat pH 7.0
<b><u>0.2 M Sörensenpuffer:</u></b>	0.04 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 0.16 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O pH 7.4
<b><u>Tris-Stammlösung:</u></b>	1 M Tris/HCl, pH 7.5
<b><u>TBS-Puffer:</u></b>	50 ml 1 M Tris/HCl, pH 7.5 950 ml H <sub>2</sub> O-DEPC 8.766 g NaCl

**Waschpuffer:**

1x Maleatpuffer + 0.3% Tween 20

**7.5 Allgemeine Stammlösungen****7.5.1 Silberfärbung**(Sambrook *et al.*, 1989)

<u>Fix 1:</u>	30 % EtOH 10 % HAc 60 % H <sub>2</sub> O
<u>Fix 2:</u> (frisch herstellen)	70 % 0.4 M NaAc/HAc, pH 6.0 30 % EtOH 0.1 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5 H <sub>2</sub> O 2 ml 25 %iges Glutardialdehyd
<u>Färbelösung:</u> (frisch herstellen)	500 µl 1.2M AgNO <sub>3</sub> 25 µl 37 %iges Formaldehyd H <sub>2</sub> O ad 100ml
<u>Entwickler:</u> (frisch herstellen)	5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 80 µl 37 %iges Formaldehyd H <sub>2</sub> O ad 200ml
<u>Stopplösung:</u>	5 % Essigsäure (in H <sub>2</sub> O)

**7.5.2 Coomassie-Färbung**(Sambrook *et al.*, 1989)

<u>Färbelösung:</u>	0.25 g Coomassie Brillant Blue R250, gelöst in 100ml MeOH:H <sub>2</sub> O:HAc (4.5 : 4.5 : 1)
<u>Entfärber:</u>	450 ml MeOH 450 ml H <sub>2</sub> O 100 ml HAc
<u>Aufbewahrungslösung:</u>	5 % HAc

**7.5.3 SDS-PAGE-Stammlösungen**(Sambrook *et al.*, 1989)

<u>Lösung A:</u>	1 M Tris/HCl, pH 8.5
<u>Lösung C:</u>	30 % (w/v) Acrylamid, 0.8 % (w/v) Bisacrylamid- Stammlösung (fertig gekauft)
<u>Lösung D:</u>	19.2 ml 1M Tris/HCl, pH 6.8 0.8 ml 20 %iges SDS
<u>SDS-Stammlösung:</u>	20 %ig
<u>APS-Stammlösung:</u>	1.4 % (w/v) in H <sub>2</sub> O
<u>TEMED:</u>	Fertiglösung; s. Kap.I, A.1

SDS-PAGE-Trenngel/-Sammelgel:

	<u>SDS-PAGE-Trenngel (12.5 %)</u>	<u>SDS-PAGE-Sammelgel</u>
Lösung A	15 ml	-
Lösung C	17.4 ml	2.55 ml
Lösung D	-	3.0 ml
H <sub>2</sub> O	6.4 ml	17.25 ml
20 % SDS	0.2 ml	-
1.4 % APS	1.0 ml	1.2 ml
TEMED	12.5 µl	12 µl

**7.5.4 Tris-Tricin-PAGE-Stammlösungen**

<u>Acrylamid/Bisacrylamid:</u>	Fertiglösung: 40 %ig, Mischungsverhältnis: 37.5:1 (Sigma, Deisenhofen)
<u>Glycerin:</u>	Fertiglösung (Merck, Darmstadt)
<u>Ammoniumpersulfat (APS):</u>	10 %ige Stammlösung
<u>TEMED:</u>	Fertiglösung (BioRad, München)
<u>Tris-Tricin-Gelpuffer:</u>	s. Kap.II.7.2
<u>Tris-Tricin-Gele:</u>	

	<u>Trenngel</u>	<u>„Spacer“-Gel</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid/bis-Acrylamid	8.89 ml	5.42 ml	0.89 ml
Tris-Tricin-Gelpuffer	8.89 ml	8.89 ml	2.76 ml
Glycerin	2.84 ml	-	-
H <sub>2</sub> O	6.04 ml	12.36 ml	7.47 ml
APS	88.89 µl	88.89 µl	88.89 µl
TEMED	8.89 µl	8.89 µl	8.89 µl

**7.5.5 Weitere Stammlösungen**

<u>BSA-Stammlösung:</u>	5 % (w/v) bzw. 1 % (w/v)
<u>RNAseA-Stammlösung:</u>	1 % (w/v) in 10mM Tris/HCl, pH 7.5; 15 mM NaCl Aufbewahrung bei -20 °C.
<u>Phenol/Chloroform:</u>	Mit Wasser gesättigtes Phenol wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.
<u>Chloroform/Isoamylalkohol:</u>	1 Volumen Chloroform wurde mit 1/24 Volumen Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

## 8. Probenmaterial

### 8.1 Seren

<u>Verwendete Seren</u>	<u>Zeitraum</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Seren von Blutspendern	1995/96	BRK, München
Seren von Homosexuellen	1998/99	Dr. Martin Wächtler; Krankenhaus München-Schwabing, München
Seren von Prostituierten	1998	Dr. Gieslind Hellein; Landesuntersuchungsamt München und Augsburg
Seren von Hämophilie-Patienten	01-08 1998	Prof. Dr. Wolfgang Schramm; Abt. für Transfusions- medizin, Klinikum Innenstadt, München
Seren knochenmarktransplantiertes Patienten (KMT-Patienten)	1998/99	Dr. Franz Maximilian Zwiebel/Dr. Gero Massenkeil; Klinikum Charité, Berlin
Seren von i.v.- Drogenkonsumenten (IVDU)	01-03 1999	Prof. Dr. Randolph Penning; Gerichtsmedizin der LMU München, München
GBV-C-Seren	1996-1999	Hepatitis-Diagnostik des Max von Pettenkofer- Instituts der LMU München, München
GBV-A-Affenseren	1996-1999	Krallenaffenzucht der Spezies <i>Sanguinus fuscicollis</i> ; Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München, München
GBV-B-Affenseren	1996-1999	Krallenaffenzucht der Spezies <i>Sanguinus fuscicollis</i> ; Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München, München
HBV-Seren	1996-1999	Hepatitis-Diagnostik des Max von Pettenkofer- Instituts der LMU München; München
HCV-Seren	1996-1999	Hepatitis-Diagnostik des Max von Pettenkofer- Institutes der LMU München; München
GBV-C/HGV-Inokulum (aus Patient A bzw. Patient B) für <i>in vitro</i> -Infektion von PBMCs	1999	P.D. Dr. Reinhard Zchoval; Medizinische Klinik II der LMU München, Klinikum Großhadern
GB-Inokulum (Poolserum der 11. Passage des von F. Deinhardt in Krallenaffen inoku- lierten GB-Agens, das sowohl GBV-A als auch GBV-B enthält; Simons <i>et al.</i> , 1995)	-	Prof. Dr. G. Frösner; Max von Pettenkofer-Institut der LMU München, München

### 8.2 Gewebe

<u>Gewebe</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Gewebe GBV-A infizierter Affen <sup>1</sup> (Gehirn; Lymphknoten; Milz; Leber; Herz; Nebenniere; Niere; Dünndarm, Dickdarm; Skelettmuskel)	Krallenaffenzucht der Spezies <i>Sanguinus fuscicollis</i> ; Max von Pettenkofer-Institut der LMU München, München
Gewebe GBV-B infizierter Affen <sup>2</sup> (Gehirn; Lymphknoten; Milz; Leber; Herz; Nebenniere; Niere; Dünndarm; Dickdarm; Skelettmuskel)	Krallenaffenzucht der Spezies <i>Sanguinus fuscicollis</i> ; Max von Pettenkofer-Institut der LMU München, München
Gewebe nicht GBV-A bzw. GBV-B infizierter Affen <sup>1,2</sup> (Gehirn; Lymphknoten; Milz; Leber; Herz; Nebenniere; Niere; Dünndarm; Dickdarm; Skelettmuskel)	Krallenaffenzucht der Spezies <i>Sanguinus fuscicollis</i> ; Max von Pettenkofer-Institut der LMU München, München
Leberbiopsien GBV-C infizierter Patienten <sup>3</sup>	P.D. Dr. Reinhard Zchoval; Medizinische Klinik II der LMU München, Klinikum Großhadern



Nieren-, Milz-, Muskel-, Lymphknoten-, Skelettmuskel-, Herz-, Lungen-, Mandel-, Schilddrüsen- und Speicheldrüsen gewebe-proben GBV-C infizierter und nicht infizierter Patienten <sup>4</sup>	Dr. Tim Tucker; Abt. Medizinische Mikrobiologie, Universität Kapstadt, Südafrika
Milz-, Leber- und Lymphknotengewebe von mit GBV-C infizierten und nicht infizierten verstorbenen i.v.-Drogenkonsumenten <sup>3</sup>	Prof. Dr. Randolph Penning; Gerichtsmedizin der LMU München, München
Darm- und Gehirngewebe GBV-C/HIV koinfizierter Patienten <sup>4</sup>	Prof. Dr. Georg Hess; Boehringer Mannheim, Mannheim
Leberbiopsien HBV infizierter Patienten <sup>5</sup>	P.D. Dr. Reinhard Zchoval; Medizinischen Klinik II der LMU München, Klinikum Großhadern
Leberbiopsien HCV infizierter Patienten <sup>6</sup>	P.D. Dr. Reinhard Zchoval; Medizinischen Klinik II der LMU München, Klinikum Großhadern

<sup>1</sup> Der Nachweis einer GBV-A-Infektion erfolgte nach Extraktion (Kap.II, B.3.1) und Umschreibung (Kap.II, B.3.5) durch eine anschließende PCR-Untersuchung (Kap.II, B.7.2) mittels der NS3-Primer GBV-AS1, GBV-AA1 und GBV-AA2 (Kap.II, A.3.2.2) bzw. der 5`NTR-Primer GBA-N1, GBA-N2, GBA-N3 und GBA-N4 (Kap.II, A.3.2.2).

<sup>2</sup> Der Nachweis einer GBV-B-Infektion erfolgte nach Extraktion (Kap.II, B.3.1) und Umschreibung (Kap.II, B.3.5) durch eine anschließende PCR-Untersuchung (Kap.II, B.7.2) mittels der NS3-Primer GBV-BS1, GBV-BA1 und GBV-BA2 (Kap.II, A.3.2.2) bzw. der 5`NTR-Primer GBB-N1, GBB-N2, GBB-N3 und GBB-N4 (Kap.II, A.3.2.2).

<sup>3</sup> Der Nachweis einer GBV-C-Infektion erfolgte nach Extraktion (Kap.II, B.3.1) und Umschreibung (Kap.II, B.3.5) durch eine anschließende PCR-Untersuchung (Kap.II, B.7.2) mittels der Diagnostik-Primer YK874, YK877, Yk875 und YK876 (Kap.II, A.3.2.2).

<sup>4</sup> Der Nachweis einer GBV-C- bzw. HIV-Infektion wurde von den entsprechenden Laboratorien durchgeführt. Uns stehen keine näheren Angaben zu Verfügung.

<sup>5</sup> Der Nachweis einer HBV-Infektion erfolgte nach der Extraktion (Kap.II, B.3.1) durch PCR-Untersuchung (Kap.II, B.7.2) unter Verwendung der Diagnostik-Primer aus der PräS-Region HBV-PS9, HBV-PS10, HBV-PS13 und HBV-PS14 (Kap.II, A.3.2.2).

<sup>6</sup> Der Nachweis einer HCV-Infektion erfolgte nach Extraktion (Kap.II, B.3.1) und Umschreibung (Kap.II, B.3.5) durch PCR-Untersuchung (Kap.II, B.7.2) unter Verwendung der Diagnostik-5`NTR-Primer HCV-10, HCV-11, HCV-15, HCV-16 und HCV-186a (Kap.II, A.3.2.2).

## **9. Material für die Gewebepreparation**

<b><u>Material</u></b>	<b><u>Bezugsquelle</u></b>
Deckgläser (22x40, 22x32, 20x20)	F. Schultheiss (München)
Färbekästen nach Schiefferdecker	Fisher Scientific (Ingolstadt)
Mikrotom-Einmalklingen Typ S-35	Firma Seidel (Buchendorf)
Objektträger Polysine	ZEFA Laborservice (München)
Pap Pen (für Immunfärbung)	F. Schultheiss (München)
Standard-Einbettkassetten	ZEFA Laborservice (München)
Stahldeckel für Standard-Einbettkassetten	ZEFA Laborservice (München)

## 10. Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Diafilm Kodak Elite Chrome 100	Kodak
Dialyseschläuche: Visking Dialysis Tubing	Serva (Heidelberg)
EDTA Monovetten	Schultheiss (München)
Filterkarten (für Cytospin)	Shandon (Pittsburgh, USA)
Greiner-Röhrchen aus Polypropylen (15ml / 50ml)	Greiner & Söhne (Solingen)
Küvetten Ø 1cm	
Einmalküvetten (1.5ml)	Brand
Quarzglas-Präzisionsküvetten Suprasil (60µl)	Hellma
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MicroAmp Reaction Tubes with Cap (0.2ml)	Perkin Elmer (Überlingen)
Microspin-S-400 HR-Säule (Sephacryl)	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Mikrotiterplatte „Greiner F ELISA“	Greiner & Söhne (Solingen)
Nitrocellulose Transfermembran	Schultheiss (München)
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics (Mannheim)
Petrischalen aus Polystyrol (Ø 94mm)	Greiner & Söhne (Solingen)
Pipetten (10µl / 20µl / 100µl / 250µl / 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (10µl / 200µl / 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Safe Lock Reaktionsgefäße (0.5ml / 1.5ml / 2ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spitzen, gestopft (10µl / 100µl / 1000µl)	Biozym (Hess. Oldendorf)
Sterilfilter 0.2µm und 0.45µm	Schleicher + Schuell (München)
Whatman 3MM-Chromatographiepapier	Schultheiss (München)
24-Well-Zellkulturplatten (Falcon)	Becton Dickinson & Company (New Jersey)
6-Well-Zellkulturplatten (Falcon)	Becton Dickinson & Company (New Jersey)

## 11. Geräte

<u>Zentrifugen</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge EBA12	Hettich (Tuttlingen)
Tischzentrifuge “Mikroliter”	Hettich (Tuttlingen)
Tisch-Kühlzentrifuge Mikro 24-48R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Centrifon H-401 mit A8.24- und A6.9-Rotor	Kontron Hermle
Zentrifuge Rotina 48RC mit Rotor 4394	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Rotanta/T mit Rotor 5096	Hettich (Tuttlingen)
<u>Waagen</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Analysenwaage E154	Gibertini
Halbmikrowaage Precisa 600C	Precisa
<u>Gelelektrophorese-Apparatur</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Agarosegel-Elektrophorese-Kammern (12cm x 13cm)	Eigenbau der mechanischen Werkstatt des Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München
SDS-PAGE-Apparatur (20cm x 20cm)	Eigenbau der mechanischen Werkstatt des Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München
Blot-Elektrophorese-Apparatur	Eigenbau der mechanischen Werkstatt des Max von Pettenkofer-Institutes der LMU München
Elektrophorese-Powersupply PHERO-stab. 300	Fischer-Biotec (Ingolstadt)
<u>Mikroskope</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Durchlicht-Mikroskop Diavert	Leitz
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)

**Kühleinheit**

Kühlschränke  
 Gefrierschrank (-20°C)  
 Gefriertruhe (-70°C)  
 Flüssiger N<sub>2</sub>-Tank

**Bezugsquelle**

Liebherr  
 Liebherr  
 Vötsch  
 CBS 5000 Series

**Sonstige Geräte**

ABI Prism™ 377 DNA Sequencer  
 Blockthermostat BT100  
 Brutschrank  
 Cycler GeneAmp PCR System 2400  
 Dynatech MR7000 Microplate Reader  
 Eagle-Eye  
 Elektroporation-Apparatur  
 Hybridisierungssofen Personal Hyb  
 Hypercenter XP  
 Inkubationsblock Thermostat 5320  
 Inkubationsschrank (Steri)  
 Inkubationsschüttler INNOVA 4000  
 Kleinbildkamera  
 Mikrowelle  
 Neubauer-Zählkammer  
 pH-Meter: Mettler Delta 320  
 RNA/DNA Calculator GeneQuant II  
 Rühr/Heizplatten RCT basic  
 Schüttler 3016  
 Speedvac® Plus SC110A  
 Tisch-Autoklav  
 UV crosslinker UVC 500  
 UV visible Spektrophotometer  
 Vortex MS1 Minishaker  
 Waschgerät Labsystems Multiwash  
 Wasserbad

**Bezugsquelle**

Perkin Elmer (Überlingen)  
 Kleinfeld Labortechnik  
 Labotect (Göttingen)  
 Perkin Elmer (Überlingen)  
 Dynatech Laboratories (Denkendorf)  
 Herolab  
 BioRad (München)  
 Stratagen (Heidelberg)  
 Shandon  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Binder  
 New Brunswick Scientific, Labotect (Göttingen)  
 Nikon  
 Samsung  
 Neubauer  
 Mettler  
 Pharmacia Biotech (Freiburg)  
 IKA-Labortechnik  
 GFL  
 Savant  
  
 Hofer  
 Pharmacia Biotech (Freiburg)  
 IKA-Labortechnik  
 Labsystems  
 Köttermann

**B. METHODEN****Mikrobiologische Methoden****1. Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen**

(Sambrook *et al.*, 1989)

***E. coli*-Kulturen**

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte unter Schütteln (225 U/min) oder auf Agarplatten bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Die Kulturen wurden entweder aus in flüssigem Stickstoff gelagerten Glycerinkulturen oder von LB-Agarplatten (Kap.II.6.1.1) angeimpft.

Für ÜN-Kultur wurden in der Regel 2-3 ml LB-Medium (Kap.II.6.1.1) in Reagenzgläsern angeimpft, wobei bei der Kultivierung eines plasmidtragenden Bakteriums das LB-Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum enthielt. Für Midi-Präparationen und die Herstellung kompetenter Zellen wurden Erlenmeyerkolben mit entsprechenden Volumina an LB-Medium verwendet.

### Glycerinkultur

Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurden 0.85 ml einer stationären ÜN-Kultur ( $OD_{600} = 1-2$ ) mit 0.15 ml sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde die Glycerinkultur in einem Ethanol/Trockeneis-Gemisch eingefroren und in flüssigem Stickstoff ( $-120\text{ °C}$ ) aufbewahrt.

### Einzelkolonien

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf Agarplatten (falls plasmidtragendes Bakterium, Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zu Agarmedium) und Inkubation ÜN bei  $37\text{ °C}$  im Brutschrank erhalten.

## **Molekulargenetische Methoden**

### **2. Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien**

#### **2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format aus *E.coli* (Ausbeute: 3-5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro ml ÜN-Kultur) wurde mittels eines modifizierten Verfahrens der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

Zur Pelletierung der Zellen wurden 2 ml einer ÜN-Kultur für das entsprechend zu isolierende Plasmid in ein Reaktionsgefäß (RG) überführt und bei  $12000 \times g$  für 30 s bei Rt zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100  $\mu\text{l}$  Lysozymhaltiger Lösung I resuspendiert (Vortex), wodurch die Zellwände der plasmidenthaltenden Bakterien geschwächt wurden. Zur Lyse der Zellen und der Überführung der chromosomalen DNA in einen denaturierten Zustand wurden 200  $\mu\text{l}$  frisch zubereitete Lösung II zugegeben (Mischen durch Kippen des RG und anschließend auf Eis aufbewahren). Durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Lösung III (vorsichtiges Mischen der Lösung) erfolgte dann eine Renaturierung der chromosomalen DNA und deren Aggregation zu einem schwerlöslichem Netzwerk. Gleichzeitig kam es zur Präzipitation der Protein-SDS-Komplexe und hochmolekularer RNA. Die Plasmid-DNA-Moleküle verblieben hierbei im nativen Zustand in Lösung. Durch Inkubation auf Eis (5 min) und anschließende Zentrifugation ( $12000 \times g$ , 5 min, Rt) wurde das Präzipitat abgetrennt. Eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung der Plasmid-DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kap.II, B. 3.2) und eine darauf folgende Alkohol-Präzipitation (Kap.II, B.3.3) erreicht. Anschließend wurde das Pellet bei sofortiger Weiterverwendung in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bzw. bei längerer Aufbewahrung bei  $-20\text{ °C}$  in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer, pH 8.0 aufgenommen.

#### **2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA in Midi-Präp-Format aus *E.coli* (Ausbeute: 75-100  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA pro 25ml LB-Kultur) wurde mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) durchgeführt. Die Präparation erfolgte aus einer 1:100 mit ÜN-Kultur angeimpften 50 ml ÜN-Kultur. Die Plasmid-Isolierung wurde gemäß dem "Midi Purification Protocol" des QIAGEN Plasmid Handbuchs (Februar 1995) durchgeführt.

### **3. Handhabung von Nucleinsäuren**

#### **3.1 Extraktion von Nucleinsäuren aus Serum bzw. Gewebe**

Die Isolierung von viralen Nucleinsäuren für die PCR oder RT-PCR wurde mit dem "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nucleinsäuren**

Zu einer wässrigen DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 Phenol/Chloroform bzw. Chloroform/ Isoamylalkohol zugegeben, um Proteine und anderweitige Verunreinigungen zu entfernen (Sambrook *et al.*, 1989). Nach kräftigem Mischen erfolgte die Phasentrennung durch zweiminütige Zentrifugation bei 10000 x g bei Rt. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein neues RG überführt und die DNA gefällt (s. Kap. II, B.3.3).

#### **3.3 Fällung von Nucleinsäuren**

Die Konzentrierung und Reinigung von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurden der Probe 1/10 Volumen an 3 M NaAc, pH 4.6 bzw. 1/10 Volumen 4 M LiCl-Lösung und 2.5 Volumina absoluter Ethanol zugesetzt und diese bei -70°C für 30 min bzw. bei -20°C für mindestens 2 h (besser ÜN) inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend bei Rt getrocknet. Die DNA wurde dann in einem gewünschtem Volumen H<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer, pH 8.0 aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

#### **3.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren**

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde bei einer Probenverdünnung von 1:60 (in H<sub>2</sub>O) in Quarzglas-Präzisionsküvetten photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des RNA/DNA Calculator GeneQuant II bestimmt. Als Nullabgleich diente die Absorption von H<sub>2</sub>O bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Waren keine Absolutwerte zur Konzentration notwendig, wurde die DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration aus dem Vergleich zu einer definierten Menge an Marker-DNA erhalten.

#### **3.5 Umschreibung (Reverse Transkription, RT) von RNA**

Nach der Extraktion der RNA von GBV-C und HCV wurde diese vor der Durchführung der PCR zuerst in DNA mit Hilfe der Superscript™ II RT bzw. MMLV reverse Transkriptase umgeschrieben (vgl. Tab.II.1), wobei hier zwischen der spezifischen Umschreibung mit einem definierten Primer (z.B. Antisense-Primer der 1.PCR) und der unspezifischen Umschreibung mit Hexanucleotiden (Random-Primer) unterschieden wurde.

**Tab.II.1** Umschreibungsansätze für HCV, GBV-C und GBV-A/GBV-B.

Art der reversen Transkription	<u>HCV</u>	<u>GBV-C</u>	<u>GBV-A/GBV-B</u>	
	spezifisch und unspezifisch	spezifisch und unspezifisch	spezifisch	unspezifisch
5x First Strand Puffer	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
DTT (0.1 M)	2 µl	2 µl	-	-
Nukleotide (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	3 µl
Primer (10 pmol) bzw. Hexanucleotide (1:5 verdünnt)	1.8 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Superscript™ II RT (200 U/µl) bzw. MMLV RT (200 U/µl)	0.2 µl Superscript II RT	0.2 µl Superscript II RT	0.2 µl MMLV RT	0.2 µl MMLV RT
Extrahierte RNA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Für die Durchführung einer Human-β-Actin-PCR wurde nach der Extraktion (Kap.II, B.3.1) aufgrund vorhandener β-Actin-mRNA-Primer zuerst unspezifisch mit Hexanucleotiden umgeschrieben (s. Tab.II.2).

**Tab.II.2** Ansatz für die unspezifische Umschreibung von humanem β-Actin.

	<u>β-Actin</u>
5x First Strand Puffer	4 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
Nukleotide (5 mM)	3 µl
Hexanucleotide (1:5 verdünnt)	2 µl
Superscript™ II RT (200 U/µl)	0.2 µl
Extrahierte RNA	10 µl

Nach Zugabe der extrahierten RNA wurde das RG kurz bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend bei 45°C für ≥ 1 h inkubiert. Die Umschreibungsansätze wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt.

## **4. In vitro-Modifikation von DNA**

### **4.1 Enzymatischer Verdau von DNA**

Für 1µg genomische bzw. Plasmid-DNA wurden 5-10 Units der gewünschten Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der entsprechende 10x Restriktionspuffer (vgl. Herstellervorschrift) sowie eine 5 %ige BSA-Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10, RNase A (10 mg/ml) im Verhältnis 0.35:10 (3.5µg/10µl), bezogen auf das Gesamtvolumen, zupipettiert. Das Differenzvolumen zum Endvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.

Restriktionsprodukte und -effizienz des Ansatzes wurden durch elektrophoretische Auftrennung in einem, in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße(n), 1.2-2 %igem Agarosegel analysiert. Eine z.T. erforderliche Abtrennung der Restriktionsenzyme bzw. anderer Enzyme aus einer DNA-Präparation wurde durch Phenol-Extraktion und EtOH-Fällung erreicht.

## **4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

(nach Herstellerangaben für die alkalische Phosphatase)

Zur Verhinderung einer Religation linearisierter Plasmid-DNA wurden die 5`-terminalen Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase abgespalten. 50 pmol linearisierte Plasmid-DNA wurden mit 1U alkalischer Phosphatase in einem Volumen von 20µl unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen an 0.2 M EDTA und eine 10 minütige Inkubation bei 65°C. Zur vollständigen Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (vgl. Kap.II, B.3.2) und anschließend gefällt (Kap.II, B.3.3).

## **4.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (4 U/µl) verwendet. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde hierbei im dreifach molaren Überschuß gegenüber der linearisierten Vektor-DNA (50 ng) eingesetzt. Zur Berechnung der jeweils einzusetzenden Menge an DNA-Fragment (in Abhängigkeit der Größe in bp) wurde folgende Gleichung (aus Protokoll „TA Cloning Kit“) verwendet:

$$X \text{ ng DNA-Fragment} = \frac{(Y \text{ bp DNA-Fragment}) (50 \text{ ng Vektor}) * 3}{(\text{Größe des Vektors in bp})}$$

50 ng Vektor-DNA und die berechnete Menge an DNA-Fragment wurden anschließend mit 4 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 14°C ÜN ligiert.

## **5. Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren**

Doppelstrang-DNA (dsDNA)- als auch Einzelstrang-DNA (ssDNA)-Fragmente wurden unter Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Dadurch wurde einerseits die Restriktionsanalyse und der Nachweis von DNA (analytisch), andererseits die Isolierung von DNA-Fragmenten (präparativ) ermöglicht.

### **5.1 Analytische Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße(n) über 1.2-2 %ige Agarosegele. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 55°C Ethidiumbromid-Lösung (Endkonzentration: 0.5 µg/ml) zugegeben. Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens mit Agarosegel-Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und bei 90 V für ca. 45 min in 1x TBE-Laufpuffer der horizontalen Gelelektrophorese unterzogen.

Zur Bestimmung der Größe und Konzentration der DNA-Fragmente wurden DNA-Molekulargewichtsmarker bekannter Konzentration mit aufgetragen. Die DNA-Banden im Agarosegel wurden unter UV-Licht (Wellenlänge: 302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

## **5.2 Präparative Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte entsprechend den Bedingungen der analytischen Agarosegel-Elektrophorese (vgl. Kap.II, B.5.1).

Die einzelnen DNA-Banden wurden im UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte DNA-Bande anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten und isoliert (s. Kap.II, B.6).

## **6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kit" entsprechend dem Herstellerprotokoll.

## **7. Polymerase-Kettenreaktion, PCR**

### **7.1 PCR-Ansätze**

Die PCR-Ansätze wurden unter sterilen Bedingungen in folgender Form (vgl. Tab.II.3 und Tab.II.4) angesetzt:

**Tab.II.3** PCR-Ansatz für GBV-A, GBV-B, GBV-C und HCV.

PCR-Ansatz	GBV-A / GBV-B / GBV-C		HCV	
	1.PCR	Nested PCR	1.PCR	Nested PCR
H <sub>2</sub> O	33.7 µl	34.7 µl	31.7 µl	33.7 µl
10x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Nukleotide (5 mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	3 µl	3 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl	3 µl	3 µl
Taq-Polymerase	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl
cDNA bzw. DNA	5 µl	5 µl	5 µl	3 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

**Tab.II. 4** PCR-Ansatz für HBV und Human-β-Actin.

PCR-Ansatz	HBV-PCR I (Diagnostik)		HBV-PCR II (RNA-Sonden-Herstellung)	Humanes β-Actin
	1.PCR	Nested PCR	single PCR	single PCR
H <sub>2</sub> O	26 µl	26 µl	21.5 µl	31.7 µl
10x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Nukleotide (5 mM)	4 µl	4 µl	8 µl (2.5 mM)	2 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	5 µl	5 µl	5 µl	3 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	5 µl	5 µl	5 µl	3 µl
Taq-Polymerase	0.3 µl	0.3 µl	0.5 µl	0.3 µl
DNA bzw. mRNA	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<u>Gesamtvolumen</u>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl



## 7.2. Semiquantitative PCR

Semiquantitative PCRs wurden überwiegend zur Bestimmung von GBV-C-Titern eingesetzt, wodurch es möglich war, eine Virämie zumindest semiquantitativ zu verfolgen.

Zur Durchführung einer semiquantitativen PCR wurden von der zuvor umgeschriebenen cDNA Verdünnungsreihen mit Verdünnung von z.B. 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 sowie 10fach-Verdünnungen von  $10^1$ - $10^8$  mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt. Die PCR wurde dann mindestens zweimal je Verdünnungsstufe unter den üblichen Bedingungen (s. Kap.II, B.7.1) durchgeführt.

## 7.3 PCR-Programme

Die Reaktionsansätze wurden im Cycler „GeneAmp PCR System 2400“ den folgenden PCR-Programmen (s. Tab.II.5) unterworfen:

**Tab.II.5** PCR-Programme für die GB-Viren, HBV, HCV und Human-β-Actin.

Temperatur	Zeit	Vorgang	Zyklenanzahl
<b>PCR-Programm I (GBV-A / GBV-B / GBV-C)</b>			
94°C	4 min	Denaturierung der DNA	1
94°C	30 sec	Denaturierung der DNA	
50°C	1 min	Annealing der Primer	35 bzw. 30x
72°C	2 min	Strangsynthese (Elongation), ausgehend vom 3`-OH-Ende, durch Taq-Polymerase	
72°C	8 min	Vervollständigung der bis dahin nicht fertig synthetisierten Stränge	
4°C	∞	Kühlen des PCR-Ansatzes	1
<b>PCR-Programm II (HCV und GBV-C-Diagnostik)</b>			
94°C	4 min	Denaturierung der DNA	1
94°C	30 sec	Denaturierung der DNA	
50°C	1 min	Annealing der Primer	30x
72°C	1 min	Strangsynthese (Elongation), ausgehend vom 3`-OH-Ende, durch Taq-Polymerase	
72°C	8 min	Vervollständigung der bis dahin nicht fertig synthetisierten Stränge	
4°C	∞	Kühlen des PCR-Ansatzes	1
<b>PCR-Programm III (HBV)</b>			
94°C	30 sec	Denaturierung der DNA	
55°C	30 sec	Annealing der Primer	35x
72°C	1 min	Strangsynthese (Elongation), ausgehend vom 3`-OH-Ende, durch Taq-Polymerase	
4°C	∞	Kühlen des PCR-Ansatzes	

PCR-Programm IV (Humanes $\beta$ -Actin)			
94°C	3 min	Denaturierung der DNA	1
94°C	30 sec	Denaturierung der DNA	} 30x
55°C	30 sec	Annealing der Primer	
72°C	2 min	Strangsynthese (Elongation), ausgehend vom 3'-OH-Ende, durch Taq-Polymerase	
72°C	8 min	Vervollständigung der bis dahin nicht fertig synthetisierten Stränge	1
4°C	$\infty$	Kühlen des PCR-Ansatzes	

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden jeweils 10  $\mu$ l pro Ansatz auf ein Agarosegel (Kap.II, B.5.1) aufgetragen. Zur Abtrennung von Primeroligomeren und zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurde eine präparative Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.2) durchgeführt und diese anschließend im Agarosegel überprüft.

## **8. Transformation von *E. coli***

### **8.1 Transformation in $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E.coli*-Zellen**

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Transformation von *E. coli* wurden die Zellen zuerst in eine transformationskompetente Form gebracht. Kompetente *E.coli*-Zellen wurden nach einer Variation der Methode von Cohen *et al.* (1972) hergestellt, die ca.  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  Transformanten pro  $\mu$ g eingesetzte Plasmid-DNA lieferte.

Nach einer dreißigminütigen Inkubation der kompetenten Zellen auf Eis in Gegenwart von Plasmid-DNA erfolgte ein Hitzeschock mit 42°C für 90 s. Anschließend wurden die transformierten Zellen (200  $\mu$ l) zur phänotypischen Expression für 45 min bei 37°C im Schüttler (225 U/min) in 800  $\mu$ l SOC- bzw. LB-Medium inkubiert. Auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum wurden dann je 1/10 und 9/10 des Transformationsansatzes ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

### **8.2 Transformation in „One Shot™ Cells“ (INV $\alpha$ F' oder TOP10F')**

Die Transformation in „One Shot™ Cells“ wurde anhand des Protokolls „TA Cloning Kit“ durchgeführt.

## **9. Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger. Die Durchführung erfolgte anhand des Protokoll „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq® DNA Polymerase, FS“ (Perkin Elmer, 1995).

In einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l wurden bei zu sequenzierenden DNA-Fragmenten  $\leq 400$  bp 4  $\mu$ l, bei DNA-Fragmenten  $> 400$  bp 8  $\mu$ l „Terminator Ready Reaction Mix“ und 5-10 pmol des jeweiligen Primers eingesetzt. Die entsprechende Menge an Template-DNA wurde zugesetzt und die Sequenzierungsreaktion im Cyclyer „GeneAmp PCR System 2400“ durchgeführt (Tab.II.6).

**Tab.II.6** Protokoll (modifiziert) zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten.

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Anzahl der Zyklen</u>
96°C	15 sec	} 25x
55°C	10 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

Die Reinigung des Sequenzierungsproduktes erfolgte gemäß dem Protokoll “Ethanol-Fällung 1”.

Anschließend wurden die Proben nach entsprechender Präparation und Beladen eines Sequenzierungsgels in einem „ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer“ aufgetrennt und analysiert.

## **Proteinchemische Methoden**

### **10. Proteinexpression in *E.coli* mit Hilfe des pBAD/His-Expressionsystems**

#### **10.1 Optimierung der Expressionsbedingungen (Pilotexpression)**

Zur Optimierung der Bedingungen (Induktionszeit und Induktionskonzentration an Arabinose) für die Proteinexpression wurde eine Pilotexpression für die jeweiligen Klone anhand des Protokolls “Pilot Expression” (Invitrogen, 1998b) durchgeführt. Die Fraktionen wurden gemäß dem Protokoll „Preparation of Samples for Soluble/Insoluble Protein“ bzw. “Preparation of Samples” vorbereitet und durch SDS-PAGE (15 µl Probenauftrag) (Kap.II, B.15) und anschließende Coomassie- oder Silberfärbung (Kap.II, B.16) bzw. Durchführung eines Western Blotes mit Anti-Xpress-Ak und Anti-mouse-IgG-POD als Konjugat (Kap.II, B.18) analysiert.

#### **10.2 Proteinexpression („Scale-Up“ Expression)**

Mit den aus der Pilotexpression (vgl. Kap.II, B.10.1) ermittelten Bedingungen zur optimalen Expression der jeweiligen Klone wurde dann eine Proteinexpression in großem Maßstab (aus 50 ml-Kultur bzw. 250 ml-Kultur) nach dem Protokoll “Scale-up of Expression for Purification” (Invitrogen, 1998b) durchgeführt.

#### **10.3 Herstellung des Zell-Lysates und Bindung an Säule**

Das *E.coli*-Zellysate wurde nach Protokoll 1.3.1 A „Preparation of Native *E.coli* Cell Lysate“ bzw. Protokoll 1.3.1 B „Preparation of Denatured *E.coli* Cell Lysate, pH 7.8” (Invitrogen, 1998d) hergestellt und auf die Säule aufgetragen. Später wurde zusätzlich eine abgewandelte Form des Protokolls 1.3.1 B angewandt, um das eventuell durch Einschlußkörperbildung aggregierte und unlösliche Fremdprotein wieder in Lösung zu bringen und somit der herkömmlichen Reinigungsmethode zugänglich zu machen.

Hierzu wurde das nach Proteinexpression (250 ml-Kultur) gewonnene Zellpellet in 10 ml PBS/ 0.2 % Tween 20 (s. Kap.II, A.7.2) aufgenommen und anschließend durch Sonifikation auf Eis mit einem 10-Sekunden-Impuls vollständig resuspendiert. Um die häufig an Einschlußkörperchen („Inclusion Bodies“, IB) anhaftenden Proteasen, die nach Lösung und Renaturierung das gewünschte Protein vollständig zerstören würden, effektiv zu entfernen, wurden die IBs bereits vor Lösung durch intensives Waschen gereinigt. Da jedoch die in

Bakterienlysaten oft in hohen Mengen vorhandenen Nukleinsäuren die Trenneffizienz von IBs und Waschpuffer beträchtlich beeinflussen, wurden diese durch Zugabe von Benzonase (10 U/Zellysat), einer unspezifischen Nuklease, in einer 45minütigen Inkubation bei 37°C und unter leichtem Schütteln zuerst abgebaut. Desweiteren wurde Lysozym (2 mg/Zellysat) zum Abbau der Zellwand zugeben. Nach Zentrifugation bei 10 000 x g für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in 10 ml PBS/0.2 % Tween 20 resuspendiert und mit einem 10-Sekunden-Impuls sonifiziert und abermals zentrifugiert. Dieser Waschschrift zur Extraktion der Proteasen wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml 6 M Guanidin-Lysepuffer (Kap.II, A.7.2) resuspendiert, 45 min bei Rt geschüttelt, dreimal mit je einem 10-Sekunden-Impuls auf Eis sonifiziert und anschließend bei 4°C und 3000 x g für 15 min zentrifugiert. Das als Überstand gewonnene Zellysat wurde in ein neues Röhrchen überführt und ebenso wie das Zellrest-Pellet bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

#### **10.4 Säulenpräparation und Proteinreinigung**

Die Präparation der Säulen erfolgte gemäß dem Protokoll 1.2 “Preparation of ProBond™ Columns” (Invitrogen, 1998d). Das Waschen der Säulen und die Elution des gewünschten Proteins wurde entweder anhand des Protokolls 1.4 „Column Washing and Elution under Native Conditions“ oder anhand des Protokolls 1.5 “Column Washing and Elution under Denaturing Conditions” (Invitrogen, 1998d) durchgeführt, gefolgt von einer Dialyse der Eluate (ÜN bei 4°C) gegen Dialysepuffer (s. Kap.II, A.7.2). Die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte sowie des jeweiligen Eluates erfolgte nach SDS-PAGE (je 15 µl Probe aufgetragen) mittels Silber- bzw. Coomassiefärbung (Kap.II, B.16) bzw. eines Western Blotes (Kap.II, B.18) unter Verwendung des Anti-Xpress-Ak und Anti-mouse-IgG-POD als Konjugat.

#### **11. Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der, auf einer von Bradford entwickelten farbstoffbindenden Methode (Bradford, 1976) basierende „BioRad Protein Assay“ verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll „Microassay Procedure“ (für Proteinkonzentrationen ≤ 25 µg/ml bzw. Gesamtproteinmengen von 1-20 µg) des zugehörigen Handbuchs. Eine Eichkurve, basierend auf Messungen der OD<sub>595</sub> für BSA mit Konzentrationen von 0.2 mg/ml (OD<sub>595</sub> = 0.089) bis 1.6 mg/ml (OD<sub>595</sub> = 0.740), zeigte, daß eine OD<sub>595</sub> von 0.47 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entspricht. Somit konnte die Konzentration der Proteine, deren OD<sub>595</sub> zwischen 0.089 und 0.74 lag, bestimmt werden.

Anmerkung: OD<sub>595</sub>-Messungen wurden im Spektrophotometer “UV visible” durchgeführt.

#### **12. Analyse von Proteinen/Peptiden**

*Molekulargewicht, Aminosäurezusammensetzung, Instabilitätsindex*

Die Berechnung des Molekulargewichtes sowie die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und des Instabilitätsindex von Peptiden erfolgte mit Hilfe des Modellierungsprogrammes „Swiss Prot“ unter dem Link „ExPASy-ProtParam Tool“ (ExPASy-Homepage: <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). Die Bestimmung des Instabilitätsindex beruht auf einer Methode von Guruprasad *et al.*, 1990. Dabei wird ein Protein mit einem Instabilitätsindex < 40 als stabil und > 40 als instabil betrachtet.

### **13. Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die Herstellung monoklonaler Antikörper (aus Ratte) mittels der von George Köhler und César Milstein (1975, 1976) erstmals beschriebenen Methode der „Zell-Fusions-Technik“ wurde freundlicherweise von Frau Elisabeth Kremmer am Institut für Molekulare Immunologie des GSF Forschungszentrums in München durchgeführt. Zur Aufbewahrung der Antikörper-Lösung wurde Natriumazid in einer Konzentration von 0.02 % zugegeben.

### **14. Proteinrestriktion mit Hilfe spezifischer Endoproteinasen**

Spezifische Bindungen in Proteinen können mit Hilfe proteolytischer Enzyme, sogenannten Proteasen, gespalten werden. Es ist zwischen zwei prinzipiellen Mechanismen der Proteolyse zu unterscheiden, der quantitativen und der partiellen Spaltung. Bei der quantitativen Proteolyse spaltet ein Enzym entsprechend seiner Spezifität alle Bindungen und erzeugt damit einen äquimolaren Satz an Peptiden, dessen Zusammensetzung sich auch durch die Zugabe von weiterem Enzym gleicher Spezifität nicht mehr ändert. Im Gegensatz hierzu entstehen bei der partiellen Proteolyse unterschiedliche Spaltmuster mit dem gleichen Enzym. Diese Form der Proteolyse kann durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen und Reaktionszeiten des Enzyms gesteuert werden.

Im Verlaufe dieser Arbeit fand sowohl die quantitative als auch die partielle Proteolyse Verwendung. Eine Spaltung in Lösung, die mit dem geringsten Proteinverlust verbunden ist, wurde durchgeführt. Pro Proteaseansatz wurden je 2 ml des zu spaltenden Proteins (vorliegend in Elutionspuffer mit 8 M Harnstoff, pH 4.0) ÜN bei 4°C gegen 1 L für die jeweils eingesetzte Protease kompatiblen Verdauungspuffer dialysiert. Zusätzlich konnte dadurch die zu hohe Konzentration an denaturierendem Detergenz auf einen für die Protease akzeptablen Bereich verdünnt werden. Zur Spaltung wurden hochspezifische Endoproteasen eingesetzt. Diese wurden gemäß der beiliegenden Anleitung (Boehringer Mannheim) in bidestilliertem Wasser gelöst. Die empfohlene Enzymmenge lag zwischen 1/200 bis 1/20 der Gewichtsmenge an Protein, die empfohlene Inkubationszeit je nach Enzymmenge und Enzym zwischen 2 und 18 Stunden bei 37°C bzw. 25°C. Als Negativkontrolle der Proteolyse wurde die gleiche Menge an dialysiertem bzw. nicht dialysiertem Protein unter entsprechenden Bedingungen (Temperatur, Zeit) inkubiert. Dadurch konnte eine eventuell durch den jeweiligen Proteasepuffer hervorgerufenen unspezifische Spaltung analysiert werden. Zum Beenden der Restriktion wurden die Proben im Verhältnis 4:1 mit 4x SDS-PAGE-Probenpuffer verdünnt, 5 min. bei 95°C inkubiert und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Zur Kontrolle der entstandenen Fragmente wurde SDS-PAGE (Kap.II, B.15) unter Einsatz von Tris-Tricin-Gelen durchgeführt. Dadurch war eine bessere Auftrennung von kleinen Fragmenten möglich.

Der Nachweis der Proteinfragmente erfolgte entweder nach der Methode von Fairbanks *et al.* (1971) mit Coomassie-Blau (Kap.II, B.16.1) oder mit Hilfe eines Western Blots (Kap.II, B.18) unter Verwendung des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers und Anti-rat-IgG-POD-Fab-Fragments als Konjugat.

### **15. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

(Laemmli *et al.*, 1970)

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde im Verlaufe dieser Arbeit aus drei Gründen eingesetzt:

- a. Überprüfung der Expression eines gewünschten Proteins unter bestimmten Bedingungen (Tris-Glycin-SDS-PAGE)
- b. Überprüfung des Reinheitsgrades eines Proteins (Tris-Glycin-SDS-PAGE)
- c. Überprüfung von Proteinrestriktionen mittels spezifischer Proteasen (Tris-Tricin-SDS-PAGE).

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden hierzu mit SDS-PAGE-Auftragspuffer (Kap.II, A.7.2) versetzt, 5 min bei 98°C inkubiert und kurz zentrifugiert. Bei einer Verwendung von Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden die Proben in SDS-PAGE-Laufpuffer, pH 8.5 (Kap.II, A.7.2) für ca. 4 h bei 250 V über ein 12.5 %iges Polyacrylamid-Gel (Kap.II, A.7.5.3) aufgetrennt. Als Standard wurde der Protein-Standard, low range (Kap.II, A.5.1) eingesetzt.

Im Falle von Tris-Tricin-SDS-PAGE wurden die Proben unter Verwendung eines Puffersystems, welches sich aus einem Kathoden- und Anodenpuffer (Kap.II, A.7.2) zusammensetzt, ÜN bei 10 V aufgetrennt. Als Standard diente der Polypeptid-SDS-PAGE-Standard (Kap.II, A.5.1). Die Proteinbanden wurden nach Gelelektrophorese durch Coomassie-Färbung (Kap.II, B.16.1) bzw. Silberfärbung (Kap.II, B.16.2) sichtbar gemacht.

## **16. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

### **16.1 Coomassie-Färbung**

(Fairbanks *et al.*, 1971)

Die verwendeten Lösungen wurden, wie in Kap.II, A.7.5.2 beschrieben, hergestellt. Zur Färbung wurden die Proteingele für  $\geq 2$  h in Färbelösung unter leichtem Schütteln bei Rt inkubiert. Die Entfärbung erfolgte wiederum unter leichtem Schütteln bei Rt durch Inkubation für  $\geq 4$  h in Entfärberlösung. Nach ausreichender Entfärbung des Gels wurde dieses in Aufbewahrungslösung inkubiert. Die Geldokumentation erfolgte durch Photographie (Kleinbildkamera).

### **16.2 Silberfärbung**

(Heukeshoven *et al.*, 1988)

Die verwendeten Lösungen wurden, wie in Kap.II, A.7.5.1 beschrieben, hergestellt. Zur Silberfärbung wurden die Proteingele unter leichtem Schütteln in folgenden Lösungen nacheinander inkubiert: 30 min Inkubation in Fix 1-Lösung, gefolgt von einer Inkubation in Fix 2-Lösung für  $\geq 1$  h. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift für je 20 min in H<sub>2</sub>O. Zum Färben wurden die Gele für 45 min in Färbelösung inkubiert und anschließend durch Inkubation in Entwickler-Lösung (ca. 2-5 min) die Proteinbanden sichtbar gemacht. Mittels Stopplösung konnte die Entwicklung abgebrochen werden. Bis zur Dokumentation wurden die Gele in Stopplösung aufbewahrt.

## **17. Färbung von Nitrocellulose-Transfermembranen**

Nitrocellulose-Membranen (NC) wurden nach dem Blotten zur Markierung der Markerbanden und anderer Proteinbanden mit Ponceaus S angefärbt. Das Ponceaus S-10x Konzentrat wurde mit destilliertem H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10 verdünnt (Ponceau S-Arbeitslösung). Zur Färbung wurde die NC unter leichtem Schütteln (10 min bei Rt) in Ponceau S-Arbeitslösung inkubiert und anschließend mit destilliertem H<sub>2</sub>O unter Schütteln (bei Rt) entfärbt. Während des Entfärbens wurden die einzelnen Proteinbanden identifiziert und mit einem wasserfestem Stift markiert.

## **Immunologische Methoden**

### **18. Western Blot (Immunoblot)**

Zur Durchführung eines Western Blotes wurden die zu untersuchenden Proben durch SDS-PAGE (Kap.II, B.15) aufgetrennt und die Proteine in Blotpuffer, pH 8.3 (Kap.II, A.7.2) für ca. 1.5-2 h bei 175 mA ( $0.65\text{mA/cm}^2$ ) elektrophoretisch (mittels Blotapparatur) auf eine Nitrocellulose-Transfermembran übertragen. Durch Färbung mit Ponceau S (Kap.II, B.17) wurden die Proteinbanden identifiziert und markiert.

Anschließend wurde ein immunologisch spezifischer Nachweis einzelner Proteine durchgeführt. Durch Inkubation in „Blocking“-Puffer (Kap.II, A.7.2) für  $\geq 1$  h bei Rt unter leichtem Schütteln sollte zuerst der unspezifische Hintergrund vermindert werden. Nach viermaligem Waschen (je 5 min unter Schütteln) in TBST (Kap.II, A.7.2) wurde die NC zur Bindung des spezifischen Antikörpers unter leichtem Schütteln in Verdünnungspuffer (Antikörper-Lösungen, s. Kap.II, A.7.2) inkubiert (bei Rt  $\geq 6$  h, besser ÜN). Anschließend wurde die Membran gewaschen (s.o.), zur Bindung des Konjugates unter leichtem Schütteln in Verdünnungspuffer (Konjugatlösungen, s. Kap.II, A.7.2) inkubiert (1 h bei Rt) und abermals gewaschen. Der Nachweis der Proteinbanden erfolgte durch eine ca. siebenminütige Inkubation (leichtes Schütteln, Rt) in Detektionslösung (Kap.II, A.7.2), der durch Waschen mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  abgestoppt wurde.

#### *Herstellung von Western Blot-Streifen*

Nach Blocken und Waschen der NC wurden per Hand oder mit Hilfe eines Schneidegerätes Streifen präpariert, an Luft getrocknet und anschließend luftdicht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Im Western Blot wurden die Streifen mit je 2 ml der entsprechenden Lösung inkubiert.

### **19. ELISA**

#### **19.1 Durchführung des käuflichen ELISA „ $\mu$ PLATE Anti-HGenv“**

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen von Seren verschiedener Bevölkerungsgruppen wurde zum spezifischen Nachweis von IgG Antikörpern gegen das GBV-C-E2-Antigen im Serum der ELISA „ $\mu$ PLATE Anti-HGenv“ eingesetzt. Die Herstellung der einzelnen Lösungen und die Durchführung des Mikrotiterplattentestes erfolgte nach den Herstellerangaben. Extinktionsmessungen (405 nm) wurden am „Dynatech MR7000 Microplate Reader“ ausgeführt.

#### **19.2 Durchführung des etablierten ELISAs**

Der ELISA wurde in einer „Greiner F“-Mikrotiterplatte durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der Methode eines „ELISA-Sandwich-Assay“.

Zur Bindung des spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen das E2-Antigen von GBV-C wurde eine 1:20-Verdünnung in PBS, pH 7.4 hergestellt, in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 120  $\mu\text{l}$  pipettiert und für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Unter Verwendung des ELISA-Waschgerätes „Labsystems Multiwash“ wurde anschließend viermal à 400  $\mu\text{l}$ /Vertiefung mit Waschpuffer ohne Tween 20 (s. Kap.II, A.7.2) gewaschen. In der ersten Immunreaktion erfolgte die Bindung des GBV-C-E2-Antigens an den spezifischen Anti-E2-Antikörper. Hierzu wurde eine 1:5- bzw. 1:2-Verdünnung des Antigens in PBS, pH 7.4 hergestellt, 120  $\mu\text{l}$ /Vertiefung pipettiert und über Nacht (bei Rt) inkubiert. Am nächsten Tag

wurde, wie zuvor, jede Vertiefung gewaschen. Um unspezifische Bindungsreaktion zu vermeiden, wurde für 1.5 h bei 37°C mit 120 µl „Blocking“-Lösung (Kap.II, A.7.2) je Vertiefung inkubiert. Darauf folgten vier weitere Waschschrte. Die zweite Immunreaktion bestand darin, eventuell in humanen Serumproben existierende Anti-E2-Antikörper an das E2-Antigen zu binden. Hierzu wurden die Proben mit Verdünnungspuffer 1:60 vorverdünnt. Zur Bindungsreaktion wurden 100 µl/Vertiefung pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die folgenden vier Waschschrte (400 µl/Vertiefung) wurden mit tweenhaltigem Waschpuffer (s. Kap.II, A.7.2) durchgeführt. In einer dritten Immunreaktion wurde dann mit Peroxidase konjugiertes Anti-Human-IgG an die Anti-E2-Antikörper gebunden. Hierzu wurde eine 1:2000 Verdünnung in dem entsprechenden Verdünnungspuffer (Kap.II, A.7.2) hergestellt, 100 µl/Vertiefung pipettiert und bei 37°C für 55 min inkubiert. Zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes wurde anschließend sechsmal mit 400 µl/Vertiefung und tweenhaltigem Waschpuffer gewaschen. Die Indikatorreaktion erfolgte unter Schütteln im Dunkeln mit je 100 µl ABTS-Fertiglösung/Vertiefung für  $\geq 10$  min. bei Rt. Zum Abstoppen wurden je 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Vertiefung zupipettiert und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm im „Dynatech MR7000 Microplate Reader“ ermittelt.

## **Zellbiologische Methoden**

### **20. Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) aus Blut**

(Boyum, 1968)

Der Isolierung von Lymphozyten lag eine von Boyum (1968) entwickelte Ein-Schritt-Technik unter Verwendung einer Mischung aus Natriummetrizoat/Ficoll und einer Zentrifuge zugrunde. Die Lymphozytenpräparation erfolgte aus 20 ml Frischblut, das mit dem Antikoagulanzt EDTA behandelt wurde. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde mittels der sterilen Fertiglösung „Lymphoflot“ (Kap.II, A.1) nach einem abgewandelten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Blut wurde mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Ein mit 10 ml Lymphoflot gefülltes Zentrifugenröhrchen wurde mit 40 ml des vorverdünnten Blutes vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde bei Rt und 1000 x g 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der hierdurch entstandene Lymphozyten-Ring wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein sauberes Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und bei Rt und 230 x g 10 min mit Bremse zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in PBS resuspendiert und danach bei Rt und 110 x g 10 min mit Bremse zentrifugiert. Die im Zellpellet enthaltenen Lymphozyten konnten dadurch von den im Überstand enthaltenen Thrombozyten abgetrennt werden. Anschließend wurde die Zellzahl (Kap.II, B.21) mit Medium eingestellt.

### **21. Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Es wurde davon ausgegangen, daß 100 ausgezählte Zellen 1 x 10<sup>6</sup> Zellen / ml entsprechen (Auszählung von mindestens 100 Zellen in 16 Quadraten).

Zur Unterscheidung lebender von toten Zellen wurden die Zellen nach Trypanblau-Färbung (im Verhältnis 10:1) im Lichtmikroskop analysiert. Die Lebensfähigkeit („cell viability“) errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \text{Zahl der lebenden Zellen} / \text{Gesamtzellzahl (lebend + tot)}$$



Bei allen weiterführenden Versuchen wurde von der berechneten Zahl lebender Zellen ausgegangen.

## **22. Zelltrennung mit MACS (Magnetic Cell Sorting)**

(Miltenyi Biotec, 1999)

Mit Hilfe der MACS-Technik sollten bestimmte humane Lymphozytenfraktionen (T- und B-Lymphozyten) gewonnen werden. Hierzu wurden die Lymphozyten isoliert (vgl. Kap.II, B.20). Die Markierung und Trennung der Lymphozyten erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

T-Lymphozyten wurden mit paramagnetischen Mikroperlen, konjugiert mit monoklonalem Maus Anti-Human CD3 Antikörper, markiert, B-Lymphozyten mit paramagnetischen Mikroperlen, konjugiert mit monoklonalem Maus Anti-Human CD19 Antikörper. Die Zelltrennung erfolgte über  $MS^+$ -Säulen nach dem Prinzip der positiven Selektion, d.h. die Zielzellen wurden markiert und somit als magnetisch positive Fraktion von der Säule eluiert („Eluat-Fraktion“). Die maximale Kapazität der  $MS^+$ -Säulen lag bezüglich der zurückgehaltenen Zellen bei  $10^7$  und der Gesamtzellzahl bei  $2 \times 10^8$  Zellen. Die als Durchlauf des Probenauftrages und die in den einzelnen Waschschrritten eluierten, nicht magnetischen Zellen wurden als sogenannte „Depleted Fraktion“ gesammelt. Um die Reinheit der Eluat-Fraktion noch zu verbessern, wurden die Zellen anschließend ein zweites Mal über eine neue, frisch präparierte  $MS^+$ -Säule aufgetrennt.

Zur Kontrolle der MACS-Trennung wurden die getrennten Zellen bezüglich der Gesamtzellausbeute und Lebensfähigkeit (Kap.II, B.21) analysiert. Die Gesamtzellausbeute wurde in diesem Fall nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellausbeute} = \frac{100 \times (\text{Zellzahl in Eluatfraktion} + \text{Zellzahl in Depleted Fraktion})}{\text{Zellzahl in Ausgangsprobe}}$$

## **23. Zellkultur von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC`s)**

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden aus EDTA-behandeltem Frischblut GBV-C-infizierter bzw. nicht infizierter Spender gemäß der in Kap.II, B.20 beschriebenen Methode isoliert und die Gesamtzellausbeute und Zellebensfähigkeit überprüft (s. Kap.II, B.21). Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10 % hitze-inaktiviertem FKS, 2 mM Glutamin und Penicillin (1 U/ml)/Streptomycin (1 µg/ml), auf eine, dem Experiment entsprechend, optimale Zellzahl eingestellt und in 6-Well- bzw. 24-Well-Platten bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 %  $CO_2$  in Kultur genommen.

Das Kulturmedium wurde in Zeitabständen von 4-5 Tagen gewechselt. Hierzu wurden die Zellen gesammelt und bei Rt und 200 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in der gleichen Menge an frischem RPMI 1640-Medium aufgenommen.

## **24. Berechnung „1 Genomäquivalent/x Zellen“**

Bei der Berechnung der Zellzahl, unter der ein Genomäquivalent von GBV-C anzutreffen ist, wurde davon ausgegangen, daß lediglich  $\frac{1}{25}$  ml in der nested PCR eingesetzt wird. Weitere

Parameter waren u.a. die in einem Milliliter enthaltene Zellzahl sowie die Verdünnungsstufe, bei der 50 % aller PCR-Ansätze positiv sind (50 % Titer).

**Beispiel:** Eine Verdünnungsstufe bzw. ein 50 % Titer von  $10^2$  ergäbe bei Einsatz eines  $1/25$  ml in die PCR 2500 Genomäquivalente pro ml bzw. pro Anzahl der Zellen in einem ml. Hieraus läßt sich mit Hilfe eines Dreisatzes die Anzahl der Zellen berechnen, die ein virales Genomäquivalent enthalten.

## **25. In vitro-Infektion von humanen peripheren mononukleären Blutzellen mit GB-Virus-C**

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden aus EDTA-behandeltem Frischblut gesunder, nicht GBV-C infizierter Spender isoliert (vgl. Kap.II, B.20). Nach Bestimmung der Gesamtzellausbeute und Überprüfung der Zellebensfähigkeit wurden die Zellen mit RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM Glutamin und Penicillin (1 U/ml) / Streptomycin (1 µg/ml), auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden zwei Formen der *in vitro*-Infektion von PBMC's mit einem geeigneten GBV-C-Inokulum (s.u.) ausgetestet, d.h. einerseits eine *in vitro*-Infektion ohne, andererseits eine *in vitro*-Infektion mit Phytohämagglutinin (PHA)/ Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulierung.

Für die *in vitro*-Infektion ohne Stimulierung wurden in einer 6 Well-Zellkultur-Platte  $2 \times 10^6$  Zellen/Well ÜN bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Medium (s.o.) resuspendiert und für die Infektion in 24-Well-Zellkultur-Platten mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml (pro Well) aliquotiert und anschließend 4 Stunden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem GBV-C RNA-positiven Serum (250 µl bzw. 500 µl bzw. 1ml/ $10^6$  Zellen) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gesammelt, fünfmal mit PBS gewaschen (d.h. Resuspension in PBS, Zentrifugation bei Rt und 200 x g für 10 min und anschließend abermalige Resuspension des Zellpellets in PBS) und mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml Medium in Kultur gehalten. Das Kulturmedium wurde in bestimmten Zeitabständen ca. 4-6 Wochen gewechselt und jeweils Aliquots der entsprechenden Überstände gesammelt. Bis zur Untersuchung auf GBV-C-RNA durch RT-PCR wurden diese bei -20°C aufbewahrt. Als Negativkontrolle wurde ein Pool derselben frischen PBMC's jedes Spenders, unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne GBV-C Positivserum inkubiert. Aliquots der entsprechenden Überstände wurden je Mediumwechsel gesammelt und bis zur RT-PCR-Untersuchung bei -20°C aufbewahrt.

Für die *in vitro*-Infektion mit Stimulierung wurden Phytohämagglutinin (PHA) und Lipopolysaccharid (LPS) in einer Konzentration von 5 µg/ $10^6$  Zellen zugegeben und anschließend die Zellen in 6 Well-Zellkultur-Platten mit einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/Well 65 Stunden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Stimulation wurden die Zellen in Medium resuspendiert, die Zellzahl überprüft und zentrifugiert (10 min, 200 x g, 20°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit einer Dichte von  $10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 20 U IL-2/ml resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für die Infektion in 24 Well-Zellkultur-Platten mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml RPMI 1640-Medium mit IL-2 aliquotiert (pro Well) und für 4 Stunden bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem GBV-C RNA-positiven Serum (650 µl bzw. 1 ml/ $10^6$  Zellen) inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen gesammelt, fünfmal mit PBS gewaschen und mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml RPMI 1640-Medium mit IL-2 in Kultur gehalten. Das Kulturmedium wurde über einen Zeitraum von 4-6 Wochen in bestimmten Zeitabständen gewechselt. Zu jedem Zeitpunkt des Mediumwechsels wurden Aliquots der Zellen und der entsprechenden Überstände gesammelt und bis zur RT-PCR-

Untersuchung auf GBV-C bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Als Negativkontrolle wurde ein Pool der selben frischen PBMC's jedes Spenders, unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne GBV-C Positivserum inkubiert. Zell- und Überstandaliquots wurden je Mediumwechsel gesammelt und bis zur Untersuchung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### *GBV-C-Inokulum*

Bei den zur *in vitro*-Infektion von PBMCs eingesetzten GBV-C Inokula handelte es sich um Seren zweier GBV-C infizierter Patienten (Patient A und Patient B). Beide Patienten waren zum Zeitpunkt der Serumgewinnung chronisch GBV-C infiziert und wiesen einen PCR-Titer von  $10^6$  Genomäquivalenten/ml auf.

#### *Untersuchung der Zell- und Überstandaliquots*

Nach Extraktion der Nukleinsäuren (Kap.II, B.3.1) aus je 200  $\mu\text{l}$  Überstand- bzw. Zellaliquot sowie der spezifischen Umschreibung unter Verwendung des Primers YK877 (Kap.II, A.3.2.2) wurde eine nested PCR (Kap.II, B.7) mit den Primern YK874, YK877, YK875 und YK876 (Kap.II, A.3.2.2) zum Nachweis von GBV-C durchgeführt. Beim Nachweis von GBV-C fand z.T. noch eine semiquantitative PCR Verwendung, um eventuelle Titeranstiege bzw. -abfälle nachweisen zu können.

### **Methode der *in situ*-Hybridisierung**

Die Technik der *in situ*-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen in entsprechend konservierten Chromosomen, Zellen und Gewebeschnitten. Ursprünglich wurde diese Technik unabhängig von Pardue *et al.* (1969) und John *et al.* (1969) entwickelt. Zu dieser Zeit stellte die radioaktive Markierungstechnik die einzige Möglichkeit dar, Nukleinsäuren zu markieren. Der anschließende Nachweis der hybridisierten Sequenzen erfolgte mittels Autoradiographie. Im Verlaufe dieser Arbeit fand die neuere Form der nichtradioaktiven *in situ*-Hybridisierung Verwendung (persönliche Mitteilung, Helene Breitschopf, 1997; Breitschopf *et al.*, 1992; Breitschopf *et al.*, 1996).

## **26. Sondenpräparation**

### **26.1 Herstellung der Template-DNA für die RNA-Transkription**

Als Template für die RNA-Transkription wurde ein DNA-Stück mit einem Promotor (T7 bzw. Sp6), gefolgt von der gewünschten Sequenz, benötigt. Als Ausgangsmaterial hierfür wurde ein entsprechendes Plasmid auf folgende Weise konstruiert:

Zur Gewinnung eines definierten DNA-Fragmentes wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Nach Isolierung und Aufreinigung des DNA-Fragmentes (s. Kap.II, B.6) wurde dieses in den Vektor pCR®II bzw. pCR®II-TOPO (vgl. Kap.II, A.3.1) nach Herstellerangaben (TA Cloning® Kit, Dual Promotor bzw. TOPO TA Cloning® Kit, Dual Promotor; Invitrogen) kloniert und anschließend in *E.coli* INV $\alpha$ F' (Kap.II, A.2.1) transformiert (Kap.II, B.8.2). Die Analyse der Transformanden auf Gegenwart und Orientierung des Inserts erfolgte durch Mini-Präparation (Kap.II, B.2.1), Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA (Kap.II, B.4.1) und Sequenzierung des Inserts und der Insertionsstellen (Kap.II, B.9). Nach Gewinnung eines entsprechenden Klones wurde von diesem eine Midi-Präparation (Kap.II, B.2.2) durchgeführt und anschließend die DNA-Konzentration bestimmt (Kap.II, B.3.4).

Zur Herstellung der Template-DNA für die Sense-Sonde (Sp6-Promotor) wurde das Plasmid hinter, für die Antisense-Sonde (T7-Promotor) vor der gewünschten Sequenz einmal geschnitten und somit linearisiert. Hierzu wurden 20 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 150 µl mit 50U Restriktionsendonuklease (10 U/µl) unter dem vom Hersteller vorgegebenen Pufferbedingungen, sowie 5 %iger BSA-Stammlösung (im Verhältnis 1:10), für 3 h bei 37°C verdaut. Zur Überprüfung der Restriktionsprodukte und -effizienz wurde nach 2 h ein Fünftel des enzymatischen Verdauens entnommen und neben einem ungeschnittenen Plasmid durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel analysiert (Kap.II, B.5.1). Der restliche Restriktionsansatz wurde weiter inkubiert. Nach 3 h Gesamtkubationszeit wurde das linearisierte Plasmid mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.2) aufgetrennt und isoliert (Kap.II, B.6). Zur weiteren Aufreinigung des Templates und zur Entfernung von RNAsen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Kap.II, B.3.2), wobei hier nach Zugabe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol bei 12000 x g für 10 min bei 4°C und nach Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol bei 12000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert wurde. Nach Fällung der Template-DNA (Kap.II, B.3.3) und Trocknen des Pellets im Vakuumexsikkator wurde dieses in 50 µl H<sub>2</sub>O-DEPC aufgenommen. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2 µl Template-DNA neben einer definierten Menge an linearisierter Plasmid-DNA aus der Midi-Präparation auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap.II, B.5.1) und die Konzentration des Templates durch Vergleich mit der Referenzbande abgeschätzt.

## **26.2 DIG-RNA-Labeling**

Die Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sense- bzw. RNA-Antisense-Sonden erfolgte durch *in vitro*-Transkription der Template-DNA (vgl. Kap.II, B.26.1) für die Sense- bzw. Antisense-Sonde mit dem „DIG RNA Labeling Mix“ (Kap.II, A.5.2).

Hierzu wurde zur Herstellung der Sense-RNA-Sonde bzw. der Antisense-RNA-Sonde 1 µg des gereinigten, linearisierten Plasmids (Template-DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 40 U SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl) bzw. 40 U T7-RNA-Polymerase (20 U/µl) unter den vom Hersteller vorgegebenen Pufferbedingungen in Gegenwart von 10 mM DDT, 20 U RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 1x „DIG-RNA-Labeling-Mix“ für 2h bei 37°C transkribiert. Nach 2 h Inkubation wurde die RNA-Transkription durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA, pH 8.0 abgestoppt. Eine Konzentrierung und Aufreinigung der DIG-markierten RNA erfolgte durch Zugabe von 2.4 µl 4 M LiCl plus 75 µl absolutem Ethanol sowie Fällung für mindestens 2 h bei -20°C. Nach Zentrifugation bei 12000 x g für 15 min (4°C) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, ca. 20 min luftgetrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O-DEPC unter Zugabe von 20 U RNase-Inhibitor (40 U/µl) durch 30minütige Inkubation bei 37°C und wiederholtes Mischen gelöst. Eine weitere Aufreinigung der DIG-markierten RNA wurde durch Auftragen auf eine Microspin S-400 HR-Säule erreicht (vgl. Kap.II, B.26.3).

## **26.3 Säulenreinigung von DIG-markierten RNA-Sonden**

Zur weiteren Aufreinigung DIG-markierter RNA wurden Microspin S-400 HR-Säulen (Kap.II, A.10) verwendet. Vor Gebrauch der Säulen wurde die Säulenmatrix durch Mischen in Lösung gebracht und äquilibriert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 2000 x g und 4°C wurde die Probe durch langsames Pipettieren auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gestellt und durch zweiminütige Zentrifugation (s.o.) eluiert.

## **26.4 Bestimmung der Konzentration an DIG-markierter RNA**

Die Konzentration an Digoxigenin in den DIG-markierter RNA-Sonden wurde mit Hilfe eines Dot-Blotes bestimmt. Dabei wurde entweder eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden RNA-Sonde auf eine Nylonmembran aufgetragen und die einzusetzende Menge abgeschätzt bzw. zur exakteren Mengenbestimmung eine käufliche DIG-markierte Kontroll-RNA (Kap.II, A.5.2) parallel dazu aufgetragen und die Ausbeute an DIG-markierter RNA durch direkten Vergleich mit dieser Kontrolle bestimmt. Die Mengenbestimmung an Digoxigenin-markierter RNA war Voraussetzung für optimale und reproduzierbare Ergebnisse. Zu hohe Probenkonzentrationen im Hybridisierungsmix verursachen u.a. eine zu große Hintergrundfärbung, während zu niedrige Konzentrationen zu schwache Signale zur Folge haben.

### **Dot Blot ohne DIG-markierte Kontroll-RNA**

Verschiedene Verdünnungsstufen (1:5 / 1:20 / 1:80 / 1:320 / 1:1280 / 1: 5120) der DIG-RNA wurden mit H<sub>2</sub>O-DEPC (s. Kap.II, A.7.4) hergestellt, je 1 µl der Verdünnungen auf eine Nylonmembran (Kap.II, A.10) aufgetragen und mit dem „UV crosslinker UVC 500“ (Kap.II, A.11) 2 min fixiert. Dann wurde der Dot-Blot in 1 %igem Blockingreagenz (Kap.II, A.7.4) für ≥ 1 h im Hybridisierungssofen „Personal Hyb“ (Kap.II, A.11) bei Rt geblockt. Anschließend folgte eine 30minütige Inkubation (Hybridisierungssofen, Rt) mit Anti-DIG-AP-Fab-Fragment-Antikörperlösung (Kap.II, A.7.4). Es handelt sich hierbei um, mit alkalischer Phosphatase konjugierte, digoxigeninspezifische Antikörper. Danach wurde der Dot-Blot dreimal je 10 min mit Waschpuffer (Kap.II, A.7.4) im Hybridisierungssofen bei Rt gewaschen. Nach kurzer Äquilibration in NBT/BCIP-Puffer (Kap.II, A.7.4), wurde der Dot-Blot durch 20minütige Inkubation in NBT/BCIP-Färbelösung (Kap.II, A.7.4) entwickelt (Hybridisierungssofen, Rt). Hierbei bildete sich ein braunes Präzipitāt als Nachweis der Enzymaktivität. Aus dem Vergleich der Farbintensität der einzelnen Verdünnungsstufen konnte dann die optimale DIG-Konzentration bestimmt werden.

### **Dot-Blot unter paralleler Verwendung einer DIG-markierten Kontroll-RNA**

Eine exaktere Mengenbestimmung war durch den direkten Intensitätsvergleich der Probe und einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Ausgangskonzentration 100 ng/µl) im Dot-Blot möglich. Hierzu wurde von der Kontroll-RNA eine Vorverdünnung mit einer Endkonzentration von 20 ng/µl hergestellt (vgl. Kap.4, IX: Boehringer Mannheim GmbH, 1996) und gemäß dem „Verdünnungsschema C“ eine Verdünnungsreihe mit Endkonzentrationen von 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 0.1 pg/µl und 0.01 pg/µl vorbereitet. Ausgehend von der Kenntnis, daß in einer Standard-Markierungsreaktion von RNA aus 1µg Template-DNA ca. 10 µg DIG-RNA transkribiert werden können, wurde von der experimentell hergestellten RNA-Sonde ebenso eine Vorverdünnung mit einer Konzentration von 20 ng/µl sowie eine der Kontroll-RNA entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wurde je 1 µl der Verdünnungen auf eine Nylonmembran aufgetragen und mit dem „UV crosslinker UVC 500“ 2 min fixiert. Die weitere Fortführung des Dot-Blots erfolgte gemäß dem oben aufgeführten Protokoll.

## **27. Gewebepräparation**

Die Gewebeproben für die Untersuchung des Replikationsortes von GBV-A bzw. GBV-B stammten aus Krallenaffen der Spezies *Sanguinus fuscicollis* (Kap.II, A.8.2). Nach Inokulation der Affen (s. Kap.II, B.29) wurde diesen Blut abgenommen und anschließend

Serum gewonnen (Kap.II, B.30), welches in der PCR hinsichtlich GBV-A bzw. GBV-B untersucht wurde (Kap.II, B.7). GBV-A wurde dabei mit 5`NTR-Primern (Kap.II, A.3.2.2) und GBV-B mit 5`NTR- bzw. NS3-Primern (Kap.II, A.3.2.2) amplifiziert.

Die zur Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C eingesetzten Gewebeproben stammten aus GBV-C infizierten und nicht infizierten, z.T. verstorbenen Patienten (Kap.II, A.8.2). Die Identifikation GBV-C positiver bzw. negativer Patienten erfolgte mittels PCR (Kap.II, B.7) und den Primern YK874, YK877, YK875 und YK876 (Kap.II, A.3.2.2).

Alle Gewebe wurden direkt nach der Entnahme in 4 % gepuffertem Paraformaldehyd (Kap.II, A.7.4) ÜN bei Rt fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben mit PBS-Puffer gewaschen, in Paraplast unter Vakuum automatisch mit dem „Hypercenter XP“ (Kap.II, A.11) eingebettet und in Paraplast-Blöcken ausgegossen. Für die *in situ*-Hybridisierung wurden unter Verwendung von Mikrotom-Einmalklingen Typ S-35 (Kap.II, A.9) 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf bereits mit Polylysin präparierte Objektträger (Kap.II, A.9) aufgezogen. Eine Fixierung der Gewebeschnitte auf den Objektträger erfolgte durch Inkubation bei 43°C (15 min) und anschließende Inkubation ÜN bei 55°C. Die Schnitte wurden bei Rt in einem entsprechenden Behälter bis zum Gebrauch aufbewahrt.

## **28. In situ-Hybridisierung**

Die Methode der *in situ*-Hybridisierung wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von Virus-RNA in Gewebeproben mit spezifischen, zur gesuchten Sequenz komplementären, Digoxigenin-markierten RNA-Sonden eingesetzt.

### **28.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte**

Nach Herstellung der entsprechenden RNA-Positivstrang- und RNA-Negativstrang-Sonden und Präparation des Gewebes wurden die zu untersuchenden Gewebeschnitte als erstes unter RNase freien Bedingungen vorbehandelt. Zum Entwachsen der Schnitte wurden diese ÜN (bei Rt) in Xylol gestellt, gefolgt von einer 20minütigen Xylol-Inkubation am nächsten Morgen. Eine anschließend absteigende Ethanolreihe (3x 96 %, je 1x 75 % / 50 % / 30 % EtOH und 1x H<sub>2</sub>O) diente zur Wässerung des Gewebes. Zur Nachfixierung der RNA im Gewebe wurden die Schnitte für 20 min bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd (4°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer wurden die Schnitte mit 0.2 M HCl (10 min, Rt) behandelt, um vorhandene Proteine zu denaturieren und eine partielle Hydrolyse der Zielsequenzen zu bewirken. Dies trägt zu einem verbesserten Hybridisierungssignal bei. Anschließend wurde dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Zur Reduktion des nichtspezifischen Hintergrunds wurden die Schnitte in 0.5 %iger Essigsäureanhydrid-Lösung für 10 min bei Rt unter Rühren inkubiert und mit TBS-Puffer (3x) gewaschen. Ein 30minütiger (bei 37°C) ProteinaseK-Verdau (20 µg Proteinase K/ml TBS, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) sollte die Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die Sonden durch den Verdau von Proteinen zusätzlich verbessern. Zum Abstoppen der Proteinase K-Aktivität wurden die Schnitte mit TBS-Puffer (3x) gewaschen und einmal in eiskaltem TBS-Puffer für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30% / 50% / 75% / 3x 96%) dehydriert und einmal kurz mit Chloroform gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer unter RNase freien Bedingungen bei 55°C für ≥ 30 min in einem sogenannten Vorhybridisierungsmix, der alle Komponenten des Hybridisierungsmixes, außer die Probe und Dextransulfat, enthält, zur Vermeidung einer Hintergrundfärbung inkubiert.

## **28.2 Hybridisierung**

Auch für die nun folgenden Hybridisierungsschritte galt es, unter RNase freien Bedingungen zu arbeiten. Während der Inkubation der Gewebeschnitte (s.o.) wurde der Hybridisierungspuffer (Kap.II, A.7.4) hergestellt. Dieser sollte immer gut gemischt sein, um einer ungleichen Verteilung des Dextransulfats, dessen Konzentration sehr kritisch ist, vorzubeugen. Bei ungenügender Menge an Dextransulfat verliert die Methode an Sensitivität, bei zu großen Mengen bewirkt es eine zu hohe Viskosität des Hybridisierungspuffers. Die RNA-Sonde mit der im Dot-Blot ermittelten optimalen Sondenverdünnung wurde als letztes (im Verhältnis 1 : 4, d.h. Sonde : Hybridisierungspuffer) zum Hybridisierungspuffer zugegeben. In die Negativkontrolle für die *in situ*-Hybridisierung wurde anstelle der RNA-Sonde H<sub>2</sub>O-DEPC zupipettiert. Die verdünnte RNA-Sonde wurde dann auf die Schnitte aufgetragen (ca. 100 µl/cm<sup>2</sup>), mit einem Deckglas bedeckt und die Objektträger für 4 min auf einer Heizplatte bei 95°C inkubiert. Der Hitzeschritt bewirkt die Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen und somit ein verstärktes Signal der RNA/RNA-Hybride. Zur Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte in der feuchten Kammer für 6 h bei 55°C inkubiert.

## **28.3 Stringentes Waschen und Nachweis der RNA**

Durch stringentes Waschen konnte der Überschuß an Hybridisierungssonde entfernt und somit eine Reduktion der diffusen Hintergrundfärbung erreicht werden. Hierzu wurden die Schnitte nach Hybridisierung ÜN bei Rt in 2x SSC eingestellt, was u.a. ein Abschwimmen der Deckgläser ermöglichte. Anschließend wurden die Schnitte in entsprechender Reihenfolge gewaschen: dreimal 20 min bei 55°C mit 50 % deionisiertem Formamid in 1x SSC, gefolgt von zweimal 15 min bei Rt mit 1x SSC und dreimal Waschen mit TBS-Puffer (Lösungen vgl. Kap.II, A.7.4). Zum Nachweis der RNA wurden die Gewebeschnitte zuerst durch Aufpipettieren von Blocking Mix (ca. 200 µl/cm<sup>2</sup>) für 15 min in der feuchten Kammer bei Rt geblockt. Zur Bindung des Anti-DIG-Antikörpers, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, wurden die Schnitte für 1h in der feuchten Kammer bei Rt in Antikörper-Lösung (Kap.II, A.7.4) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5x mit TBS-Puffer gewaschen und in NBT/BCIP-Färbelösung (Kap.II, A.7.4) bei 4°C ÜN entwickelt. Durch mehrmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O-DEPC wurde die Farbreaktion gestoppt. Zur besseren mikroskopischen Betrachtung wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaunlösung (Kap.II, A.1) gegengefärbt und mit Kaysers Glycerinergelatine (Kap.II, A.1) eingedeckt.

## **Experimente mit Krallenaffen**

### **29. Inokulation, Blutabnahme und Gewebeentnahme**

Die intravenöse Inokulation der Krallenaffen mit 70-100 µl eines 1:1 bzw. 1:100 mit Kochsalzlösung verdünnten Inokulums wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Norbert Deurling am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Blutabnahme wurde freundlicherweise von Herr Dr. Norbert Deurling bzw. Herr Prof. Dr. Gert Frösner am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Hierzu wurden nach Inokulation meist wöchentlich 1-2 ml Blut aus der Oberschenkelvene des Affen abgenommen und anschließend 0.5-1 ml Serum gewonnen. Beim Tod des Affen wurde dieser entblutet, d.h. es konnten 5-25 ml Blut gewonnen werden.

Die Gewebeentnahme nach Tod der Affen wurde freundlicherweise von Herr Dr. Norbert Deurling am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Gewebe wurden anschließend wie in Kap.II, B.27 beschrieben präpariert.

### **30. ALT-Wert-Bestimmung**

Zur Bestimmung des ALT-Wertes wurde ein käuflicher Test der Firma Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics verwendet. Die Untersuchungen wurden im Labor der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.



### **III. ERGEBNISSE**

#### **A. Das GB-Virus-A und GB-Virus-B**

##### **1. Reinisolierung des GB-Virus-A und GB-Virus-B**

Das originale "GB"-Inokulum enthält eine Mischung von GB-Virus-A und GB-Virus-B. Erst nach Herstellung von Reinisolaten dieser beiden Viren ist es möglich, Kreuzinfektionsexperimente zur Untersuchung einer möglicherweise vorhandenen Kreuzimmunität sowie Untersuchungen zum Replikationsort der Viren durchzuführen.

Das Prinzip der Reinisolierung bestand darin, ein jeweils in der PCR nur für ein Virus positives Material von Affen in weitere Affen durch intravenöse Inokulation zu passagieren. Für die Reinisolierung von GBV-A diente verdünntes Gehirnhomogenat GB-infizierter Affen, da in diesem Organ höhere Konzentrationen von GBV-A im Vergleich zu GBV-B gefunden wurden. Für die Reinisolierung von GBV-B diente das Serum eines GB-infizierten Affen einige Zeit nach der Inokulation, weil die Replikation von GBV-B in der Regel länger als die Vermehrung von GBV-A nachweisbar war. Die Reinheit der gewonnenen Isolate wurde durch weitere Passagen, in denen jeweils nur die Replikation des reinisolierten Virus nachgewiesen wurde, bestätigt.

##### **1.1 Reinisolierung des GB-Virus-A und Studien zur Kreuzimmunität**

Das im GB-Inokulum nur gemeinsam mit GBV-B auftretende Virus GBV-A wurde anhand des oben erwähnten Prinzips aus Gehirnmaterial im Affen von GBV-B getrennt, d.h. reinisoliert. Anschließend wurden sogenannte Challenge-Experimente mit GBV-A bzw. GBV-B, d.h. zusätzliche Infektion eines bereits mit GBV-A infizierten Affen mit GBV-A oder GBV-B zur Untersuchung der homologen Immunität und der Kreuzimmunität durchgeführt.

##### ***Gewinnung des GBV-A-Inokulums "93-C-2m"***

Aufgrund früherer PCR-Untersuchungen verschiedener Gewebeproben hinsichtlich GBV-A- bzw. GBV-B-RNA wurde festgestellt (A. Kekulé, persönliche Mitteilung), daß, im Gegensatz zum fehlenden Nachweis von GBV-B, GBV-A in sehr hohem Titer in Gehirnmaterial gefunden wurde (vgl. Affe 92-A-6m, Tab.III.1). Daher wurde angenommen, daß GBV-A alleinig durch die Inokulation eines naiven Affen mit verdünntem homogenisiertem Gehirn-

material (nur GBV-A positiv) von GBV-B zu trennen wäre. Im April 1996 wurde der Affe 93-C-2m zweimal im Abstand von einem Tag mit je 500 µl des 1:200 in isotonischer Kochsalzlösung vorverdünnten homogenisierten Großhirns des Affen 92-A-6m inokuliert. Durch PCR-Untersuchung wöchentlich abgenommener Blutproben (Gesamtdauer ca. 7 Monate) auf GBV-A bzw. GBV-B konnte über Wochen hinweg gezeigt werden, daß die PCR von Blut allein für GBV-A positiv waren. Damit war ein wichtiger Schritt in Richtung Reinisolierung von GBV-A getan. Bei dem in den folgenden Versuchen eingesetzten GBV-A-Inokulum "93-C-2m" handelte es sich um das Serum des gleichnamigen Affen vom 22.04.1996.

**Tab.III.1** Der Affe 92-A-6m war nach Inokulation mit GBV-A und GBV-B bis zu seinem Tod am Tag 21 p.I. für beide Viren hochtitrig positiv. Gleichzeitig konnten sehr hohe ALT-Werte (458 U/l) festgestellt werden. Mit RT-PCR untersuchtes Gehirnmateriale zeigte im Gegensatz zum fehlenden RNA-Nachweis von GBV-B einen positiven Nachweis von GBV-A.

<b>92-A-6m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>Gewebe</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	12.07.1995			negativ	negativ	36
Inokulation mit Serum des Affen 90-A-4m (GBV-A und GBV-B positiv) am:	12.07.1995	0				
Blutabnahme am:	18.07.1995	6		<b>positiv</b> (10 <sup>5</sup> )	<b>positiv</b> (10 <sup>2</sup> )	29
	24.07.1995	12		<b>positiv</b> (10 <sup>5</sup> )	<b>positiv</b> (10 <sup>5</sup> )	33
	31.07.1995	19		<b>positiv</b> (10 <sup>6</sup> )	<b>positiv</b> (10 <sup>6</sup> )	159
Tod:	02.08.1995	21		<b>positiv</b> (10 <sup>6</sup> )	<b>positiv</b> (10 <sup>5</sup> )	458
Gewebeprobenentnahme:	02.08.1995		Leber	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	-
			Herz	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	-
			Niere	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	-
			Parotis	<b>positiv</b>	negativ	-
			Grosshirn	<b>positiv</b>	negativ	-
			Galle	negativ	<b>positiv</b>	-
Sonstige Materialien:	02.08.1995		Harn	<b>positiv</b>	negativ	-

### ***Überprüfung des GBV-A-Inokulum "93-C-2m" sowie Studien zur Kreuzimmunität***

Die Überprüfung des GBV-A-Inokulums "93-C-2m" auf eine 100 %ige Reinisolierung erfolgte durch Passagierung in zwei weitere bis dahin nicht infizierte Affen mit der Bezeichnung 93-A-7w (Tab.III.2) und 94-A-2m (Tab.III.3). Wurde nach Inokulation nur

RNA von GBV-A und nicht von GBV-B im Serum mittels RT-PCR nachgewiesen, konnte die Reinisolierung als erfolgreich betrachtet werden. Beide Affen wurden mit je 140 µl 1:100-verdünntem “93-C-2m”-Inokulum intravenös infiziert. Bis zum plötzlichen Tod am Tag 29 n.I. konnte beim Affen 93-A-7w bereits ab dem sechsten Tag GBV-A-RNA im Serum nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt war dabei ein Nachweis von GBV-B-RNA möglich. Die ALT-(Alanin-Aminotransferase) Werte blieben über den gesamten Zeitraum im Normalbereich und gaben somit keinen Hinweis auf eine Lebererkrankung und damit auf eine GBV-B-Infektion.

**Tab.III.2** GBV-A-Inokulation des Affen 93-A-7w zur Überprüfung der Reinheit des GBV-A-Inokulums “93-C-2m”.

<b>93-A-7w</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	17.07.1996	-	negativ	negativ	-
Inokulation mit 140 µl 1:100-verd. GBV-A Inokulum “93-C-2m”	07.01.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	13.01.1997	6	<b>positiv</b>	negativ	22
	20.01.1997	13	<b>positiv</b>	negativ	60
	27.01.1997	20	<b>positiv</b>	negativ	21
Tod am:	05.02.1997	29	<b>positiv</b> ( $10^5$ )	negativ	-

Für den Affen 94-A-2m (Tab.III.3) war ein ähnlicher Verlauf nach Inokulation mit “93-C-2m” zu beobachten. Mittels RT-PCR konnte in wöchentlich gewonnenen Seren über einen Zeitraum von ca. 33 Wochen jeweils RNA von GBV-A, nicht jedoch von GBV-B nachgewiesen werden. Der ALT-Spiegel lag im Durchschnitt bei einem Wert von 22 U/l. Die Daten beider “93-C-2m”-Inokulationsexperimente wiesen auf eine erfolgreiche Trennung des GB-Virus-A von GBV-B hin. GBV-B konnte in keinem der beiden Affen nach Inokulation mittels RT-PCR mehr nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung, ob eine bestehende GBV-A-Infektion vor einer Infektion mit GBV-B schützt, wurde der GBV-A positive Affen 94-A-2m mit 100 µl 1:100-verdünntem “GBP 1+2-Pool”, einem reinen GBV-B-Inokulum (vgl. Tab.III.7), inokuliert. In den wöchentlich mittels RT-PCR untersuchten Seren (Tag 7-30 nach GBV-B-Inokulation) konnte jetzt neben GBV-A (mit Titern bis zu  $10^4$ ) auch GBV-B (mit Titern bis zu  $10^3$ ) nachgewiesen werden (s. Tab.III.3).

Dies wies auf einen fehlenden Schutz vor einer Infektion mit GBV-B bei noch bestehender GBV-A-Infektion hin.

**Tab.III.3** GBV-A-Inokulation des Affen 94-A-2m und anschließendes Challenge mit GBV-B bei noch bestehender GBV-A-Infektion.

<b>94-A-2m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	17.07.1996	-	negativ	negativ	-
1. Inokulation mit 140 µl 1:100-verd. GBV-A-Inokulum "93-C-2m"	07.01.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	13.01.1997	6	<b>positiv</b>	negativ	20
	20.01.1997	13	<b>positiv</b>	negativ	27
	27.01.1997	20	<b>positiv</b>	negativ	27
	05.02.1997	29	<b>positiv</b>	negativ	22
	12.02.1997	36	<b>positiv</b>	negativ	16
	20.02.1997	44	<b>positiv</b>	negativ	15
	03.03.1997	55	<b>positiv</b>	negativ	20
	10.03.1997	62	<b>positiv</b>	negativ	27
	vom 17.03.1997	von 69	<b>positiv</b>	negativ	29
	bis 28.08.1997	bis 234	<b>positiv (10<sup>3</sup>)</b>	negativ	28
2. Inokulation mit 100 µl 1:100-verd. "GBP 1+2-Pool"	02.09.1997	239/0	-	-	-
Blutabnahme am:	09.09.1997	246/7	<b>positiv (10<sup>4</sup>)</b>	<b>positiv (10<sup>3</sup>)</b>	27
	16.09.1997	253/14	<b>positiv (10<sup>4</sup>)</b>	<b>positiv (10<sup>3</sup>)</b>	27
	23.09.1997	260/21	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	26
	29.09.1997	266/27	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	83
Tod am:	02.10.1997	269/30	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	162

Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise eine bereits abgelaufene GBV-A-Infektion Schutz vor einer Infektion mit GBV-B bietet, wurde der Affe 92-A-3m (Tab.III.4) mit 80 µl 1:100-verdünnter GBV-A positiver Serumprobe des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997 (s. Tab.III.2) inokuliert. RT-PCR-Untersuchungen zufolge war dieser n.I., mit Ausnahme zweier Proben (Tag 98 und 119), für die folgenden 19 Wochen GBV-A positiv. Ab Tag 147 konnte einschließlich der folgenden zwei Wochen keine GBV-A-RNA mehr nachgewiesen werden.

Zu keinem Zeitpunkt war ein RNA-Nachweis von GBV-B möglich, was als weiterer Beweis einer vollständigen Reinsolierung von GBV-A gewertet wurde.

Durch eine nachfolgende Inokulation des Affen 92-A-3m (vgl. Tab.III.4) mit 100 µl 1:100-verdünntem "GBP 1+2-Pool" (s. Tab.III.7) konnte folgendes gezeigt werden:

Auch eine bereits abgelaufene GBV-A-Infektion bietet keinen Schutz vor einer Infektion mit GBV-B. Alle nach der zweiten Inokulation auf GBV-A und GBV-B in der RT-PCR untersuchten Serumproben zeigten ein positives Ergebnis für GBV-B und ein fortbestehend negatives Ergebnis für GBV-A.

**Tab.III.4** GBV-A-Inokulation des Affen 92-A-3m und anschließendes Challenge mit GBV-B bei bereits abgelaufener GBV-A-Infektion.

<b>92-A-3m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	01.08.1996	-	negativ	negativ	15
1. Inokulation mit 80 µl 1:100-verd. Serum des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997	19.03.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	26.03.1997	7	<b>positiv</b>	negativ	32
	03.04.1997	15	<b>positiv</b>	negativ	33
	09.04.1997	21	<b>positiv</b>	negativ	46
	16.04.1997	28	<b>positiv</b>	negativ	45
	23.04.1997	35	<b>positiv</b>	negativ	101
	30.04.1997	42	<b>positiv</b>	negativ	53
	07.05.1997	49	<b>positiv</b>	negativ	46
	21.05.1997	63	<b>positiv</b>	negativ	74
	29.05.1997	71	<b>positiv</b>	negativ	82
	05.06.1997	78	<b>positiv</b>	negativ	48
	11.06.1997	84	<b>positiv</b>	negativ	39
	18.06.1997	91	<b>positiv</b>	negativ	46
	25.06.1997	98	negativ	negativ	21
	02.07.1997	105	<b>positiv</b>	negativ	46
	10.07.1997	113	<b>positiv</b>	negativ	46
	16.07.1997	119	negativ	negativ	89
	23.07.1997	126	<b>positiv</b>	negativ	55
	30.07.1997	133	<b>positiv</b>	negativ	47
	13.08.1997	147	negativ	negativ	45
	20.08.1997	154	negativ	negativ	33

	28.08.1997	162	negativ	negativ	38
2. Inokulation mit 100 µl 1:100-verdünntem GBV-B-Inokulum "GBP 1+2-Pool"	02.09.1997	167/0	-	-	-
Blutabnahme am:	09.09.1997	174/7	negativ	<b>positiv</b>	56
	16.09.1997	181/14	negativ	<b>positiv</b>	76
	23.09.1997	188/21	negativ	<b>positiv</b>	73
	29.09.1997	194/27	negativ	<b>positiv</b>	76
Tod am:	02.10.1997	197/30	negativ	<b>positiv</b>	132

Der Affe 90-A-4m (Tab.III.5) sollte, nach einer bereits abgelaufenen GBV-A- und GBV-B-Infektion, für ein Challenge-Experiment mit GBV-A zur Untersuchung der Immunität nach GBV-A-Reinfektion eingesetzt werden.

Von Tag 6 bis Tag 33 nach der ersten Inokulation konnte GBV-A und GBV-B im Serum mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Ab Tag 61 bis Tag 83 war nur noch RNA von GBV-B nachweisbar. Parallel konnten kontinuierlich ansteigende ALT-Werte (Maximum: 165 IU/l am Tag 47 n.I.) beobachtet werden. Serumproben ab Tag 111 n.I. waren einschließlich Tag 773 n.I. für GBV-A und GBV-B negativ. Ein "Challenge" mit GBV-A (1:100 verdünntes Serum des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997; vgl. Tab.III.2) am Tag 778 nach der ersten Inokulation konnte keine Reinfektion mit GBV-A bewirken. Alle RT-PCR-Untersuchungen für GBV-A blieben in den folgenden 6 Wochen blieben negativ.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß eine bereits abgelaufene GBV-A-Infektion vor einer Reinfektion mit GBV-A schützt. Die Infektiosität des Inokulums für GBV-A wurde in einem zuvor durchgeführten Challenge-Experiment mit einem GBV-A und GBV-B negativen Affen mit der Bezeichnung 92-A-3m unter Beweis gestellt (s. Tab.III.4).

**Tab.III.5** GBV-A- und GBV-B-Inokulation des Affen 90-A-4m und anschließendes Challenge mit GBV-A nach bereits abgelaufener GBV-A- und GBV-B-Infektion.

<b>90-A-4m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	01.07.1995	-	negativ	negativ	12
1. Inokulation mit 4 x 50 µl gepooltem Serum (GBV-A und GBV-B positiv) + 100 µl NaCl	12.07.1995	0	-	-	-

Blutabnahme am:	18.07.1995	6	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	27
	25.07.1995	13	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	60
	31.07.1995	19	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	68
	02.08.1995	21	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	81
	07.08.1995	26	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	92
	vom				
	14.08.1995	33	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	114
	bis				
	11.09.1995	61	negativ	<b>positiv</b>	163
	02.10.1995	83	negativ	<b>positiv</b>	32
	30.10.1995	111	negativ	negativ	24
	vom				
20.11.1995	132	negativ	negativ	27	
bis					
28.08.1997	773	negativ	negativ	44	
2. Inokulation mit 100 µl 1:100- verdünntem Serum des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997	02.09.1997	778/0	-	-	-
Blutabnahme am:	10.09.1997	786/8	negativ	negativ	49
	16.09.1997	792/14	negativ	negativ	40
	22.09.1997	798/20	negativ	negativ	36
	29.09.1997	805/27	negativ	negativ	78
	06.10.1997	812/34	negativ	negativ	99
	13.10.1997	819/41	negativ	negativ	64
	20.10.1997	826/48	negativ	negativ	67
	30.10.1997	836/58	negativ	negativ	76

## **1.2 Reinisolierung des GB-Virus-B und Studien zur Kreuzimmunität**

Wie erwähnt, waren die GB-Viren GBV-A und GBV-B bei Beginn dieser Arbeit nur gemeinsam passagierbar. Nach gelungener Reinisolierung von GBV-A sollte auch ein reines GBV-B-Inokulum durch mehrmalige Passage in Tamarinen gewonnen werden. Desweiteren sollten Challenge-Experimente mit GBV-A bzw. GBV-B eines bereits GBV-B infizierten Affen weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Kreuzimmunität von GBV-A und GBV-B liefern.

### ***Gewinnung der GBV-B-Inokula "378w" und "GBP 1+2-Pool" (vgl. Tab. III.6)***

Der Affe 378w wurde am 10.2.1987 mit dem "GB-Agens" inokuliert (vgl. Tab.III.7). Am 23.01., 20.02., 03.03., 06.03. und 19.03.1987 wurden je 1.5-2.0 ml Blut abgenommen und die

zugehörigen Seren mittels RT-PCR hinsichtlich einer Infektion mit GBV-A bzw. GBV-B untersucht. Alle Serumproben waren negativ für GBV-A und, mit Ausnahme der Serumprobe vom 23.01.1987, positiv für GBV-B. Das hieraus gewonnene GBV-B-Inokulum "378w" setzte sich aus den nur für GBV-B positiven Seren vom 06.03. und 19.03.1987 (im Verhältnis 1:1) zusammen. Unter der Annahme, mit dem Inokulum "378w" ein reines GBV-B-Inokulum gewonnen zu haben, wurde dieses in den Affen 86-B-5m (vgl. Tab.III.6 und Tab.III.7) passagiert. Ab Tag 20 n.I. konnte jedoch bis zum Tod des Affen mittels RT-PCR GBV-A-RNA nachgewiesen werden, was zeigte, daß mit dem Inokulum „378w“ doch noch keine vollkommene Trennung beider Viren erreicht wurde.

**Tab.III.6** Inokulation des Affen 86-B-5m mit "378w".

<b>86-B-5m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>GPT-Wert [U/l]</b>
Präserum vom:	18.07.1996		negativ	negativ	39
Inokulation mit Affenserum "378w" am:	08.08.1996	0			
Blutabnahme am:	13.08.1996	5	negativ	<b>positiv</b>	74
	19.08.1996	11	negativ	<b>positiv</b>	46
	26.08.1996	18	negativ	<b>positiv</b>	86
	28.08.1996	20	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	118
Tod am:	30.08.1996	22	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	-

Um letztendlich doch noch ein reines GBV-B-Inokulum zu gewinnen, wurde das Inokulum "86-B-5m" (Serum des Affen 86-B-5m vom Tag 11 n.I.; nur GBV-B positiv) am 25.11.1996 in die Affen 94-B-5m und 88-B-8m (vgl. Tab.III.7) passagiert. Die nach Inokulation durchgeführten RT-PCR-Untersuchungen der Seren vom 13.12.1996 und 20.12.1996 zeigten, daß sowohl der Affe 94-B-5m als auch der Affe 88-B-8m negativ für GBV-A und positiv für GBV-B waren. Somit wurde ein reines GBV-B-Inokulum namens "GBP1+2-Pool" aus Seren der Affen 94-B-5m und 88-B-8m vom 13.12.1996 (im Verhältnis 1:1) gewonnen.



**Tab.III.7** Zeitlicher Ablauf der Reinisolierung des GB-Virus-B und Gewinnung einzelner GBV-B Inokula.

Inokulierter Affe	Datum der Inokulation	Inokulum	GBV-A-PCR des Inokulums	GBV-B PCR des Inokulums	Name des gewonnenen Inokulums
378 w	10.02.1987	“GB-Agens”	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>“378w”</b> (Pool der Seren vom 19.03. und 06.09.1987)
86-B-5m	08.08.1996	“378w”	negativ	<b>positiv</b>	<b>“86-B-5m”</b> (Serum vom 19.08.1996)
94-B-5m	25.11.1996	“86-B-5m”	negativ	<b>positiv</b>	<b>“GBP 1+2 Pool”</b> (Serumpool der Affen 94-B-5m und 88-B-8m vom 13.12.1996 im Verhältnis 1:1)
88-B-8m	25.11.1996	“86-B-5m”	negativ	<b>positiv</b>	

### ***Überprüfung der Reinisolierung von GBV-B sowie Studien zur Kreuzimmunität***

Zur Gewährleistung einer 100 %igen Reinisolierung von GBV-B und zur Durchführung von Challenge-Experimenten mit GBV-A bzw. GBV-B wurden die Affen 83-B-3w, 87-A-4m und 91-A-1m mit je 70 µl unverdünntem bzw. 80 µl 1:1-verdünntem “GBP 1+2-Pool” inokuliert. Der Affe 83-B-3w (Tab.III.8) wurde, nachdem bis zum Tag 20 n.I. der Nachweis von GBV-B in der RT-PCR negativ ausfiel, am Tag 29 nochmals mit 70 µl “GBP 1+2-Pool” inokuliert. Am Tag 14 nach der 2. Inokulation (= Tag 43 nach 1. Inokulation) konnte erstmals GBV-B-RNA nachgewiesen werden. Zur Gewinnung eines GBV-B-Infektiositätspools wurde dieser Affe am Tag 29 nach der zweiten Inokulation getötet.

**Tab.III.8** GBV-B-Inokulation des Affen 83-B-3w und anschließende Gewinnung eines GBV-B-Infektiositätspools.

<b>83-B-3w</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	23.07.1996	-	negativ	negativ	21
1. Inokulation mit 70 µl unverd. “GBP 1+2-Pool”	07.01.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	13.01.1997	6	negativ	negativ	32
	20.01.1997	13	negativ	negativ	22
	27.01.1997	20	negativ	negativ	20
2. Inokulation mit 70 µl unverd. “GBP 1+2-Pool”	05.02.1997	29/0	-	-	-

Blutabnahme am:	12.02.1997	36/7	negativ	negativ	18
	19.02.1997	43/14	negativ	<b>positiv</b>	21
	24.02.1997	48/19	negativ	<b>positiv</b>	22
	03.03.1997	56/27	negativ	<b>positiv</b>	24
Tod und Ausblutung am:	05.03.1997	58/29	negativ	<b>positiv</b>	44

Der Affe mit der Bezeichnung 87-A-4m (Tab.III.9) wurde mit 80 µl 1:1-verdünntem “GBP 1+2-Pool” (s. Tab.III.7) inokuliert. Dieser Affe war anschließend über einen Zeitraum von insgesamt 9 Wochen in der RT-PCR nur für GBV-B positiv (Tag 7 bis Tag 71 n.I.). In den folgenden 12 Wochen (Tag 78 bis Tag 162) war GBV-B nicht mehr nachweisbar.

Zur Untersuchung der Kreuzimmunität von GBV-B gegenüber GBV-A nach einer bereits abgelaufenen GBV-B-Infektion wurde am Tag 167 ein Challenge mit GBV-A durchgeführt. Hierzu wurden 100 µl 1:100-verdünntes Serum des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997 (s. Tab.III.2) dem Affen 87-A-4m inokuliert (vgl. Tab.III.9). RT-PCR-Untersuchungen wöchentlich abgenommener Blutproben ergaben ab Tag 34 nach der 2. Inokulation einen kontinuierlichen Nachweis von GBV-A. GBV-B-RNA war wie schon vor der Inokulation mit GBV-A nicht mehr nachweisbar.

Hieraus wurde gefolgert, daß eine bereits abgelaufene GBV-B-Infektion keinen Schutz vor einer Infektion mit GBV-A bietet. Eine Kreuzimmunität zwischen GBV-A und GBV-B konnte somit ausgeschlossen werden.

**Tab.III.9** GBV-B-Inokulation des Affen 87-A-4m und anschließendes Challenge mit GBV-A nach einer bereits abgelaufenen GBV-B-Infektion.

<b>87-A-4m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	08.07.1996	-	negativ	negativ	16
1. Inokulation mit 80 µl 1:1-verd. “GBP 1+2-Pool”	19.03.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	26.03.1997	7	negativ	<b>positiv</b>	141
	03.04.1997	15	negativ	<b>positiv</b>	72
	09.04.1997	21	negativ	<b>positiv</b>	82
	16.04.1997	28	negativ	<b>positiv</b>	72
	23.04.1997	35	negativ	<b>positiv</b>	183
	30.04.1997	42	negativ	<b>positiv</b>	161
	07.05.1997	49	negativ	<b>positiv</b>	129

	21.05.1997	63	negativ	<b>positiv</b>	175
	29.05.1997	71	negativ	<b>positiv</b>	124
	05.06.1997	78	negativ	negativ	114
	11.06.1997	84	negativ	negativ	152
	18.06.1997	91	negativ	negativ	45
	vom	von			
	24.06.1997	97	negativ	negativ	24
	bis	bis			
	28.08.1997	162	negativ	negativ	27
2. Inokulation mit 100 µl 1:100-verd. Serum des Affen 93-A-7w vom 20.01.1997	02.09.1997	167/0	-	-	-
Blutabnahme am:	10.09.1997	175/8	negativ	negativ	27
	16.09.1997	181/14	<b>positiv</b>	negativ	23
	22.09.1997	187/20	negativ	negativ	43
	29.09.1997	194/27	negativ	negativ	20
	06.10.1997	201/34	<b>positiv</b>	negativ	34
	13.10.1997	208/41	<b>positiv</b>	negativ	25
Tod am:	20.10.1997	215/48	<b>positiv</b>	negativ	24

Der Affe 91-A-1m (Tab.III.10) sollte, nach einer bereits abgelaufenen GBV-B-Infektion, für ein Challenge-Experiment mit GBV-B zur Untersuchung des Schutzes in Hinsicht auf eine Reinfektion mit GBV-B eingesetzt werden. Von Tag 6 bis Tag 62 nach der ersten Inokulation konnte GBV-B-RNA im Serum mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Gleichzeitig stiegen die ALT-Werte kontinuierlich bis auf Werte von 167 IU/l an. Serumproben ab Tag 69 n.I. waren einschließlich Tag 232 für GBV-B negativ. Zu keinem Zeitpunkt konnte GBV-A im Serum nachgewiesen werden, d.h. die Reinsolierung von GBV-B war gelungen. Durch Challenge mit GBV-B am Tag 237 (mit "GBP 1+2 Pool") konnte keine Reinfektion mit GBV-B bewirkt werden, was sich in negativen Ergebnissen der GBV-B-PCR in den folgenden drei Wochen widerspiegelte. Die Infektiosität des Inokulums für GBV-B wurde in dem gleichzeitig durchgeführten Challenge-Experiment mit einem GBV-A infizierten Affen unter Beweis gestellt (s. Tab.III.4).

Insgesamt betrachtet konnte gezeigt werden, daß eine bereits abgelaufene GBV-B-Infektion vor einer Reinfektion mit GBV-B schützt.

**Tab.III.10** GBV-B-Inokulation des Affen 91-A-1m und anschließendes Challenge mit GBV-B nach einer bereits abgelaufenen GBV-B-Infektion.

<b>91-A-1m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	23.07.1996	-	negativ	negativ	14
1. Inokulation mit 70 µl unverd. "GBP 1+2-Pool"	07.01.1997	0	-	-	-
Blutabnahme am:	13.01.1997	6	negativ	<b>positiv</b>	48
	20.01.1997	13	negativ	<b>positiv</b>	22
	27.01.1997	20	negativ	<b>positiv</b>	18
	05.02.1997	29	negativ	<b>positiv</b>	60
	12.02.1997	36	negativ	<b>positiv</b>	63
	20.02.1997	44	negativ	<b>positiv</b>	70
	03.03.1997	55	negativ	<b>positiv</b>	108
	10.03.1997	62	negativ	<b>positiv</b>	143
	17.03.1997	69	negativ	negativ	167
	vom	von			
24.03.1997	76	negativ	negativ	27	
bis	bis				
28.08.1997	232	negativ	negativ	35	
2. Inokulation mit 70 µl 1:100-verd. "GBP 1+2-Pool"	02.09.1997	237/0	-	-	-
Blutabnahme am:	09.09.1997	244/7	negativ	negativ	30
	16.09.1997	251/14	negativ	negativ	21
	23.09.1997	258/21	negativ	negativ	18
	29.09.1997	264/27	negativ	negativ	35
Tod am:	02.10.1997	267/30	negativ	negativ	29

**Zusammenfassung “Reinisolierung und Kreuzimmunität von GBV-A und GBV-B”**

Nach gelungener Reinisolierung der bis dahin nur gemeinsam passagierten GB-Viren GBV-A und GBV-B ergaben Challenge-Experimente folgende Ergebnisse:

Weder eine bestehende noch bereits abgelaufene GBV-A- bzw. GBV-B-Infektion bietet Schutz vor einer Infektion mit dem anderen Affenvirus, d.h. es besteht keine Kreuzimmunität zwischen beiden Viren. Eine bereits abgelaufenen GBV-A- bzw. GBV-B-Infektion schützt jedoch vor einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger, wodurch auf eine Immunität gegenüber dem gleichen Erreger geschlossen werden kann. Eine Erhöhung der Transaminasen mit GPT-Werten  $> 100$  IU/L wurde allein durch eine Infektion mit dem GB-Virus-B ausgelöst. Nur GBV-B, aber nicht GBV-A, scheint deshalb im Krallenaffen eine Hepatitis auslösen zu können.

**2. Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A und GB-Virus-B****2.1 Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A**

Wie erwähnt, konnte für GBV-A kein Hepatotropismus nachgewiesen werden, genausowenig wie eine Assoziation mit anderweitigen Krankheitsbildern. Durch die Bestimmung des Replikationsortes von GBV-A erhoffte man sich Hinweise hinsichtlich einer Klärung der Pathologie einer GBV-A-Infektion. Anfängliche Versuche, den Replikationsort von GBV-A bzw. GBV-B mittels RT-PCR durch die Bestimmung des Plusstrang- und Minusstrang-RNA-Titers in den einzelnen Geweben zu ermitteln (vgl. Tab.III.11), schlugen aufgrund der Blutkontamination der Organe fehl. So wurden zwar prinzipiell Unterschiede bis zu zwei Zehnerpotenzen in bestimmten Organen festgestellt, jedoch war damit keine eindeutige Aussage möglich, da alle in die Untersuchung einbezogenen Organe betroffen waren.

**Tab.III.11** RT-PCR-Nachweis von GBV-B-Plusstrang- und Minusstrang-RNA in einzelnen Gewebeproben.

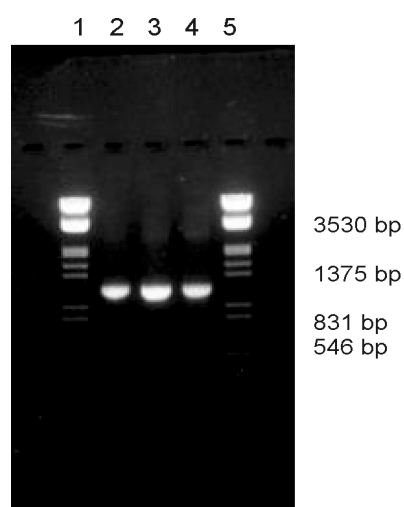
<b>86-B-5m</b>	<b>Gewebe</b>	<b>GBV-B PCR</b>	
		<u>GBV-B + Strang</u>	<u>GBV-B – Strang</u>
	Leber	<b>positiv</b> ( $10^6$ )	<b>positiv</b> ( $10^5$ )
	Niere	<b>positiv</b> ( $10^2$ )	<b>positiv</b> ( $10^3$ )
	Milz	<b>positiv</b> ( $10^3$ )	<b>positiv</b> ( $10^1$ )
	Herz	<b>positiv</b> ( $10^4$ )	<b>positiv</b> ( $10^3$ )

In dieser Arbeit wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung gewählt. Mit Hilfe spezifischer nichtradioaktiv-markierter RNA-Sonden sollte ein Nachweis des RNA-Sense- (Genom-Form) und RNA-Antisense-Stranges (replikative Form) und somit des Replikationsortes von GBV-A möglich sein.

### **2.1.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde**

#### *Gewinnung eines spezifischen GBV-A DNA-Fragments: Extraktion, Reverse Transkription und PCR*

RNA des GB-Virus-A wurde aus Serum und Lebergewebe (vom 02.08.1995) des GBV-A und GBV-B infizierten Krallenaffen 92-A-6m (s. Tab.III.1) isoliert (Kap.II, B.3.1) und spezifisch mit MMLV reverser Transkriptase und einem 2.5 molaren Überschuß (50 pmol je Ansatz anstatt 20 pmol) des Primers GBA-3a (Kap.II, A.3.2.2) in cDNA umgeschrieben (vgl. Kap.II, B.3.5). Anhand der veröffentlichten Sequenz von GBV-A (Genbankzutritt U2203) wurden die Primer GBA-1s, GBA-2s, GBA-3a und GBA-4a designiert (Kap.II, A.3.2.2). Diese ermöglichten die selektive Amplifikation des E2-Strukturgens von GBV-A. Die nested PCR (vgl. Kap.II, B.7.1/B.7.3) wurde sowohl mit cDNA aus Serum als auch mit cDNA aus dem Leberextrakt durchgeführt und ergab nach Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.1) je eine einzelne Bande mit der erwarteten Größe von 1160 bp (s. Abb.III.1). Für die Überprüfung der DNA-Sequenz und die anschließende Ligation mußten die DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung (Kap.II, B.5.2) aus dem Gel isoliert werden (Kap.II, B.6). Dabei ergab sich eine DNA-Konzentration von ca. 50 ng/µl (vgl. Abb.III.1).



**Abb.III.1**

1160 bp DNA-Fragment nach selektiver Amplifikation (Primer GBA-1s und GBA-3a/GBA-2s und GBA-4a) des E2-Strukturgens von GBV-A und anschließender Gelextraktion.

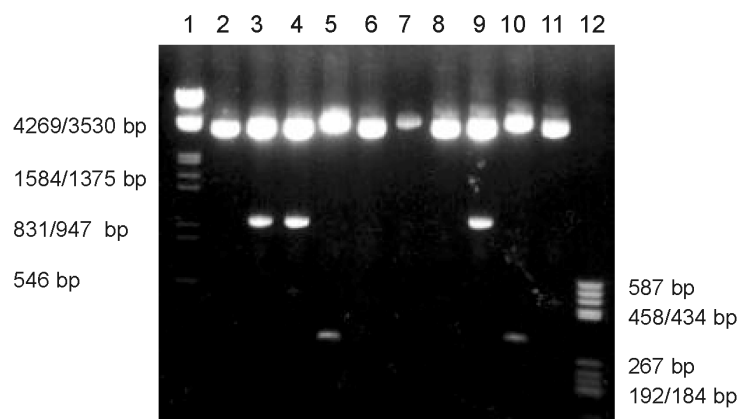
Spur 1 und 5: DNA-MG-Marker III; Spur 2 und 3: PCR-Produkt nach Extraktion der Nukleinsäure aus Serum; Spur 4: PCR-Produkt nach Extraktion der Nukleinsäure aus Leber.

### *Sequenzierung*

Nach Sequenzierung (s. Kap.II, B.9) der DNA-Fragmente unter Verwendung des Sense- (GBA-2s) bzw. Antisense-Primers (GBA-4a) stellte sich heraus, daß die gefundenen Sequenzen nicht 100 %ig mit der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten. So traten insbesondere bei den nach Serumextraktion gewonnenen DNA-Fragmenten im Vergleich zu dem aus Lebergewebe gewonnenen DNA-Fragment vermehrt Punktmutationen auf, die jedoch alle stumm waren und somit keinen Einfluß auf das Leseraster und die Aminosäuresequenz hatten. Die weitere Sondenpräparation (s.u.) erfolgte dennoch nur mit dem weniger mutierten DNA-Fragment aus dem Leberextrakt (vgl. Abb.III.1; Spur 4).

### *Klonierung des Strukturgens E2: Ligation, Transformation und Restriktionsanalyse*

Durch Ligation (Kap.II, B.4.3) des E2-DNA-Fragments mit dem 3.9 kb Vektor "pCR®II", der sowohl einen Promotor für die Sp6- als auch die T7-Polymerase enthält (vgl. Anhang), wurde die parallele Herstellung von Sense- und Antisense-RNA-Sonde ermöglicht. Nach der Transformation in kompetente INV $\alpha$ F' *E.coli*-Zellen (Kap.II, B.8.2) wurden Restriktionsanalysen und Sequenzierungen zur Überprüfung der Insertion und der Orientierung des Inserts durchgeführt. Hierzu wurde nach ÜN-Kultur der entsprechenden Bakterien die Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format isoliert (s. Kap.II, B.2.1). EcoRI-Restriktionsanalysen ergaben eine Ausbeute von 50 % an Insert enthaltenden Plasmiden. Eine Bestimmung der Insert-Orientierung mittels EcoRI-Analyse war jedoch nicht möglich, da sowohl bei Sense- als auch Antisense-Orientierung Fragmente gleicher Größe entstanden wären. Durch Restriktion mit den Endonukleasen SmaI und HindIII und Sequenzierung mit dem "T7 Promotor Primer" bzw. "M13 Reverse Primer" (Kap.II, A.3.2.1) konnten zwei Klone mit richtiger Orientierung des Inserts bestimmt werden (vgl. Abb.III.2). Die anschließende Plasmidisolierung beider Klone auf Midi-Präp-Format (Kap.II, B.2.2) ergab nach Messung (Kap.II, B.3.4) Plasmidkonzentrationen von 0.473  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Klon 1) und 0.284  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Klon 2).

**Abb.III.2**

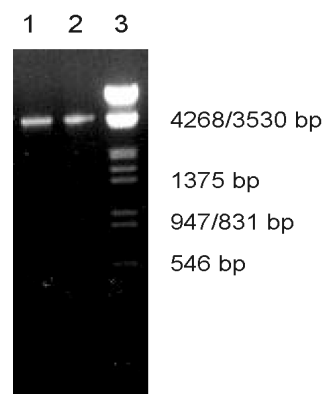
SmaI/HindIII-Restriktionsanalyse einzelner Klone.

Fünf der 10 untersuchten Klone zeigten eine Insertion des 1160 bp-DNA-Fragmentes; davon enthielten wiederum nur zwei das Insert in Sense-Orientierung (Spur 5 und 10).

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2-11: Restriktion einzelner Klone mit SmaI/HindIII; Spur 12: DNA-MG-Marker V.

### *Herstellung der Template-DNA und Digoxigenin-Markierung durch in vitro-Transkription*

Nach Linearisierung des Plasmids mit der Endonuklease EcoRV (Herstellung der Template-DNA für die Sense-Sonde) bzw. KpnI (Herstellung der Template-DNA für die Antisense-Sonde), sowie präparativer Agarosegel-Elektrophorese, Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung der Template-DNA (Kap.II, B.26.1), konnte für die EcoRV- und KpnI-linearisierte DNA eine Konzentration von ca. 0.125 µg/µl bestimmt werden (vgl. Abb.III.3).

**Abb.III.3**

Konzentrationsbestimmung der Template-DNA nach Linearisierung der Plasmid-DNA mit EcoRV bzw. KpnI.

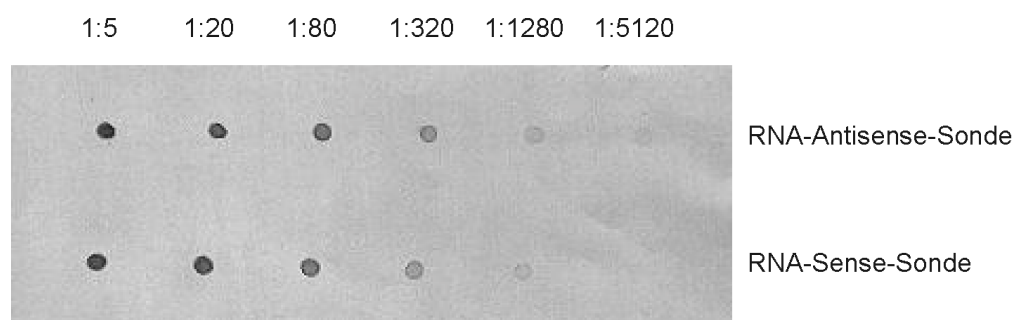
Spur 1: KpnI-linearisierte Template-DNA; Spur 2: EcoRV-linearisierte Template-DNA; Spur 3: DNA-MG-Marker III.

Die Markierung der linearisierten Template-DNA mit Digoxigenin (DIG) erfolgte durch *in vitro*-Transkription mit Sp6- bzw. T7-RNA-Polymerase (Kap.II, B.26.2). Nach Abstoppen der Transkriptionsreaktion wurde die DIG-markierte RNA gefällt (Kap.II, B.26.2) und aufgereinigt (s. Kap.II, B.26.3).

### *Konzentration der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden*

Dot-Blot Untersuchungen der Sense- und Antisense-RNA-Sonde für GBV-A ohne direkten Vergleich zu einer DIG-markierten Kontroll-RNA (vgl. Kap.II, B.26.4) zeigten eine erfolgreiche DIG-Markierung beider RNA-Sonden (vgl. Abb.III.4).





**Abb.III.4** Dot Blot der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde des GB-Virus-A (Sondenverdünnung wie angegeben).

Desweiteren konnte der Konzentrationsbereich bestimmt werden, der ein optimales und reproduzierbares *in situ*-Hybridisierungssignal ergab (s. Tab.III.12).

Eine exaktere Konzentrationsbestimmung war durch den direkten Intensitätsvergleich der Probe mit einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Ausgangskonzentration 100 ng/μl) in einem zweiten Dot-Blot möglich (Dot Blot nicht gezeigt). Die Sondenverdünnung von 1:80 wurde dabei einer Endkonzentration von ca. 25 pg/μl und die von 1:320 einer Endkonzentration von ca. 100 pg/μl zugeordnet (vgl. Tab.III.12).

**Tab.III.12** Optimale Endverdünnung der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde von GBV-A gemäß Dot-Blot.

<u>GBV-A</u>	<u>RNA-Sense-Sonde</u>	<u>RNA-Antisense-Sonde</u>
Abgeschätzte optimale Endverdünnung gemäß Dot Blot ohne Kontroll-RNA	1:80 - 1:320	1:80 - 1:320
Konzentration der DIG-markierten-RNA aus direktem Vergleich mit einer Kontroll-RNA	25 pg/μl - 100 pg/μl	25 pg/μl - 100 pg/μl

### **2.1.2 Gewinnung der Gewebeproben**

Die Gewebeproben (s. Kap.II, A.8.2) für die Untersuchung des Replikationsortes von GBV-A stammten aus den Krallenaffen (*Sanguinus fuscicollis*) 82-E-1m (s. Tab.III.13) und 87-A-4m (vgl. Tab.III.9). Beide Affen waren zum Zeitpunkt ihres Todes gemäß RT-PCR-Untersuchung (Primer und Durchführung der PCR s. Kap.II, A.8.2) des Serums für GBV-B negativ und GBV-A positiv. Jedoch zeigte der Affe 82-E-1m aufgrund der andersweitigen Inokulation einen vom Infektionsverlauf des Affen 87-A-4m abweichenden Verlauf.

Der Affe 82-E-1m war anfangs, nach Inokulation mit GBV-A/GBV-B-positivem Serum des Affen 90-A-4m (vgl. Tab.III.5), für beide Viren in der RT-PCR positiv. Am Tag 46 n. I. wurde aufgrund der akuten GBV-B-Infektion ein ALT-Maximum von 126 U/l verzeichnet.

Ab Tag 88 n.I. wurde dann ein kontinuierlicher Abfall der ALT-Werte festgestellt und eine am Tag 200 n.I. durchgeführte RT-PCR zeigte, daß der Affe für GBV-B, nicht jedoch für GBV-A negativ geworden war. Bis zu seinem Tod und damit dem Zeitpunkt der Gewebeentnahme am Tag 279 n.I. blieb der Affe chronisch GBV-A infiziert.

**Tab.III.13** Infektionsverlauf des Krallenaffen 82-E-1m nach Inokulation mit GBV-A/GBV-B positivem Serum des Affen 90-A-4m.

<b>82-E-1m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	23.07.1996		negativ	negativ	26
Inokulation mit Serum des Affen 90-A-4m vom 11.09.1995 am:	08.08.1996	0			
Blutabnahme am:	13.08.1996	5	negativ	negativ	15
	19.08.1996	11	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	32
	26.08.1996	18	negativ	<b>positiv</b>	30
	02.09.1996	25	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	18
	11.09.1996	34	nicht getestet	nicht getestet	41
	17.09.1996	40	nicht getestet	nicht getestet	90
	23.09.1996	46	nicht getestet	nicht getestet	126
	30.09.1996	53	nicht getestet	nicht getestet	99
	07.10.1996	60	nicht getestet	nicht getestet	72
	14.10.1996	67	nicht getestet	nicht getestet	69
	21.10.1996	74	nicht getestet	nicht getestet	70
	28.10.1996	81	nicht getestet	nicht getestet	102
	04.11.1996	88	nicht getestet	nicht getestet	61
	13.11.1996	97	nicht getestet	nicht getestet	35
	30.12.1996	144	nicht getestet	nicht getestet	-
	27.01.1997	172	nicht getestet	nicht getestet	20
24.02.1997	200	<b>positiv</b>	negativ	16	
Tod und Gewebeprobeentnahme am:	14.05.1997	279	<b>positiv</b>	negativ	17

Im Gegensatz zur einmaligen und gleichzeitigen Inokulation beider GB-Viren beim Affen 82-E-1m wurde der Affe 87-A-4m (vgl. Tab.III.9) zuerst nur mit "GPB 1+2-Pool" (s. Tab.III.7) inokuliert und zeigte, wie schon der Affe 82-E-1m, den für eine GBV-B-Infektion typischen Anstieg des ALT-Spiegels (Maxima zwischen Tag 35 und 63 n.I.). Ab Tag 78 einschließlich Tag 162 n.I. konnte in der RT-PCR RNA von GBV-B nicht mehr nachgewiesen werden. Ca. 13 Wochen nach erstmals negativer RT-PCR für GBV-B wurde der Affe

87-A-4m in einer zweiten Inokulation mit Serum des Affen 93-A-7w (vgl. Tab.III.2) infiziert. Bereits am Tag 14 nach der 2. Inokulation konnte GBV-A in der RT-PCR nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Gewebeprobenentnahme ca. 7 Wochen nach der zweiten Inokulation konnte nach wie vor nur RNA von GBV-A nachgewiesen werden.

Die als Negativkontrolle für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzten Gewebe stammten aus dem Affen 90-D-2m (s. Tab.III.14). Dieser Affe wurde zu keinem Zeitpunkt mit GB-Virus infiziert. Bei seinem Tod konnte, wie auch schon vorherige RT-PCR-Untersuchungen zeigten, keine RNA von GBV-A oder GBV-B nachgewiesen werden.

**Tab.III.14** Negativkontroll-Affe 90-D-2m der *in situ*-Hybridisierung.

90-D-2m (Negativaffe)	Datum	GBV-A PCR	GBV-B PCR	ALT-Wert [IU/l]
<b>Keine Inokulation mit GB-Virus</b>				
Blutabnahme am:	17.03.1997	negativ	negativ	42
	26.03.1997	negativ	negativ	55
Tod und Gewebeprobenentnahme am:	14.05.1997	negativ	negativ	58

Alle Gewebeproben wurden, wie unter Kap.II, B.27 beschrieben, für die *in situ*-Hybridisierung präpariert.

### **2.1.3 Der Replikationsort von GBV-A**

Nach Herstellung der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde von GBV-A und der Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes (s.o.) mußte als erstes sowohl die in Abhängigkeit von der Sondenlänge optimale Temperatur als auch die, schon zuvor im Dot-Blot auf einen bestimmten Bereich eingegrenzte (vgl. Tab.III.12) optimale Sondenverdünnung und damit Sondenkonzentration für die *in situ*-Hybridisierung definiert werden. Dabei wurden, unter Verwendung von RNA-Antisense-Sonde und Gehirnschnitten<sup>(1)</sup> aus dem Bereich 1-4 (vgl. Abb.III.5) des Affen 82-E-1m (Tab.III.13) und 90-D-2m (Tab.III.14), Verdünnungsstufen von 1:100, 1:250, 1:300 und 1:400, sowie Temperaturen von 48°C, 55°C, 65°C und 75°C für die in Kap.II.B.28 beschriebene *in situ*-Hybridisierung ausgetestet.

<sup>(1)</sup> Gewebeschnitte aus dem Gehirn wurden aus folgendem Grund gewählt: aufgrund schon früher erfolgter PCR-Untersuchungen verschiedener Gewebeproben bezüglich RNA von GBV-A (Kekulé, persönliche Mitteilung) wurde festgestellt, daß GBV-A v.a. im Gehirn mit sehr hohen Titern nachgewiesen werden kann.

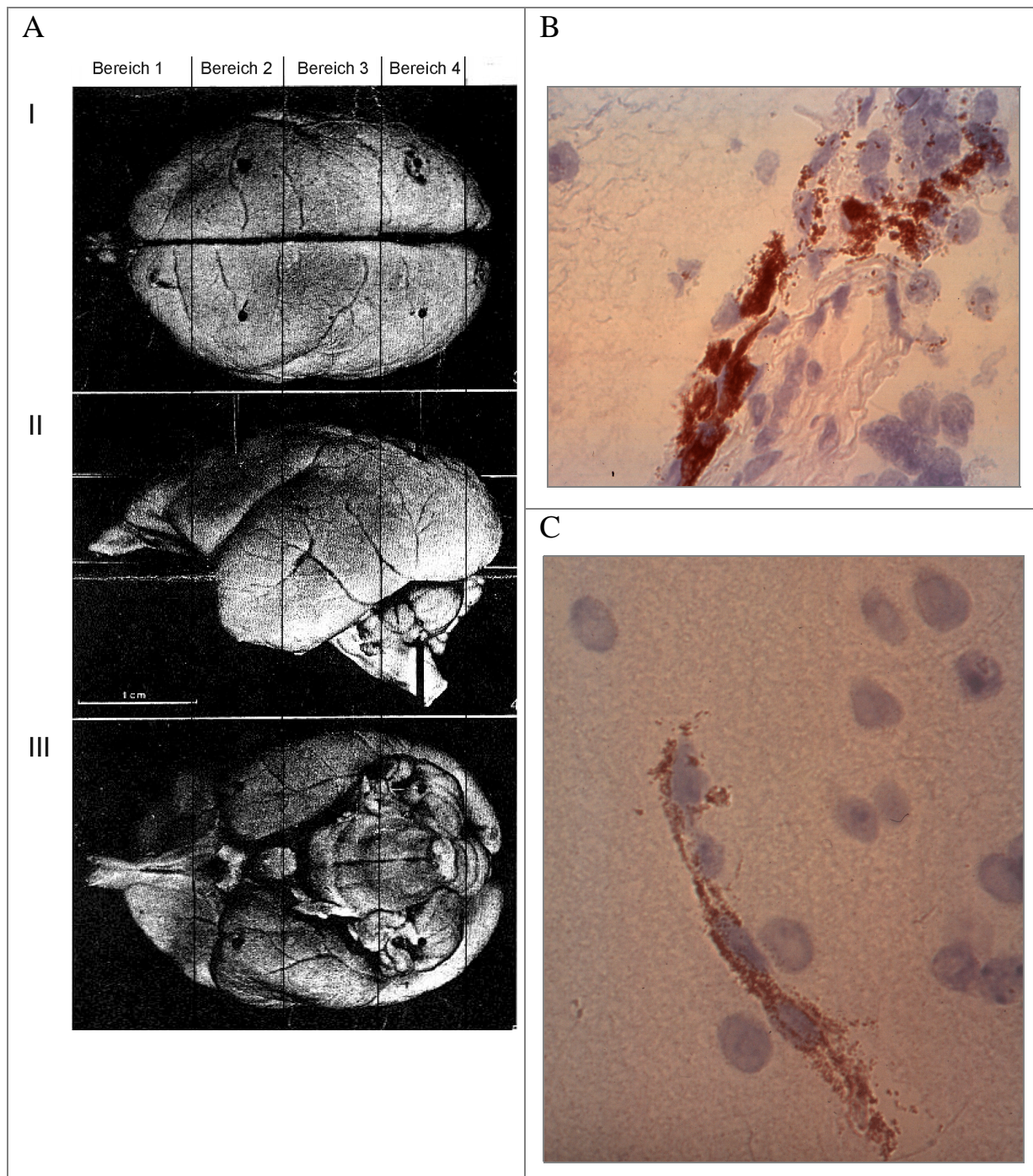
Als Ergebnis wurden zweierlei Dinge verzeichnet: erstens der Nachweis eines Hybridisierungssignals im Gehirn des Affen 82-E-1m, genauer im Gehirnschnitt aus dem zweiten Bereich (vgl. Abb.III.5), sowie prinzipiell die Erzeugung eines optimalen Hybridisierungssignals bei einer Sondenverdünnung von 1:300 und einer Temperatur von 55°C. Sämtliche Gehirnschnitte des Affen 90-D-2m zeigten kein Hybridisierungssignal, d.h. die als Negativkontrolle eingesetzten Gewebe waren negativ.

Nach Festlegen dieser Parameter wurden weitere Gewebeschnitte aus den Gehirnbereichen 1-4, sowie Schnitte von Milz, Leber, Niere, Lymphknoten, Nebenniere, Muskel und Herz des Affen 82-E-1m und 90-D-2m unter Verwendung von Sense- und Antisense-RNA-Sonde mittels *in situ*-Hybridisierung (Kap.II.B.28) untersucht. Weitere Gehirnschnitte (aus dem zweiten Bereich) des Affen 82-E-1m dienten dabei als Positivkontrolle der *in situ*-Hybridisierung. Als Negativkontrollen wurden neben entsprechenden Gewebeschnitten des Negativaffen 90-D-2m zusätzlich Schnitte des Positivaffen 82-E-1m eingesetzt. Der Unterschied bestand darin, daß der für die Schnitte des Affen 82-E-1m verwendete Hybridisierungsmix anstelle der üblichen Sense- bzw. Antisense-Sonde nun Wasser enthielt. Diese Proben wurden als "MoS" (Hybridisierungsmix ohne Sonde)-Kontrollen bezeichnet. Mit dieser *in situ*-Hybridisierung wurden folgende Resultate erzielt:

- a. Die Bestätigung des in der ersten *in situ*-Hybridisierung nachgewiesenen positiven Signals im "Gehirnbereich-2" des Affen 82-E-1m (s. Abb.III.5) mit der Antisense- und jetzt zusätzlich eingesetzten Sense-Sonde von GBV-A.
- b. Kein Nachweis eines Signals im "Gehirnbereich-2" des Affen 82-E-1m bei fehlender Sense- bzw. Antisense-Sonde im Hybridisierungsmix jedoch unter sonstigen gleichen Bedingungen (sogenannte MoS-Kontrolle), d.h. das zuvor detektierte Signal konnte somit als spezifisch betrachtet werden.
- c. In sämtlichen anderen Gewebeschnitten, wie Milz, Niere, Lymphknoten, Nebenniere, Muskel, Herz, Gehirnbereich-1, -3 sowie -4 und auch Leber des Affen 82-E-1m konnte weder mit der Sense- noch der Antisense-Sonde von GBV-A ein Hybridisierungssignal nachgewiesen werden.
- d. Zusätzlich waren alle Gewebeschnitte des Affen 90-D-2m (Tab.III.14) sowohl für den Sense- als auch den Antisense-RNA-Strang in der *in situ*-Hybridisierung negativ.

Nach dem Ergebnis, daß GBV-A höchstwahrscheinlich im Gehirn repliziert, wurden die Organe, insbesondere das Gehirn, eines weiteren GBV-A positiven Affen namens 87-A-4m (vgl. Tab.III.9) mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Dabei fanden wiederum Schnitte aus

dem zweiten Gehirnbereich des Affen 82-E-1m als Positivkontrolle Verwendung. Als Negativkontrollen wurden, wie schon zuvor, entsprechende Gewebeschnitte des Affen 90-D-2m, sowie sogenannte MoS-Kontrollen des Affen 87-A-4m mitgeführt. Durch den Nachweis eines Hybridisierungssignals mit der Sense- und Antisense-Sonde im zweiten Gehirnbereich des bis dahin noch nicht in die Untersuchungen einbezogenen Affen 87-A-4m konnte das Gehirn mit größter Sicherheit als Replikationsort von GBV-A bestimmt werden. Alle anderen Organe des Affen 87-A-4m zeigten, wie schon zuvor beim Affen 82-E-1m, keine Hybridisierung mit der Sense- bzw. Antisense-RNA-Sonde. Sämtliche mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen zeigten das korrekte Ergebnis.



**Abb.III.5** Das Gehirn als Replikationsort des GB-Virus-A.

**A** Unterteilung des Gehirns in die Bereiche 1-4. **I** Dorsal, **II** Linke Seite, **III** Ventral. **B und C** Nachweis der GBV-A-RNA in Paraffin-eingebettetem Gehirngewebe des Krallenaffen 82-E-1m mit Hilfe der Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde (Signal: braune Färbung; Schnitt: Gegenfärbung mit Hämalaun).

### Zusammenfassung “Replikationsort des GB-Virus-A”

GBV-A repliziert im Gehirn. Das Hybridisierungssignal konnte dabei bei beiden untersuchten Affen auf einen bestimmten Bereich im Gehirn eingegrenzt werden, der vermutlich der *Plexus chorioideus* ist.

## **2.2 Bestimmung des Replikationsortes des GBV-B**

Im Gegensatz zu GBV-A konnte GBV-B in verschiedenen Studien (Schlauder *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995) als kausales Agens der GB-Hepatitis der Tamarine nachgewiesen werden. So entwickelten Krallenaffen aufgrund einer Infektion mit GBV-B eine klinisch, laborchemisch und histologisch dokumentierte Hepatitis, was sich u.a. in erhöhten Leberenzymwerten (ALT-Wert) und einer Bilirubinerhöhung widerspiegelte. Wie erwähnt, waren anfängliche Versuche, den Replikationsort mittels RT-PCR zu ermitteln, wenig aussagekräftig (vgl. Kap.III.A, 2.1).

In dieser Arbeit sollte die Leber mittels *in situ*-Hybridisierung als Replikationsort von GBV-B und damit der Hepatotropismus von GBV-B bestätigt werden. Hierzu wurden, wie schon zuvor für GBV-A, spezifische nichtradioaktiv-markierter RNA-Sonden von ca. 0.5-1.0 kb Größe zum Nachweis des RNA-Sense- (Genom-Form) und RNA-Antisense-Stranges (replikative Form) von GBV-B hergestellt.

### **2.2.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde**

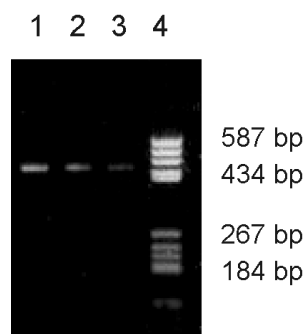
*Gewinnung eines spezifischen GBV-B DNA-Fragments: Extraktion, Reverse Transkription und PCR*

Nach GBV-B-RNA-Extraktionen aus Serum, Herz-, Nieren- und Lebergewebe GBV-B positiver Affen (Kap.II, B.3.1), sowie spezifischer und unspezifischer Umschreibung mit "Superscript II RT" bzw. "MMLV reverser Transkriptase" (Kap.II, B.3.5), gelang es, trotz verschiedener PCR-Ansatzkombinationen (z.B. Durchführung einer nested bzw. semi-nested PCR unter Einsatz verschiedener Primerpaare und Verwendung unterschiedlicher Taq-Polymerasen) nicht, wie zuvor für GBV-A ein ca. 1 kb großes PCR-Fragment aus dem E2-Bereich von GBV-B zu gewinnen. Daraufhin wurde ein kleineres PCR-Fragment aus dem NS3-Bereich von GBV-B amplifiziert.

Hierzu wurde RNA von GBV-B aus Serum vom 28.08.1996 und 30.08.1996 des GBV-B und vorübergehend auch GBV-A infizierten Krallenaffen 86-B-5m (vgl. Tab.III.6) isoliert (Kap.II, B.3.1) und anschließend unspezifisch mit "Superscript II RT" in cDNA umgeschrieben (s. Kap.II, B.3.5). Die anhand der veröffentlichten Sequenz von GBV-B (Genbankzutritt U22304) entworfenen Primer GBV-BS1 und GBV-BA2 (Kap.II, A.3.2.2) ermöglichten die selektive Amplifikation des Nichtstrukturgens NS3 für die hochkonservierte Helikase von GBV-B mit einer Größe von 452 bp. Die PCR (Kap.II, B.7.1/B.7.3) ergab nach Analyse

durch Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.1) die erwartete Einzelbande von 452 bp (vgl. Abb.III.6).

Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde jeweils der restliche PCR-Ansatz elektrophoretisch über ein 1.5 %iges Agarosegel aufgetrennt und die PCR-Fragmente aus dem Gel extrahiert (Kap.II, B.6). Die Kontrolle der Gelextraktion im Agarosegel ergab nach Abschätzung eine DNA-Konzentration von ca. 15 ng/ $\mu$ l (s. Abb.III.6).



**Abb.III.6**

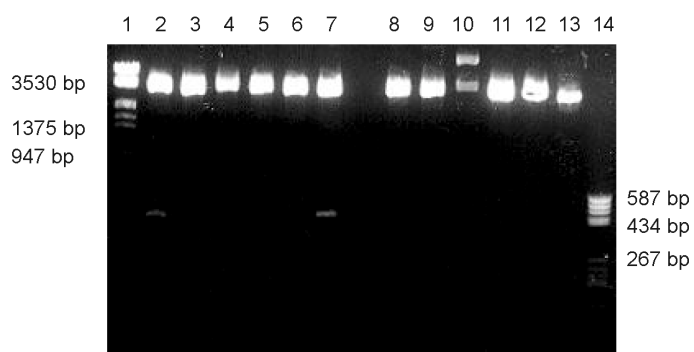
552 bp DNA-Fragment nach selektiver Amplifikation (Primer GBV-BS1 und GBV-BA2) des Nichtstrukturgens NS3 von GBV-B und anschließender Gelextraktion.

Spur 1 und 2: PCR-Produkt nach Nukleinsäureextraktion aus Serum des Affen 86-B-5m; Spur 3: PCR-Produkt nach Nukleinsäureextraktion aus Serum des Affen 88-B-7w; Spur 4: DNA-MG-Marker V.

Die anschließende Sequenzierung (s. Kap.II, B.9) beider DNA-Fragmente unter Verwendung des Primers GBV-BS1 (sense) bzw. GBV-BA2 (antisense) ergab, daß es sich bei den gefundenen Sequenzen um die NS3-Sequenz von GBV-B handelte.

#### *Klonierung des Nichtstrukturgens NS3: Ligation, Transformation und Restriktionsanalyse*

Das NS3-Fragment von GBV-B wurde, entsprechend zum GBV-A-Fragment, mit dem Vektor "pCR®II" (vgl. Anhang) ligiert (Kap.II, B.4.3) und in kompetente INV $\alpha$ F' *E.coli*-Zellen (s. Kap.II, B.8.2) transformiert. ÜN-Kulturen (Kap.II, B.1) der entsprechenden Bakterien wurden angelegt und die Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format (Kap.II, B.2.1) isoliert. Die anschließende EcoRI-Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA ergab eine erfolgreiche Ligation in 16 % aller Bakterien (vgl. Abb.III.7).



**Abb.III.7**

EcoRI-Restriktionsanalyse einzelner Klone. Zwei der 13 untersuchten Klone zeigten eine Insertion des 452 bp-DNA-Fragmentes.

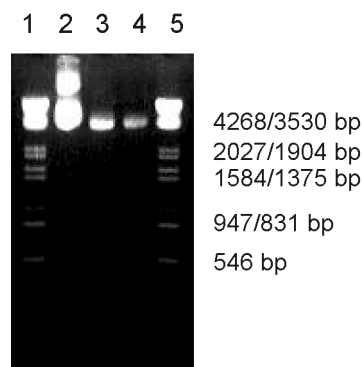
Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2-13: EcoRI-Restriktion einzelner Klone; Spur 14: DNA-MG-Marker V.



Durch beidseitige Ansequenzierung (Kap.II, B.9) der "Positivklone" mit dem "T7-Promotor Primer" bzw. "M13 reverse Primer" (Kap.II, A.3.2.1) konnte ein Klon mit richtiger, d.h. Sense-Orientierung bestimmt werden. Zur Gewinnung größerer Mengen dieser Plasmid-DNA wurde eine Plasmidisolierung in Midi-Präp-Format (Kap.II, B.2.2) durchgeführt, die nach Konzentrationsmessung (s. Kap.II, B.3.4) eine Plasmidausbeute von ca. 0.29 µg/µl ergab.

#### *Herstellung der Template-DNA und Digoxigenin-Markierung durch in vitro-Transkription*

Die Herstellung der Template-DNA für die RNA-Transkription erfolgte, wie schon zuvor für GBV-A, nach der in Kap.II, B.26.1 vorgestellten Methode. Das Plasmid wurde mit der Endonuklease EcoRV (Herstellung der Template-DNA für die Sense-Sonde) bzw. HindIII (Herstellung der Template-DNA für die Antisense-Sonde) linearisiert und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung wurde eine Konzentration der EcoRV-linearisierten DNA von ca. 0.125 µg/µl und der HindIII-linearisierten DNA von ca. 0.25 µg/µl bestimmt (vgl. Abb.III.8).



**Abb.III.8**

Konzentrationsbestimmung der Template-DNA nach Linearisierung der Plasmid-DNA mit EcoRV bzw. HindIII.

Spur 1 und 5: DNA-MG-Marker III; Spur 2: nicht-linearisierte Plasmid-DNA Spur 3: HindIII-linearisierte Template-DNA; Spur 4: EcoRV-linearisierte Template-DNA.

Bei einer *in vitro*-Transkription der EcoRV-linearisierten DNA mit Sp6-RNA-Polymerase bzw. HindIII-linearisierten DNA mit T7-RNA-Polymerase (vgl. Kap.II, B.26.2) wurde die DIG-Markierung durchgeführt. Zum weiteren Konzentrieren wurde die DIG-markierte RNA nach Abstoppen der Transkriptionsreaktion gefällt (Kap.II, B.26.2) und anschließend aufgereinigt (vgl. Kap.II, B.26.3).

#### *Konzentration der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden*

Dot-Blot Untersuchungen der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde für GBV-B ohne direkten Vergleich zu einer DIG-markierten Kontroll-RNA (s. Kap.II, B.26.4) zeigten eine erfolgreiche Markierung mit Digoxigenin (vgl. Abb.III.9).



**Abb.III.9** Dot Blot der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde des GB-Virus-B (Sondenverdünnung wie angegeben).

Der Konzentrationsbereich, der ein optimales und reproduzierbares *in situ*-Hybridisierungssignal für GBV-B ermöglichte, entsprach dem Bereich, der schon für die GBV-A-Sonden festgelegt wurde (Endverdünnung von 1:80 - 1:320; vgl. Tab.III.12).

Ebenso wurde in einem zweiten Dot Blot (nicht gezeigt) aus dem direkten Intensitätsvergleich der Probe mit einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Ausgangskonzentration 100 ng/μl) die Sondenverdünnung von 1:80, wie zuvor für GBV-A, einer Endkonzentration von ca. 25 pg/μl und die von 1:320 einer Endkonzentration von ca. 100 pg/μl zugeordnet (vgl. Tab.III.12).

### 2.2.2 Gewinnung der Gewebeproben

Die Gewebeproben (Kap.II, A.8.2) zur Untersuchung des Replikationsortes von GBV-B stammten aus den Krallenaffen 91-A-8m (Tab.III.15) und 93-A-1m (Tab.III.16). Beide Affen wurden mit dem GBV-B-Inokulum „GBP 1+2-Pool“ inokuliert (vgl. Tab.III.7). Nach ca. einer Woche konnte sowohl beim Affen 91-A-8m als auch beim Affen 93-A-1m mittels RT-PCR (s. Kap.II, A.8.2) GBV-B-RNA nachgewiesen werden. Bei ihrem Tod, ca. 1 Monat n.I., bestand weiterhin eine Infektion mit GBV-B.

**Tab.III.15** Infektionsverlauf des Krallenaffen 91-A-8m nach Inokulation mit “GBP-Pool 1+2”.

<b>91-A-8m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	28.08.1997		negativ	negativ	25
Inokulation mit “GBP-Pool 1+2” am:	02.09.1997	0			
Blutabnahme am:	09.09.1997	7	negativ	<b>positiv</b>	37
	16.09.1997	14	negativ	<b>positiv</b>	26
	23.09.1997	21	negativ	<b>positiv</b>	22
Tod und Gewebeprobenentnahme am:	30.09.1997	28	negativ	<b>positiv</b>	55

**Tab.III.16** Infektionsverlauf des Krallenaffen 93-A-1m nach Inokulation mit "GBP-Pool 1+2".

<b>93-A-1m</b>	<b>Datum</b>	<b>Tag</b>	<b>GBV-A PCR</b>	<b>GBV-B PCR</b>	<b>ALT-Wert [IU/l]</b>
Präserum vom:	30.04.1997		negativ	negativ	14
Inokulation mit "GBP-Pool 1+2" am:	12.05.1997	0			
Blutabnahme am:	21.05.1997	9	negativ	<b>positiv</b>	26
	29.05.1997	17	negativ	<b>positiv</b>	21
	05.06.1997	24	negativ	<b>positiv</b>	18
Tod und Gewebeprobenentnahme am:	11.06.1997	30	negativ	<b>positiv</b>	22

Entsprechend zu GBV-A wurde wiederum Gewebe des Affen 90-D-2m (vgl. Tab.III.14) als Negativkontrolle für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt. Alle zur *in situ*-Hybridisierung eingesetzten Gewebeproben wurden wie unter Kap.II, B.27 beschrieben präpariert.

### **2.2.3 Der Replikationsort von GBV-B**

Wie zuvor für GBV-A mußten auch speziell für die Hybridisierungssonden von GBV-B vor der eigentlichen Untersuchung verschiedener Organe weitere Hybridisierungsvariablen, wie z.B. die Probenkonzentration und Temperatur, optimiert werden. Aufgrund des schon im Dot-Blot eingegrenzten Bereichs für die Sondenverdünnung/-konzentration (vgl. Kap.III., A.2.2.1) wurden Verdünnungen von 1:80, 1:200, 1:300 und 1:400, sowie, ausgehend von der geringeren Größe der GBV-B-Sonden, Hybridisierungstemperaturen von 47°C, 55°C und 65°C an Leberschnitten<sup>(2)</sup> des Affen 93-A-1m (Tab.III.16) und 90-D-2m (Tab.III.14) unter Verwendung der RNA-Antisense-Sonde nach der in Kap.II., B.28 beschriebenen Methode ausgetestet. Leberschnitten des Affen 93-A-1m wurden als sogenannte "MoS"-Kontrollen (s. Kap.III, A.2.1) mitgeführt. Gehirnschnitte des Affen 82-E-1m (Tab.III.13) wurden unter den spezifisch für GBV-A optimierten Bedingungen als Positivkontrolle *in situ* hybridisiert.

Nach Detektion eines Hybridisierungssignals im Leberschnitt des Affen 93-A-1m mit der Antisense-Sonde bei einer Temperatur von 55°C und einer Endverdünnung der Sonde von

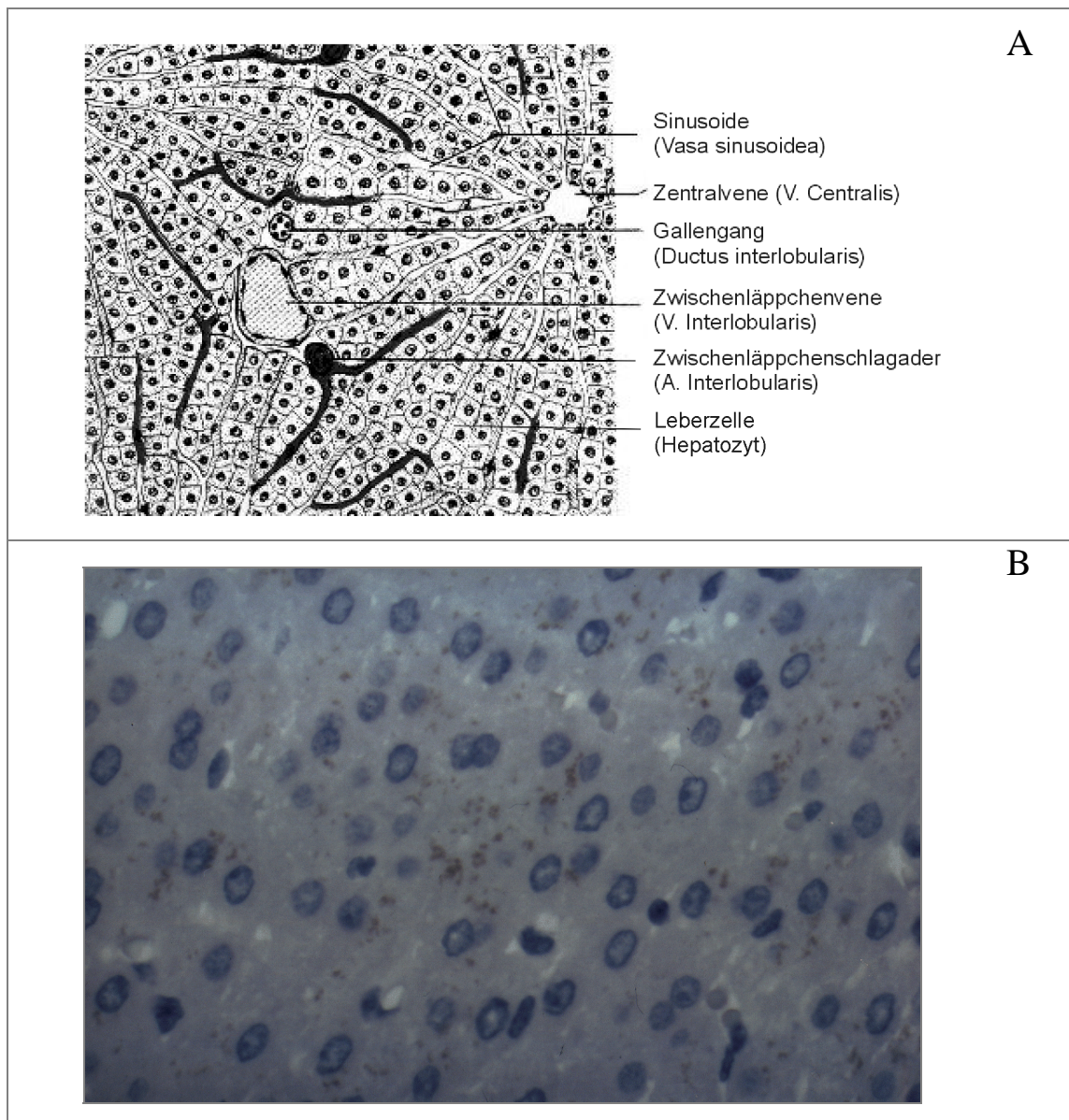
<sup>(2)</sup> Ausgehend von der Vermutung, daß es sich bei GBV-B um ein hepatotropes Virus, genauer das kausale Agens der GB-Hepatitis bei Tamarinen handelt, wurden positive Hybridisierungssignale v.a. mit Organschnitten der Leber erwartet.

1:300, sowie korrekten Positiv- und Negativkontrollen, war es möglich, die für die GBV-B-Hybridisierung notwendigen Parameter zu definieren.

In den folgenden *in situ*-Hybridisierungen wurden dann Organe wie z.B. Herz, Lymphknoten, Nebenniere, Niere, Muskel, Gehirn, sowie speziell der Leberrand als auch das Leberzentrum des Affen 93-A-1m und des Affen 91-A-8m mittels Sense- und Antisense-Sonde und in Form von "MoS"-Kontrollen untersucht. Als weitere Negativkontrolle wurden entsprechende Organe des Affen 90-D-2m und Leberschnitte des GBV-A infizierten Affen 82-E-1m unter Verwendung der GBV-B spezifischen Sonden *in situ* hybridisiert, als Positivkontrolle Gehirnschnitte des Affen 82-E-1m unter Einsatz GBV-A spezifischer Sonden.

Nach Überprüfung aller mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen konnten mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung folgende Ergebnisse (s.u.) gewonnen und somit die Replikation von GBV-B in der Leber bestätigt werden:

- a. Der Nachweis eines Hybridisierungssignals in der Leber des Affen 93-A-1m und zwar sowohl mit der Sense- als auch der Antisense-Sonde von GBV-B (vgl. Abb. III.10) konnte bestätigt werden. Desweiteren gelang der Nachweis von GBV-B in der Leber des Affen 91-A-8m.
- b. Untersuchungen von Leberrand und Leberzentrum wiesen keine Unterschiede auf. Das Hybridisierungssignal war über die gesamte Leber verteilt, konnte jedoch überwiegend im Zytoplasma in Zellkernnähe gefunden werden. Bei den GBV-B infizierten Zellen handelte es sich um Hepatozyten.
- c. In allen anderen Organen, wie Herz, Lymphknoten, Nebenniere, Niere, Muskel und Gehirn der Affen 93-A-1m und 91-A-8m wurde weder mit der Sense- noch der Antisense-Sonde von GBV-B ein *in situ*-Hybridisierungssignal nachgewiesen.
- d. In der mitgeführten Positivkontrolle für GBV-A (Gehirn des Affen 82-E-1m) wurde ein spezifisches Signal nachgewiesen. In den Negativkontrollen (Organe des Affen 90-D-2m, "MoS"-Kontrollen und Leberschnitt des Affen 82-E-1m) wurde kein Signal nachgewiesen.



**Abb.III.10** Die Leber als Replikationsort des GB-Virus-B.

**A** Schematischer Leberquerschnitt. **B** Nachweis der GBV-B-RNA in Paraffin-eingebettetem Lebergewebe (Hepatozyten) des Krallenaffen 93-A-1m mittels der Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde (Signal: braune Färbung; Schnitt: Gegenfärbung mit Hämalaun).

### Zusammenfassung “Replikationsort des GB-Virus-B”

GBV-B, das kausale Agens der GB-Hepatitis in Krallenaffen, repliziert sich, wie erwartet, in der Leber. Bei den GBV-B infizierten Zellen handelte es sich um Hepatozyten.

## **B. Das humane GB-Virus-C**

### **1. Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-C**

Wie erwähnt, war insbesondere die Klärung der klinischen Relevanz einer GBV-C-Infektion bedeutend. Handelte es sich nämlich bei GBV-C tatsächlich um einen neuen viralen Hepatitisserreger, müßte eine GBV-C-Testung sofort in die Blutspender-Untersuchung eingeführt werden. Zu Beginn dieser Untersuchungen war ein kausaler Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Infektion und den sogenannten Non-A-E Hepatitiden intensiv diskutiert worden. GBV-C wurde jedoch als kausales Agens einer Lebererkrankung aufgrund epidemiologischer Daten zunehmend in Frage gestellt. Eine endgültige Beantwortung dieser Frage und damit der Ausschluß einer möglichen Assoziation von GBV-C mit Hepatitiden wäre am beweiskräftigsten durch die Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C möglich.

#### **1.1 Nachweis des Replikationsortes mittels *in situ*-Hybridisierung**

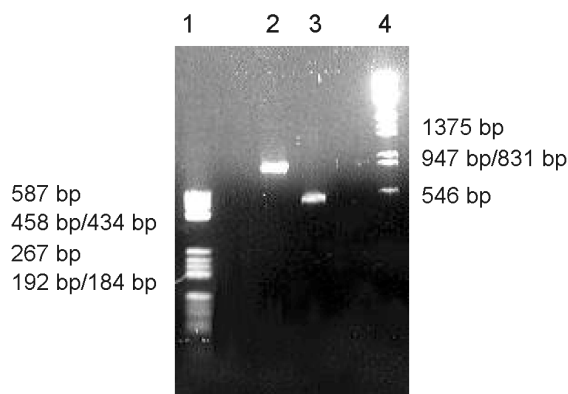
##### **1.1.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde**

*Gewinnung eines spezifischen GBV-C DNA-Fragmentes: Extraktion, Reverse Transkription und PCR*

RNA von GBV-C wurde aus Serum eines GBV-C infizierten Patienten isoliert (Kap.II, B.3.1) und unter Verwendung von Hexanukleotiden unspezifisch mit Superscript™ II RT in cDNA umgeschrieben (Kap.II, B.3.5). Anhand der veröffentlichten Sequenz von GBV-C (Genbankzutritt U36380) wurden die Primer HG-E1s, HG-E2s, HG-E7a und HG-E8a (Kap.II, A.3.2.2) zur selektiven Amplifikation des E2-Strukturgens von GBV-C designiert. Versuche, mit diesen Primern in einer nested PCR das E2-DNA-Fragment mit einer Größe von 1131 bp zu amplifizieren, gelangen trotz mehrfach unterschiedlicher Versuchsansätze nicht. Daraufhin wurden zwei kleinere, überlappende DNA-Fragmente des E2-Strukturgens von GBV-C amplifiziert und miteinander ligiert. Die hierzu notwendigen Primer HG-E3s, HG-E4s, HG-E5a und HG-E6a (Kap.II, A.3.2.2) wurden anhand der obigen Sequenz entworfen. Die PCR (s. Kap. II, B.7.2) mit den Primern HG-E1s und HG-E6a, sowie den nested Primern HG-E2s und HG-E5a, ergab ein einzelnes DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 819 bp aus dem N-terminalen Bereich des E2-Strukturgens von GBV-C (vgl. Abb.III.11). Mit den Primern HG-E3s und HG-E8a, sowie den nested Primern HG-E4s + HG-E7a wurde in

der PCR ein einzelnes DNA-Fragment mit einer Größe von 509 bp aus dem C-Terminus des E2-Strukturgens gewonnen (vgl. Abb.III.11).

Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der restlichen PCR-Ansätze über ein Agarosegel und anschließende Gelextraktion (Kap.II, B.6). Nach Agarosegel-Elektrophorese wurde sowohl für das 819 bp- als auch das 509 bp-Fragment eine DNA-Konzentration von ca. 10 ng/µl bestimmt (Abb.III.11).



**Abb.III.11**

819 bp (HG-E1s und HG-E6a/HG-E2s und 5a) bzw. 509 bp (HG-E3s und HG-E8a/HG-E4s und HG-E7a) DNA-Fragment nach selektiver Amplifikation des Strukturgens E2 von GBV-C und anschließender Gelextraktion.

Spur 1: DNA-MG-Marker V; Spur 2: 819 bp-PCR-Produkt nach Nukleinsäureextraktion aus Serum eines Patienten; Spur 3: 509 bp-PCR-Produkt nach Nukleinsäureextraktion aus Serum eines Patienten; Spur 4: DNA-MG-Marker III.

### *Sequenzierung*

Durch Sequenzierung (Kap.II, B.9) beider DNA-Fragmente unter Verwendung der jeweiligen Sense- (HG-E2s bzw. HG-E4s) und Antisense-Primer (HG-E5a bzw. HG-E7a) wurde bestätigt, daß es sich, trotz einzeln auftretender, jedoch konservativer Punktmutationen, bei den gefundenen Sequenzen um Sequenzen des E2-Strukturgens handelte.

### *Klonierung des N-terminalen und C-terminalen Fragments des Strukturgens E2: Ligation, Transformation und Restriktionsanalyse*

Um die beiden überlappenden E2-Fragmente religieren zu können, wurden diese in den 3.9 kb Vektor "pCR®2.1" (s. Anhang) kloniert (Kap.II, B.4.3) und in kompetente INVαF' *E.coli*-Zellen transformiert (Kap.II, B.8.2). Nach ÜN-Kultivierung (Kap.II, B.1) einzelner Klone wurde die Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format isoliert (Kap.II, B.2.1). Die EcoRI-Restriktionsanalyse ergab hierbei für das 819 bp-Fragment eine Ausbeute von ca. 66 % und für das 509 bp-Fragment eine Ausbeute von ca. 75 % an Insert tragenden Plasmiden. Durch asymmetrischen Verdau der inserthaltigen Plasmide mit der Restriktionsendonuklease ApaI bzw. SphI wurde die Orientierung des 819 bp- sowie des 509 bp-Inserts bestimmt. Desweiteren bestand das Prinzip der Religation (vgl. Abb. III.12) darin, je einen Klon ("819 bp-Fragment"- und "509 bp-Fragment"-Klon) mit richtiger Orientierung des Inserts mit ApaI zu verdauen und anschließend das "Vektor"-Fragment mit dem N-terminalen Ende des

E2-Strukturgen und das "Insert"-Fragment mit dem C-terminalen Ende des E2-Strukturgen zu religieren. Dadurch würde ein Plasmid mit dem vollständigen E2-Strukturgen als Insert entstehen.

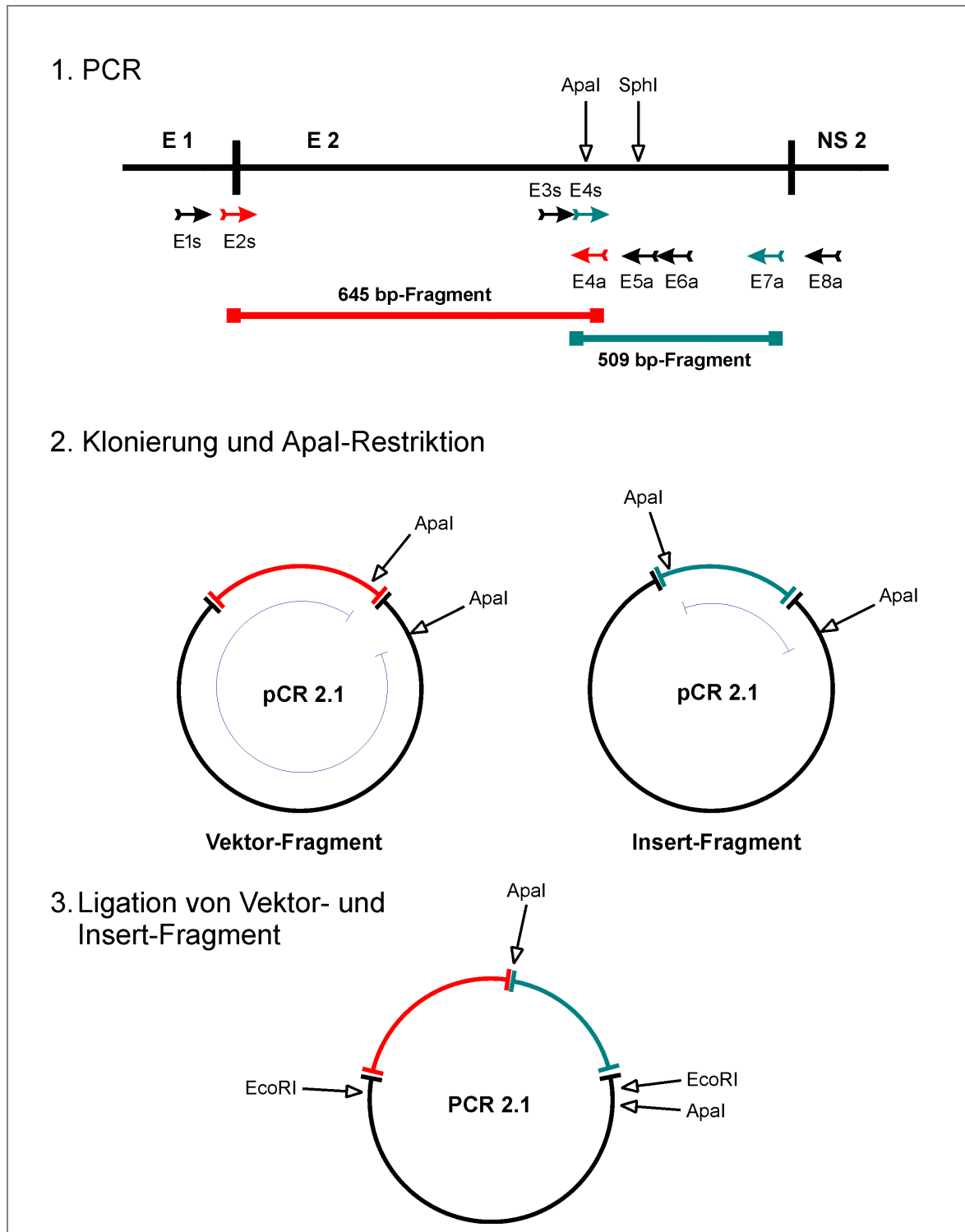
Nach ApaI- bzw. SphI-Restriktion wurde jedoch folgendes Ergebnis erhalten:

- a. Bei sämtlichen untersuchten "819 bp-Fragment"-Klone konnte durch ApaI-Restriktion zwar eine Linearisierung, jedoch weder ein 248 bp-Fragment (Sense-Orientierung) noch ein 691 bp-Fragment (Antisense-Orientierung) im Agarosegel analysiert werden. Entsprechendes ergab die SphI-Restriktionsanalyse der "509 bp-Fragment"-Klone: eine Linearisierung, jedoch weder ein 375 bp- (Sense-Orientierung) noch ein 228 bp-Fragment (Antisense-Orientierung). Die Vermutung, daß eventuell eine Mutation der im Insert enthaltenen ApaI- bzw. SphI-Erkennungssequenz Ursache für die nur teilweise erfolgte Restriktion sein könnte, wurde durch Sequenzierung der Inserts mit dem T7 Promotor Primer (Kap.II, A.3.2.1) bestätigt. Anstatt der erwarteten ApaI-Erkennungssequenz "GGGCCC" wurde die Sequenz "AGGCCC" gefunden und anstatt der SphI-Erkennungssequenz "GCATGC" die Sequenz "GCATAC". Diese Punktmutationen waren mit hoher Wahrscheinlichkeit entweder auf das fehlende "proof-reading" der Taq-Polymerase oder auf ein mutiertes Template zurückzuführen, da alle "819 bp-Fragment"-Klone bzw. "509 bp-Fragment"-Klone betroffen waren.
- b. Restriktionsanalysen der "819 bp-Fragment"-Klone mit SphI (Entfallen eines 61 bp-Fragments bei Sense-Orientierung) und der "509 bp-Fragment"-Klone mit ApaI (560 bp-Fragment) ergaben jedoch Klone mit richtiger Insertorientierung. In diesem Fall waren die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme weitestgehend von Mutationen ausgeschlossen, da der Primer HG-E5a die SphI-Schnittstelle und der Primer HG-E4s die ApaI-Schnittstelle beinhaltet. Durch Sequenzierung mit dem M13 Reverse Primer bzw. dem T7 Promotor Primer (Kap.II, A.3.2.1) konnte die Orientierung bestätigt werden.

Aufgrund der nicht bestehenden Voraussetzung, beide Fragmente entweder mit ApaI oder SphI verdauen zu können, war die Religation des 819 bp- und des 509 bp-E2-Fragments nicht mehr möglich.

Durch Konstruktion des nested Primers HG-E4a (Kap.II, A.3.2.2), der seinerseits die ApaI-Erkennungssequenz beinhaltet, wurde ein weiteres N-terminales und mit dem 509 bp-Fragment überlappendes DNA-Fragmente des E2-Strukturgen von GBV-C hergestellt (s. Abb.III.12).



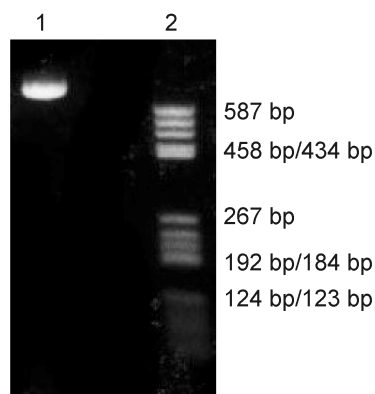


**Abb.III.12:** Schema zum Prinzip der Religation zweier überlappender E2-Fragmente von GBV-C.

Nach Durchführung einer PCR ( $\rightarrow$ , Sense-Primer;  $\leftarrow$ , Antisense-Primer) und Erhalt der entsprechenden E2-Fragmente (rot bzw. blau) wurden diese in den Vektor pCR 2.1 kloniert. Durch Restriktion mit Apal konnte ein "Vektor"- und ein "Insert"-Fragment (blaue Bögen) isoliert werden. Durch Ligation des "Vektor"-Fragments mit dem "Insert"-Fragment wurde eine Religation der zwei E2-Fragmente erreicht.

Die unter Verwendung der Primer HG-E1s, HG-E6a, HG-E2s und HG-E4a durchgeführte PCR (s. Kap.II, B.7) ergab ein einzelnes DNA-Fragment mit einer Größe von 645 bp (vgl.

Abb.III.13). Die Isolierung des DNA-Fragments erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und Gelextraktion (Kap.II, B.6). Die DNA-Konzentration lag nach Abschätzung bei ca. 10 ng/μl (Abb.III.13).



**Abb.III.13**

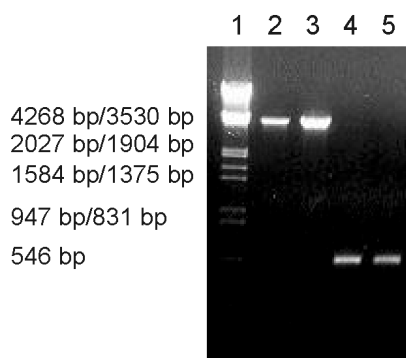
645 bp (HG-E1s und HG-E6a/HG-E2s und HG-E4a) DNA-Fragment nach selektiver Amplifikation des Strukturgens E2 von GBV-C und anschließender Gelextraktion.

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2: 645 bp PCR-Produkt nach Nukleinsäureextraktion aus Serum eines Patienten; Spur 3: DNA-MG-Marker V.

Durch Sequenzierung des DNA-Fragments mit dem Primer HG-E2s bzw. HG-E4a konnte die Übereinstimmung mit der E2-Sequenz von GBV-C bestätigt werden. Nach Ligation des 645 bp-DNA-Fragments mit dem Vektor “pCR®2.1” (s. Anhang), Transformation in kompetente INVαF’ *E.coli*-Zellen (Kap.II, B.8.2), ÜN-Kultivierung einzelner Klone, sowie Plasmid-Isolierung auf Mini-Präp-Ebene (Kap.II, B.2.1), ergab die EcoRI-Restriktionsanalyse eine Ausbeute von ca. 63 % inserthaltigen Plasmiden. Durch anschließende Restriktion mit der Endonuklease ApaI konnten Plasmide mit richtiger Orientierung des Inserts bestimmt werden.

#### *Religation des N- und C-terminalen DNA-Fragmentes*

Die Herstellung des vollständigen E2-Strukturgens erfolgte gemäß dem in Abb.III.12 dargestellten Religationsprinzip. Nach ApaI-Restriktion des “645 bp-Fragment”-Klons konnte ein “4462 bp-Vektor” mit dem N-terminalen Bereich des E2-Gens und nach ApaI-Restriktion des “509 bp-Fragment”-Klons ein “560 bp-Insert” mit dem C-terminalen Bereich des E2-Gens im Agarosegel analysiert und anschließend aus dem Gel isoliert werden (s. Abb.III.14).

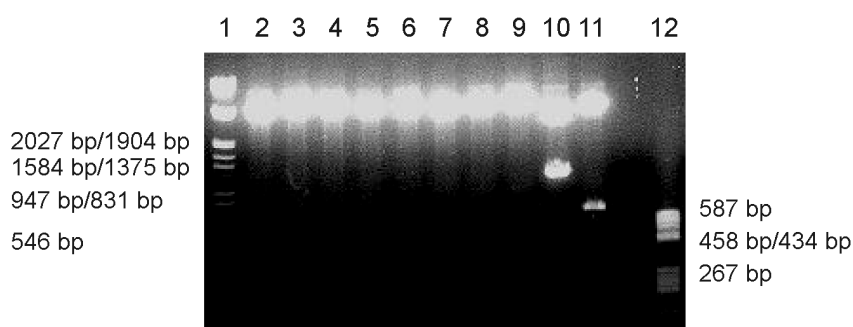


**Abb.III.14**

Restriktion des “645 bp-Fragment”-Klons und “509 bp-Fragment”-Klons mit der Endonuklease ApaI (DNA-Fragmente nach Gelextraktion).

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2 und 3: “4462 bp-Vektor” mit dem N-terminalen Bereich des E2-Strukturgens. Spur 4 und 5: “560 bp-Insert” mit dem C-terminalen Bereich des E2-Strukturgens.

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (Kap.II, B.3.4) ergab für den 4462 bp-Vektor eine Konzentration von 90 ng/μl und für das 560 bp-Insert eine Konzentration von 180 ng/μl. Nach Ligation beider Fragmente, Transformation in kompetente INVαF' *E.coli*-Zellen und ÜN-Anzucht einzelner Klone, wurde die Plasmid-DNA auf Mini-Präp-Ebene isoliert. Durch Restriktionsanalyse mit EcoRI konnte sowohl die Insertion als auch die Orientierung des 560 bp-Inserts, bestimmt werden (vgl. Abb.III.15). Nur einer von 10 Klonen enthielt das Insert in richtiger Orientierung (vgl. Abb.III.15; Spur 10).



**Abb.III.15** EcoRI-Restriktionsanalyse verschiedener Klone.

Bei zwei der 10 untersuchten Klone konnte eine Insertion des 560 bp-Fragmentes nachgewiesen werden (Spur 10 und 11). Spur 10 zeigt die Sense-Orientierung (1154 bp-Fragment), Spur 11 die Antisense-Orientierung des Inserts (700 bp-Fragment). Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2-11: EcoRI-Restriktion einzelner Klone; Spur 12: DNA-MG-Marker V.

Durch Sequenzierung des Religationsklons unter Verwendung des T7 Promotor Primers bzw. M13 Reverse Primers wurde die Insertion bestätigt und die Sequenzierung mit dem Primer HG-E5a ergab eine korrekte ApaI-Schnittstelle (Verknüpfungsstelle von Insert und Vektor).

#### *Umklonierung des religierten E2-Strukturgens*

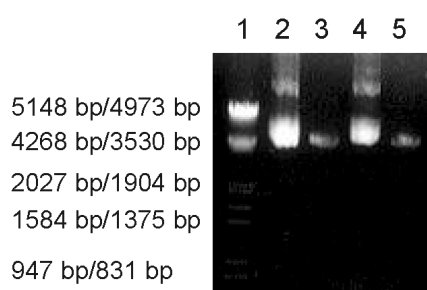
Da der Vektor "pCR®2.1" nur den T7-Promotor enthielt und folglich nur die Antisense-RNA-Sonde hergestellt werden könnte, wurde das religierte E2-Gen in den Vektor "pCR®II" (vgl. Anhang) umkloniert. Nach Midi-Präparation (Kap.II, B.2.2) der Plasmid-DNA des E2-Religationsklones (DNA-Konzentration: 0.68 μg/μl) und enzymatischem Verdau (vgl. Kap.II, B.4.1) von 20 μg mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRV konnte im Agarosegel eine Bande mit einer Größe von ca. 1200 bp analysiert und isoliert werden. Im Vergleich zur Marker-Konzentration lag die DNA-Konzentration bei ca. 40 ng/μl.

Parallel wurden 100 ng des Vektors "pCR®II" mit HindIII und EcoRV verdaut. Nach Isolierung der geschnittenen Vektor-DNA im Agarosegel ergab sich eine DNA-Konzentration von ca. 2 ng/μl. Die anschließende Ligation (Kap.II, B.4.3) des Vektors "pCR®II" mit dem E2-Religationsfragment wurde durch EcoRI-Restriktion und Sequenzierung mit dem T7

Promotor Primer bzw. M13 Reverse Primer bestätigt. Die Midi-Präparation (Kap.II, B.2.2) der Plasmid-DNA ergab eine DNA-Konzentration von 0.37 µg/µl.

#### *Herstellung der Template-DNA und Digoxigenin-Markierung durch in vitro-Transkription*

Nach Linearisierung des Plasmids mit der Endonuklease EcoRV (Template-DNA für Sense-Sonde) bzw. KpnI (Template-DNA für Antisense-Sonde) sowie präparativer Agarosegel-Elektrophorese, Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung der Template-DNA (s. Kap.II, B.26.1), wurde für die EcoRV- und KpnI-linearisierte DNA eine Konzentration von ca. 0.125 µg/µl bestimmt (s. Abb.III.16).



**Abb.III.16**

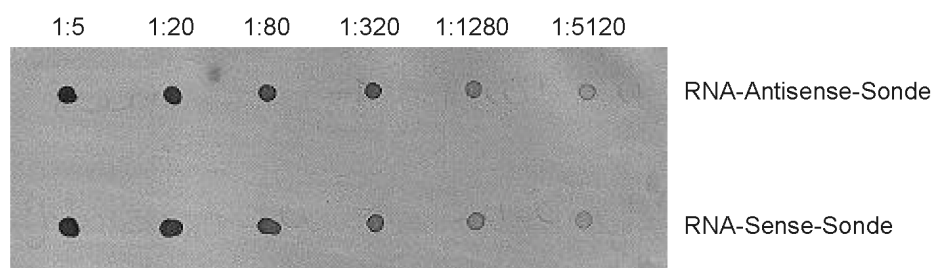
Konzentrationsbestimmung der Template-DNA nach Linearisierung der Plasmid-DNA mit EcoRV bzw. KpnI.

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2 und 4: Plasmid-DNA (nicht linearisiert); Spur 3: EcoRV-linearisierte Template-DNA; Spur 5: KpnI-linearisierte -DNA.

Die DIG-Markierung der linearisierten Template-DNA erfolgte durch *in vitro*-Transkription mit Sp6- bzw. T7-RNA-Polymerase (vgl. Kap.II, B.26.2). Nach Abstoppen der Transkriptionsreaktion wurde die DIG-markierte RNA konzentriert und aufgereinigt (s. Kap.II, B.26.2/26.3).

#### *Konzentration der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden*

Dot-Blot Untersuchungen der Sense- und Antisense-RNA-Sonde für GBV-C ohne direkten Vergleich zu einer DIG-markierten Kontroll-RNA (s. Kap.II, B.26.4) zeigten eine erfolgreiche Markierung mit Digoxigenin (vgl. Abb.III.17).



**Abb.III.17** Dot Blot der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde des GB-Virus-C (Sondenverdünnung wie angegeben).

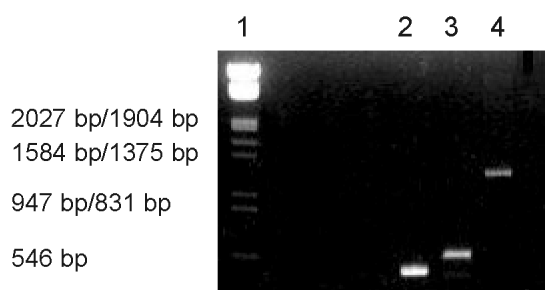
Sowohl die Endverdünnung der GBV-C-Sonden, als auch die in einem zweiten Dot Blot (nicht gezeigt) aus dem direkten Intensitätsvergleich der Probe mit einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Ausgangskonzentration: 100 ng/μl) ermittelten Endkonzentrationen entsprachen den zuvor für die Sonden von GBV-A und GBV-B ermittelten Werten (vgl. Tab.III.12).

### **1.1.2 Herstellung HBV-spezifischer Sonden als Positivkontrolle der Hybridisierung**

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde die HBV-spezifische *in situ*-Hybridisierung aus folgendem Grund eingesetzt: bei HBV handelt es sich um ein hepatotropes, in der Leber replizierendes Virus. Die erfolgreiche *in situ*-Hybridisierung HBV-spezifischer DIG-markierter RNA-Sense und RNA-Antisense-Sonden in humanen HBV-positiven Leberbiopsien konnte somit als Positivkontrolle der GBV-C-spezifischen Hybridisierung eingesetzt werden. Die entsprechenden HBV-Sonden wurden hergestellt.

#### *Gewinnung eines spezifischen HBV DNA-Fragments: Extraktion, Reverse Transkription und PCR*

Die HBV-Nukleinsäure wurde aus der humanen Hepatomzelllinie ("Alexanderzellen", PLC-PRF5-Zellen), die ein Oberflächenantigen des HBV produziert, extrahiert (s. Kap.II, B.3.1). Nach Durchführung der HBV-PCR (Kap.II, B.7.2) unter Verwendung verschiedener HBV-Primerkombination konnten drei DNA-Fragmente gewonnen werden (vgl. Abb.III.18). Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und Gelextraktion (Kap.II, B.6) und ergab für das 493 bp-Fragment eine DNA-Konzentration von 40 ng/μl, für das 554 bp-Fragment eine Konzentration von 25 ng/μl und das 1000 bp-Fragment eine Konzentration von 20 ng/μl.



**Abb.III.18**

DNA-Fragmente nach HBV-spezifischer PCR mit verschiedenen Primerkombinationen und Gelextraktion.

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2: 493 bp PCR-Produkt (Primer HBV-#1/HBV-SI3); Spur 3: 554 bp PCR-Produkt (Primer HBV-#4/HBV-#5); Spur 4: 1000 bp PCR-Produkt (Primer HBV-#1/HBV-#5).

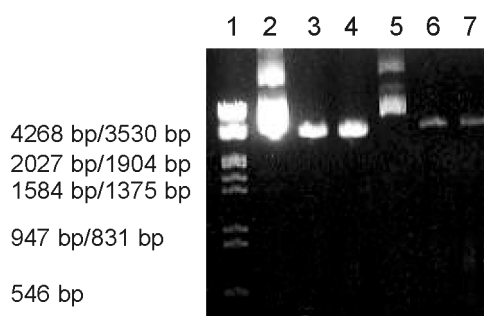
Die Sequenzierung (Kap.II, B.9) der DNA-Fragmente unter Verwendung der jeweiligen Sense- und Antisense-Primer ergab, daß es sich bei den gefundenen Sequenzen um die von Hepatitis B-Virus handelte.

*Klonierung der HBV-Fragmente: Ligation, Transformation und Restriktionsanalyse*

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Vektor "pCR®II" (vgl. Anhang) ligiert (Kap.II, B.4.3) und in kompetente INV $\alpha$ F' *E.coli*-Zellen transformiert (Kap.II, B.8.2). ÜN-Kulturen (Kap.II, B.1) wurden angelegt und die Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format (Kap.II, B.2.1) isoliert. EcoRI-Restriktionsanalysen zufolge wurde v.a. das 493 bp- und 554 bp-Fragment von HBV erfolgreich ligiert, wobei beim 554 bp-Fragment eine weitere EcoRI-Schnittstelle durch Mutation im Insert entstanden war. Durch Sequenzierung mit dem T7 Promotor Primer bzw. M13 Reverse Primer wurden für beide HBV-Fragmente Klone mit Sense-Orientierung des Inserts gefunden. Das 1000 bp-Fragment konnte hingegen nicht erfolgreich kloniert werden. Die Midi-Präparation der Plasmid-DNA (Kap.II; B.2.2) ergab für den "493 bp-Fragment"-Klon und den "554 bp-Fragment"-Klon eine DNA-Konzentration von 0.53  $\mu$ g/ $\mu$ l.

*Herstellung der Template-DNA und DIG-Markierung durch in vitro-Transkription*

Beide Plasmide wurden mit der Endonuklease EcoRV (Template-DNA für Sense-Sonde) bzw. HindIII (Template-DNA für Antisense-Sonde) linearisiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der EcoRV- bzw. HindIII-linearisierten Template-DNA im Agarosegel, Gelextraktion, Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung (Kap.II, B.26.1) wurde für die Template-DNA des "493 bp-Fragment"-Klons eine Konzentration von 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l und für die Template-DNA des "554 bp-Fragment"-Klons eine Konzentration von 0.125  $\mu$ g/ $\mu$ l erhalten (vgl. Abb.III.19).

**Abb.III.19**

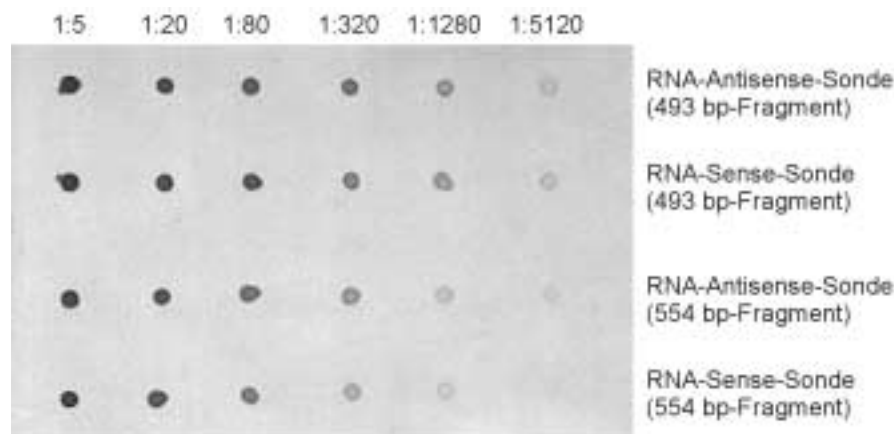
Konzentrationsbestimmung der Template-DNA nach Linearisierung der Plasmid-DNA mit EcoRV bzw. HindIII.

Spur 1: DNA-MG-Marker III; Spur 2 und 5: Plasmid-DNA (nicht linearisiert); Spur 3: HindIII-linearisierte Template-DNA ("493 bp"-Klon); Spur 4: EcoRV-linearisierte Template-DNA ("493 bp"-Klon); Spur 6: HindIII-linearisierte Template-DNA ("554 bp"-Klon); Spur 7: EcoRV-linearisierte Template-DNA ("554 bp"-Klon).

Durch *in vitro*-Transkription der EcoRV-linearisierten Template-DNA mit Sp6-RNA-Polymerase bzw. der HindIII-linearisierten Template-DNA mit T7-RNA-Polymerase wurde die DIG-Markierung durchgeführt (Kap.II, B.26.2). Zur weiteren Konzentrierung und Aufreinigung wurde die DIG-markierte RNA nach Abstoppen der Transkriptionsreaktion gefällt (Kap.II, B.26.2) und über Chromatographiesäulen aufgereinigt (Kap.II, B.26.3).

### Konzentration der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Dot Blot-Untersuchungen der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde für HBV ohne direkten Vergleich zu einer DIG-markierten Kontroll-RNA (Kap.II, B.26.4) ergaben eine erfolgreiche Digoxigenin-Markierung (vgl. Abb.III.20).



**Abb.III.20** Dot Blot der RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonden des Hepatitis B-Virus (Sondenverdünnung wie angegeben).

Der Konzentrationsbereich, der ein optimales und reproduzierbares *in situ*-Hybridisierungssignal für HBV ergab, entsprach dem Bereich, der schon bei den anderen Sonden gefunden wurde (vgl. Tab.III.12).

### 1.1.3 Gewinnung der Gewebeproben

Zur Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C wurden folgende Gewebe nach PCR-Untersuchung der Patienten auf GBV-C, HBV und HCV untersucht (Kap.II, A.8.2):

Leberbiopsien, Nieren-, Milz-, Muskel-, Lymphknoten-, Skelettmuskel-, Lungen-, Tonsillen-, Herz-, Schilddrüsen- und Speicheldrüsen Gewebeproben GBV-C infizierter bzw. nicht infizierter Patienten; Milz-, Leber- und Lymphknotengewebe GBV-C infizierter verstorbener i.v.-Drogenkonsumenten, sowie Darm- und Gehirngewebe GBV-C/HIV koinfizierter Patienten. Gewebe nicht GBV-C infizierter Patienten wurden als Negativkontrolle für die *in situ*-Hybridisierung von GBV-C eingesetzt. Zusätzlich wurden sogenannte “MoS”-Kontrollen verwendet, d.h. Gewebe GBV-C positiver Patienten wurden allen anderen Gewebeproben entsprechend hybridisiert, jedoch unter Verwendung eines Hybridisierungsmixes ohne Sense- bzw. Antisense-RNA-Sonde. Desweiteren wurde die Hybridisierung von Leberbiopsien HBV infizierter bzw. nicht-infizierter Patienten mit spezifischen HBV-RNA-Sense- und HBV-RNA-Antisense-Sonden als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle eingesetzt. Die Kontrolle

der HBV-Hybridisierung erfolgte ihrerseits durch "MoS"-Hybridisierungen. Alle Gewebeproben wurden, wie in Kap.II, B.27 beschrieben, präpariert.

#### **1.1.4 Der Replikationsort von GBV-C**

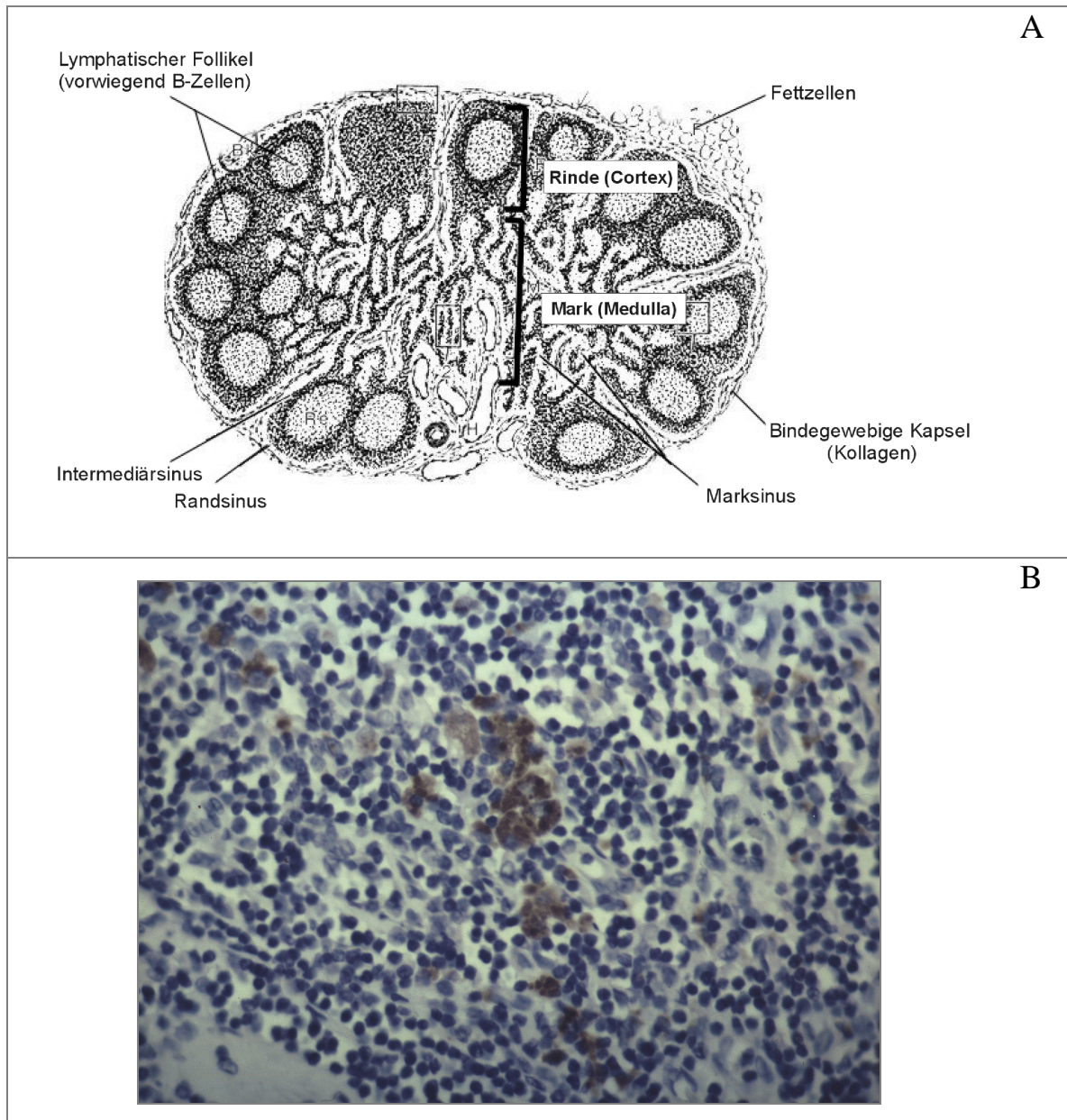
Zu Beginn der eigentlichen Untersuchung zum Replikationsort von GBV-C wurden die Probenkonzentration und Temperatur als zusätzliche Hybridisierungsvariablen festgelegt. Aufgrund der im Dot-Blot eingegrenzten Sondenverdünnung bzw. Sondenkonzentration (vgl. Kap.III., B.1.1.1) und der Ähnlichkeit der GBV-C-Sonden zu den GBV-A-Sonden (hinsichtlich Größe und gewähltem Genombereich der Sonde) wurde mit einer Sondenverdünnung von 1:300, sowie einer Hybridisierungstemperatur von 55°C gearbeitet. Die Parameter für die HBV-spezifischen Hybridisierungssonden waren wie für GBV-C (Sondenverdünnung: 1:300; Temperatur: 55°C).

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- a. Die zur Kontrolle der *in situ*-Hybridisierung mitgeführte Hybridisierung HBV-spezifischer Sonden an Leberbiopsien HBV infizierter Patienten ergab sowohl für die HBV-Sense- als auch die HBV-Antisense-Sonde ein positives Hybridisierungssignal. Dagegen wurde in Leberbiopsien HBV-negativer Patienten, sowie in den MoS-Kontrollen, keine Hybridisierung gefunden.
- b. Ein in Leberbiopsien GBV-C infizierter Patienten nachgewiesenes schwaches Hybridisierungssignal mit der Sense- und Antisense-Sonde von GBV-C war nach Auffinden des gleichen Signals in Leberbiopsien nicht GBV-C infizierter Patienten sowie in den MoS-Kontrollen unspezifisch.
- c. In Nieren-, Milz-, Muskel-, Skelettmuskel-, Lungen-, Herz-, Mandel-, Schilddrüsen- und Speicheldrüsenngewebe GBV-C infizierter Patienten, in Milz- und Lebergewebe GBV-C infizierter verstorbener i.v.-Drogenkonsumenten sowie in Darm- und Gehirngewebe GBV-C/HIV koinfizierter Patienten wurde durch *in situ*-Hybridisierung der Sense- und Antisense-Sonde von GBV-C kein Signal nachgewiesen.
- d. Dagegen konnte nach *in situ*-Hybridisierung der Sense- und Antisense-Sonde von GBV-C ein reproduzierbares Signal im Lymphknoten, speziell im Zytoplasma der Lymphozyten, eines GBV-C-infizierten Patienten nachgewiesen werden (s. Abb.III.21). Das Hybridisierungssignal wurde jeweils an identischen Stellen, überwiegend im äußeren Cortextbereich des Lymphknotens, lokalisiert. Nach mikroskopischer Schätzung waren etwa 5-10 % der Zellen infiziert. In der entsprechend mitgeführten MoS-Kontrolle wurde kein Hybridisierungssignal erhalten, d.h. das Signal war spezifisch.



e. Weitere *in situ*-Hybridisierungen der Sense- bzw. Antisense-Sonde von GBV-C mit Lymphknotengewebe GBV-C infizierter verstorbener i.v.-Drogenkonsumenten ergaben kein Signal.



**Abb.III.21** Der Lymphknoten als Replikationsort des GB-Virus-C.

**A** Schematischer Lymphknotenschnitt. **B** Nachweis der GBV-C/HGV-RNA in Paraffin-eingebettetem Lymphknotengewebe (Lymphozyten) eines GBV-C infizierten Patienten mit Hilfe der Digoxigenin-markierten RNA-Sense- und RNA-Antisense-Sonde (Signal: braune Färbung; Schnitt: Gegenfärbung mit Hämalaun).

### **1.1.5 Abschließende Untersuchungen zur Spezifität der GB-Hybridisierungssonden**

In den abschließenden *in situ*-Hybridisierungen wurde die Spezifität von Sense- und Antisense-Sonde der GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C untersucht, um damit die Spezifität der durch die Hybridisierung gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Hierzu wurden Gehirnschnitte des Affen 82-E-1m (Tab.III.13) und 87-A-4m (Tab.III.9) *in situ* mit den DIG-markierten RNA-Sense- bzw. RNA-Antisense-Sonden von GBV-B bzw. GBV-C, sowie von GBV-A als Positivkontrolle hybridisiert. Es wurde keine Kreuzreaktivität der GBV-B- bzw. der GBV-C-spezifischen Sonden zu GBV-A gefunden.

Bei *in situ*-Hybridisierungen mit Lebergewebe des Affen 93-A-1m (Tab.III.16) und 91-A-8m (Tab.III.15) und den für GBV-A- bzw. GBV-C spezifischen Hybridisierungssonden wurde ebenfalls kein Signal nachgewiesen, d.h. weder die GBV-A- noch die GBV-C-spezifischen Sonden zeigten eine Kreuzreaktivität zu GBV-B. Mit der mitgeführten GBV-B-Sonde wurde ein Signal erhalten. Insgesamt zeigte sich eine hohe Spezifität der für die GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C verwendeten Sonden.

#### **Zusammenfassung “Replikationsort des GB-Virus-C” nach *in situ*-Hybridisierung**

Für GBV-C wurden die Lymphozyten von Lymphknoten als ein Replikationsort ermittelt. Bei den GBV-C infizierten Zellen handelt es sich aufgrund der Lokalisation des *in situ*-Hybridisierungssignals im Bereich der Lymphknotenrinde (Cortex) höchstwahrscheinlich um B-Lymphozyten.

### **1.2 Nachweis des GBV-C-Genoms in peripheren mononukleären Blutzellen**

Nachdem mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung die Lymphozyten als ein Replikationsort von GBV-C bestimmt wurden, wurde durch RT-PCR-Untersuchung einzelner Zellfraktionen ermittelt, ob prinzipiell RNA von GBV-C in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nachgewiesen werden kann und wenn ja, ob es sich bei den GBV-C infizierten Zellen um T- oder B-Lymphozyten handelt.

Hierzu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus je zweimal 25 ml EDTA-Blut eines GBV-C-positiven Patienten (PBMC-Isolierung I/II) isoliert (Kap.II, B.20).

*Charakterisierung des Patienten*

Aufgrund des GBV-C-RNA-Nachweises im Serum über einen betrachteten Zeitraum von 4 Monaten wurde von einer chronischen GBV-C-Infektion dieses Patienten ausgegangen. Nach Extraktion der Nukleinsäuren (Kap.II, B.3.1) sowie spezifischer Umschreibung unter Verwendung des Primers YK877 (Kap.II, B.3.5) wurde mit Hilfe einer semiquantitativen nested PCR (Kap.II, B.7.2) mit den Primern YK874, YK877, YK875 und YK876 ein Titer von  $1.25 \times 10^6$  Genomäquivalenten/ml bestimmt. Der Patient war somit zum Zeitpunkt der Blutabnahme hochtitrig GBV-C virämisch.

*Bestimmung der Gesamtzellzahl*

Nach Isolierung der PBMCs ergab sich eine im Bereich der erwarteten Zellausbeute von  $2 \times 10^7$  (bei 20 ml Blut) liegende Gesamtzellzahl von  $2.3 \times 10^7$  für die PBMC-Isolierung I und  $2.6 \times 10^7$  für die PBMC-Isolierung II (Kap.II, B.21). Die Zellebensfähigkeit (s. Kap.II, B.21) lag für die PBMC-Isolierung I bei 99.1 % und für die PBMC-Isolierung II bei 96 %.

*Zellmarkierung und Zelltrennung*

Ausgehend von den zuvor bestimmten Gesamtzellzahlen wurden, um eine möglichst reine T-Zellen- bzw. B-Zellenfraktion zu erhalten, in getrennten Ansätzen die T-Zellen (mit PBMCs aus Isolierung I) sowie die B-Zellen (mit PBMCs aus Isolierung II) paramagnetisch markiert (s. Kap.II, B.22) und über die Methode des MACS (Magnetic Cell Sorting)-Systems getrennt (s. Kap.II, B.21). Die Überprüfung der Eluat-Fraktionen und Negativ-Fraktionen (nicht markierte Zellen) auf Lebensfähigkeit der Zellen ergab, mit Ausnahme des B-Zellen-Eluates (Zellebensfähigkeit: 92 %) eine Rate von 98 %. Die Zellausbeute nach T-Zellen-Markierung und Zelltrennung lag bei  $6 \times 10^5$  Zellen für die Eluat-Fraktion und  $1.2 \times 10^7$  Zellen für die Negativ-Fraktion. Die entsprechend für B-Zellen durchgeführte Markierung und Zelltrennung ergab für die Eluat-Fraktion  $6 \times 10^4$  Zellen und die Negativ-Fraktion  $1.38 \times 10^7$  Zellen (vgl. Tab.III.17).

**Tab.III.17** Zellausbeute nach Zellmarkierung und Auftrennung über das MACS-System.

<u>Zellfraktion</u>	<u>Zellausbeute nach T-Zellen-Markierung</u>	<u>Zellausbeute nach B-Zellen-Markierung</u>
Eluat-Fraktion (T- bzw. B-Zellen)	$6 \times 10^5$ Zellen	$6 \times 10^4$ Zellen
Negativ-Fraktion (B- bzw. T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen)	$1.2 \times 10^7$ Zellen	$1.38 \times 10^7$ Zellen

Zur Abtrennung der in Zellkultur adhärenen Monozyten von den in der Negativ-Fraktion vorhandenen, jedoch nicht adhärenen T- bzw. B-Zellen und NK-Zellen wurden von der nach T-Zell-Markierung entstandenen Negativ-Fraktion  $5.5 \times 10^6$  Zellen und von der nach B-Zell-Markierung entstandenen Negativ-Fraktion  $6.3 \times 10^6$  Zellen in 4 ml RPMI für 24 h kultiviert (s. Kap.II, B.23). Nach Abnahme der Zellkulturüberstände sowie Resuspension der adhärenen Monozyten wurden folgende Zellzahlen (vgl. Tab.III.18) für die einzelnen Fraktionen bestimmt (Kap.II, B.21):

**Tab.III.18** Zellausbeute nach Zellkultur der Negativ-Fraktionen.


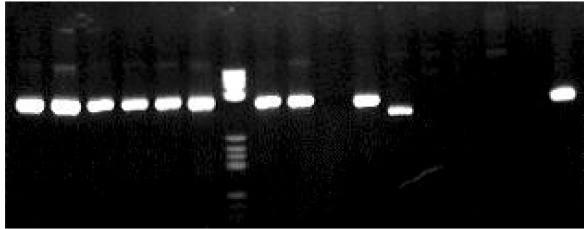
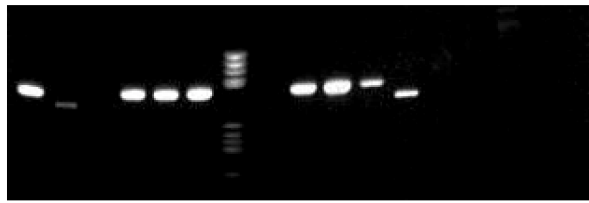
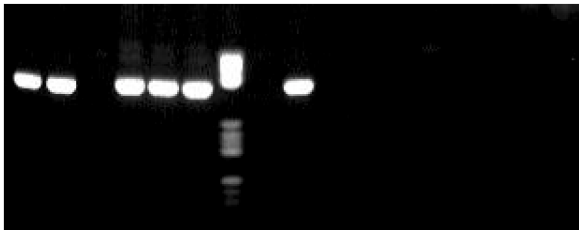
	<u>Zellfraktion</u>	<u>Zellzahl/200µl PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % BSA</u>
T-Zellen-Markierung	Zellkulturüberstand (B-Zellen und NK-Zellen)	$1.68 \times 10^6$ Zellen
	Zugehörige Monozyten-Fraktion	$1.56 \times 10^5$ Zellen
B-Zellen-Markierung	Zellkulturüberstand (T-Zellen und NK-Zellen)	$3.42 \times 10^6$ Zellen
	Zugehörige Monozyten-Fraktion	$3 \times 10^5$ Zellen

Um Untersuchungen der einzelnen Fraktionen auf Vorhandensein von GBV-C-RNA mittels RT-PCR durchzuführen, wurde die Nukleinsäure aus den entsprechenden Zellfraktionen isoliert (Kap.II, B.3.1). Die eingesetzten Zellzahlen sind aus Tab.III.19 ersichtlich.

**Tab.III.19** Zur Extraktion der Nukleinsäuren eingesetzte Anzahl der Zellen/200 µl PBS, 2 mM EDTA, 0.5 % BSA der einzelnen Zellfraktionen.

<u>Art der Markierung</u>	<u>Zellfraktion</u>	<u>Zellzahl/200µl</u>
T-Zellen-Markierung	Depleted Fraktion (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen)	$5.5 \times 10^6$ Zellen
	Zellkulturüberstand (B-Zellen und NK-Zellen)	$1.68 \times 10^6$ Zellen
	Zugehörige Monozyten-Fraktion	$1.56 \times 10^5$ Zellen
	Eluat-Fraktion (T-Zellen)	$5 \times 10^5$ Zellen
B-Zellen-Markierung	Depleted Fraktion (T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen)	$6.3 \times 10^6$ Zellen
	Zellkulturüberstand (T-Zellen und NK-Zellen)	$3.42 \times 10^6$ Zellen
	Zugehörige Monozyten-Fraktion	$3 \times 10^5$ Zellen
	Eluat-Fraktion (B-Zellen)	$5 \times 10^4$ Zellen



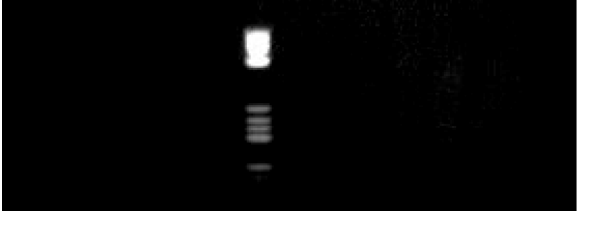

Die spezifische Umschreibung (Kap.II, B.3.5) erfolgte mit Hilfe des Primers YK877 (Kap.II, A.3.2.2). Die unter Verwendung der Primer YK874, YK877, YK875 und YK876 (Kap.II, A.3.2.2) durchgeführte semiquantitative nested PCR (Kap.II, B.7.2) ergab nach Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.1) ein 401 bp großes DNA-Fragment. GBV-C-RNA konnte in 7 der 8 untersuchten Zellfraktionen mit unterschiedlich hohen Endverdünnungen der eingesetzten cDNA nachgewiesen werden (vgl. Abb.III.22/III.23).

	<u>Zellfraktion</u>	<u>PCR</u> <u>(50% Titer*)</u>
T-Zellen-Markierung	<p><b>Depleted Fraktion (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p><b>1</b></p>	positiv ( $10^1$ )
	<p><b>Zellkulturüberstand (B-Zellen und NK-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p><b>2</b></p>	positiv ( $10^2$ )
	<p><b>Zugehörige Monozyten-Fraktion</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p><b>3</b></p>	positiv (1:4)
	<p><b>Eluat-Fraktion (T-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p><b>4</b></p>	positiv (1:2)

**Abb.III.22** Übersicht zu den Ergebnissen der semiquantitativen nested PCR einzelner Zellfraktionen nach T-Zellen-Markierung (PCR-Produkt: 401 bp).

\* 50 % Titer: Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze ein positives PCR-Ergebnis ergaben.

(1): Spur 1-5: unverdünnt; Spur 6: DNA-MG-Marker V; Spur 7-8: 1:2-Verd.; Spur 9-10: 1:4-Verd.; Spur 11-13:  $10^1$ -Verd.; Spur 14-15:  $10^2$ -Verd.; (2), (3), (4): Spur 1-6: unverdünnt; Spur 7: DNA-MG-Marker V; Spur 8-9: 1:2-Verd.; Spur 10-11: 1:4-Verd.; Spur 12-14:  $10^1$ -Verd.; Spur 15-17:  $10^2$ -Verd.

	<u>Zellfraktion</u>	<u>PCR</u> <u>(50 % Titer *)</u>
B-Zellen-Markierung	<p><b>Depleted Fraktion (T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p style="text-align: right;"><b>1</b></p>	positiv (1:8)
	<p><b>Zellkulturüberstand (T-Zellen und NK-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p style="text-align: right;"><b>2</b></p>	positiv (1:2)
	<p><b>Zugehörige Monozyten-Fraktion</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p style="text-align: right;"><b>3</b></p>	negativ
	<p><b>Eluat-Fraktion (B-Zellen)</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17</p>  <p>587 bp 458 bp/434 bp 267 bp 124 bp/123 bp</p> <p style="text-align: right;"><b>4</b></p>	positiv (1:4)

**Abb.III.23** Übersicht zu den Ergebnissen der semiquantitativen nested PCR einzelner Zellfraktionen nach B-Zellen-Markierung (PCR-Produkt: 401 bp).

\* 50 % Titer: Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze ein positives PCR-Ergebnis ergaben.  
**(1), (2), (4):** Spur 1-6: unverdünnt; Spur 7: DNA-MG-Marker V; Spur 8-9: 1:2-Verd.; Spur 10-11: 1:4-Verd.; Spur 12-14: 10<sup>1</sup>-Verd.; Spur 15-17: 10<sup>2</sup>-Verd.; **(3):** Spur 1-6: unverdünnt; Spur 7: DNA-MG-Marker V; Spur 8-9: 1:2-Verd.; Spur 10-11: 1:4-Verd.; Spur 12-13: 10<sup>1</sup>-Verd.; Spur 14-15: 10<sup>2</sup>-Verd.

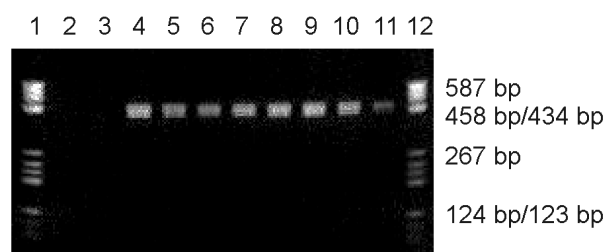
Aus den ermittelten Verdünnungsstufen (50 % Titer) für die Eluat- und Negativ-Fraktion der T- sowie B-Zellen-Markierung wurde die Zahl der Zellen berechnet, in denen ein Genomäquivalent von GBV-C (1 Genomäquivalent/x Zellen) nachweisbar ist (Kap.II, B.24). Aufgrund der unzureichenden Abtrennung der in Zellkultur adhärenen Monozyten von den in Suspension verbleibenden T- bzw. B-Zellen und NK-Zellen wurden die Zellkulturüberstand- und Monozyten-Fraktionen nicht in die Berechnungen einbezogen. Die Ergebnisse sind aus Tab.III.20 ersichtlich.

**Tab.III.20** Bestimmung "1 Genomäquivalent GBV-C/x Zellen" in einzelnen Zellfraktionen.

Art der Markierung	Zellfraktion	1 Genomäquivalent/x Zellen
T-Zellen-Markierung	Depleted Fraktion (B-, NK-Zellen, Monozyten)	1 Genomäquivalent /110.000 Zellen
	Eluat-Fraktion (T-Zellen)	1 Genomäquivalent /50.000 Zellen
B-Zellen-Markierung	Depleted Fraktion (T-, NK-Zellen, Monozyten)	1 Genomäquivalent /157.500 Zellen
	Eluat-Fraktion (B-Zellen)	1 Genomäquivalent /2.500 Zellen

Dieses Ergebnis bestätigte den durch *in situ*-Hybridisierung ermittelten Replikationsort von GBV-C in Lymphozyten. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß es sich bei den infizierten Zellen in der Mehrheit um B-Lymphozyten handelt.

Unter Verwendung der zuvor extrahierten Nukleinsäuren (s.o.) wurde nach unspezifischer Umschreibung (Kap.II, B.3.5) eine  $\beta$ -Actin-PCR (Kap.II, B.7.2) mit den Primern Actin-A1 und Actin-A2 (Kap.II, A.3.2.2) durchgeführt. Nach Agarosegel-Elektrophorese wurde für alle Zellfraktionen (vgl. Tab.III.19) eine Bande mit der erwarteten Größe von 450 bp gefunden. Für das als Negativkontrolle der  $\beta$ -Actin-PCR mitgeführte Serum des GBV-C infizierten Patienten konnte, wie erwartet, kein  $\beta$ -Actin-Amplifikat nachgewiesen werden, da es sich bei Serum um eine zellfreie Lösung handelt (vgl. Abb.III.24).



**Abb.III.24**

$\beta$ -Actin-PCR (PCR-Produkt: 450 bp) der einzelnen Zellfraktionen nach T-Zellen-Markierung (Spur 4-7) und B-Zellen-Markierung (Spur 8-11).

Spur 1 und 12: DNA-MG-Marker V; Spur 2 und 3: Serum Patient; Spur 4 und 8: Depleted Fraktion; Spur 5 und 9: Überstand-Fraktion; Spur 6 und 10: Monozyten-Fraktion; Spur 7 und 11: Eluat-Fraktion.

**Zusammenfassung “Untersuchung von B- und T-Lymphozyten auf GBV-C”**

Nach Auftrennung der PBMCs eines GBV-C infizierten Patienten in T- und B-Zellen konnte in beiden Zellfraktion GBV-C mittels RT-PCR nachgewiesen werden. In der T-Lymphozyten-Fraktion wurde 1 Genomäquivalent in 50.000 Zellen, in der B-Lymphozyten-Fraktion 1 Genomäquivalent in 2.500 Zellen bestimmt. Daraufhin wurde davon ausgegangen, daß es sich bei den GBV-C infizierten Zellen in der Mehrheit um B-Lymphozyten handelt. Dies stimmt mit der Lokalisation des *in situ*-Hybridisierungssignals in Cortextbereich des Lymphknotens (überwiegend B-Zellen) überein.

**1.3 In vitro Infektion peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) durch GB-Virus-C**

Nachdem es gelungen war, GBV-C sowohl mittels *in situ*-Hybridisierung als auch RT-PCR in Lymphozyten nachzuweisen, wurden *in vitro* humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mit einem geeigneten GBV-C-Inokulum infiziert. Bei den eingesetzten GBV-C-Inokula handelte es sich um Seren zweier Lebertransplantat-Patienten (Patient A und B; s. Kap.II, B.8.1), die zum Zeitpunkt der Blutabnahme keine weitere Virusinfektion (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HIV oder CMV) aufwiesen. Die Isolierung der PBMCs (Kap.II, B.20) erfolgte aus je 20 ml EDTA-Blut fünf gesunder, nicht GBV-C infizierter Spender (Spender 1-5). Die für die einzelnen Spender ermittelte Gesamtzellzahl und Zellebensfähigkeit (Kap.II, B.21) ist in Tab.III.21 dargestellt.

**Tab.III.21** Übersicht zur ermittelten Gesamtzellzahl sowie Zellebensfähigkeit (%) nach PBMC-Isolierung aus fünf gesunden, nicht GBV-C infizierten Spendern.

<u>Blutspender</u>	<u>Gesamtzellzahl</u>	<u>Cell viability (%)</u>
Spender-1	$5 \times 10^6$	99.1 %
Spender-2	$1.6 \times 10^7$	98.7 %
Spender-3	$1.9 \times 10^7$	99.3 %
Spender-4	$2 \times 10^7$	99.3 %
Spender-5	$2.2 \times 10^6$	98.1 %

Die *in vitro*-Infektion der PBMCs von Spender 1-5 wurde anfangs ohne Phytohämagglutinin (PHA)/Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulierung (s. Kap.II, B.25) durchgeführt.

Die PBMCs aus Spender-1 wurden in getrennten Ansätzen mit je 1 ml GBV-C-positivem Serum des Patienten A ( $10^6$  Genomäquivalente/ml) bzw. des Patienten B ( $10^6$  Genomäquivalente/ml) pro  $10^6$  Zellen infiziert. Zur Überprüfung der Existenz genomischer GBV-C-



RNA im Zellkulturüberstand des Kontrollansatzes (PBMCs ohne GBV-C-Inokulation) und der beiden Infektionsansätze wurde eine RT-PCR (Kap.II, B.7) am Tag 2, 8, 10, 18 und 22 n.I. durchgeführt (vgl. Tab.III.22).

**Tab.III.22** Nachweis genomischer GBV-C-RNA im Zellkulturüberstand mittels RT-PCR nach *in vitro* GBV-C-Inokulation von PBMCs aus Spender-1.

<u>Zeit nach Infektion</u>	<u>RNA-Nachweis in Kontrolle</u>	<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten A</u>	<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten B</u>
Tag 2	–	+ (unverdünnt)	+ (unverdünnt)
Tag 8	–	+ (unverdünnt)	+ (10 <sup>2</sup> -Verdünnung)
Tag 10	–	+ (unverdünnt)	+ (unverdünnt)
Tag 18	–	+ (10 <sup>1</sup> -Verdünnung)	+ (unverdünnt)
Tag 22	–	–	+ (unverdünnt)

Im letzten der insgesamt fünf Waschschrte nach GBV-C-Inokulation wurde in der RT-PCR keine GBV-C-RNA nachgewiesen. Ein sogenannter „Input“ an GBV-C durch das Inokulum wurde somit ausgeschlossen. Von Tag 2 bis Tag 18 bzw. 22 n.I. war ein kontinuierlicher Nachweis des Genomstranges von GBV-C im Zellkulturüberstand möglich. Durch semiquantitative PCR (Kap.II, B.7.2) der GBV-C positiven Überstände konnte bei den mit Inokulum des Patienten A infizierten PBMCs in der 3. Woche (Tag 18) und bei den mit Inokulum des Patienten B infizierten PBMCs bereits zu Beginn der 2. Woche (Tag 8) ein Titeranstieg beobachtet werden. In den Überständen der Negativkontrolle war keine GBV-C-RNA nachweisbar.

Im Gegensatz zu Spender-1 wurden die PBMCs aus Spender-2 und Spender-3 in getrennten Ansätzen mit je 0.5 ml GBV-C-positivem Serum (anstatt 1.0 ml Serum, vgl. Tab.III.22) des Patienten A bzw. Patienten B pro 10<sup>6</sup> Zellen infiziert. Alle Ansätze (Infektions- und Kontrollansätze) wurden doppelt ausgeführt. Die RT-PCR-Überprüfung der Zellkulturüberstände (Kontroll- und Infektionsansätze) auf GBV-C am Tag 2, 6, 10, 14, 20 und 28 n.I. ergab für den Spender-2 die in Tab.III.23 und für den Spender-3 die in Tab.III.24 dargestellten Ergebnisse.

**Tab.III.23** Nachweis genomischer GBV-C-RNA im Zellkulturüberstand mittels RT-PCR nach *in vitro* GBV-C-Inokulation von PBMCs aus Spender-2.

<sup>1)</sup> Mikroskopischer Betrachtung zufolge begannen die Zellen zu diesem Zeitpunkt abzusterben.

<u>Zeit nach Infektion</u>	<u>RNA-Nachweis in Kontrolle</u>		<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten A</u>		<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten B</u>	
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 1
Tag 2	–	–	+ (unverdünnt)	+ (unverdünnt)	–	+ (unverdünnt)
Tag 6	–	–	–	+ (unverdünnt)	–	–
Tag 10	–	–	–	–	–	–
Tag 14	–	–	+ (unverdünnt)	–	–	–
Tag 20 <sup>1)</sup>	–	–	–	–	–	–
Tag 28	–	–	–	–	–	–

**Tab.III.24** Nachweis genomischer GBV-C-RNA in Zellkulturüberstand mittels RT-PCR nach *in vitro* GBV-C-Inokulation von PBMCs aus Spender-3.

<sup>1)</sup> Mikroskopischer Betrachtung zufolge begannen die Zellen allmählich abzusterben.

<u>Zeit nach Infektion</u>	<u>RNA-Nachweis in Kontrolle</u>		<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten A</u>		<u>RNA-Nachweis im Überstand nach PBMC-Infektion mit Inokulum des Patienten B</u>	
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 1
Tag 2	–	–	+ (unverdünnt)	+ (unverdünnt)	+ (unverdünnt)	–
Tag 6	–	–	+ (unverdünnt)	–	–	–
Tag 10	–	–	–	–	–	–
Tag 14	–	–	+ (unverdünnt)	–	–	–
Tag 20 <sup>1)</sup>	–	–	–	–	–	–
Tag 28	–	–	–	–	–	–

Im letzten der insgesamt fünf Waschschrte nach GBV-C-Inokulation sowie in den zwei mitgeführten Negativkontrollen wurde, wie zuvor bei Spender-1, keine GBV-C-RNA nachgewiesen. Im Vergleich zu GBV-C infizierten PBMCs aus Spender-1 war die genomische RNA von GBV-C nach Inokulation mit Serum des Patienten A nur bis maximal 14 Tage n.I. in den Zellkulturüberständen nachweisbar. Ein ab Tag 20 n.I. festgestelltes Zellsterben könnte möglicherweise die Ursache sein. Nach einer zuvor negativen RT-PCR am Tag 10 bzw. Tag 6 n. I. konnte am Tag 14 n. I. GBV-C wieder im Überstand nachgewiesen werden.

Ein RNA-Nachweis von GBV-C nach PBMC-Infektion des Spenders-2 und Spenders-3 mit dem Inokulum des Patienten B war nur am Tag 2 n.I. möglich.

Insgesamt betrachtet wurde eine geringere Infektionsrate nach Inokulation mit 0.5 ml (vgl. Tab.III.23/24) anstatt 1.0 ml GBV-C positivem Serum (vgl. Tab.III.22) pro  $10^6$  Zellen festgestellt. Dies zeigte sich noch deutlicher bei Spender-4 und Spender-5. Nach Infektion der PBMCs mit je 0.25 ml GBV-C-positivem Serum aus Patient A bzw. B pro  $10^6$  Zellen

wurde weder direkt 4 h n.I. noch zu einem späterem Zeitpunkt GBV-C im Zellkulturüberstand nachgewiesen.

Um eventuell eine Erhöhung der Infektionsrate bei der *in vitro*-Infektion von PBMCs mit GBV-C zu erreichen, wurden die folgenden *in vitro*-Infektionen unter PHA/LPS-Stimulation und Interleukin-2 (IL-2)-Zugabe zum Medium ausgetestet (s. Kap.II, B.25). Nach Stimulation mit LPS und PHA und damit der Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, bewirkt IL-2 erfahrungsgemäß eine Erhöhung der Infektionsfähigkeit. Die Lebensdauer der Zellen kann dadurch nicht verlängert werden.

Die PBMCs wurden aus 20 ml EDTA-Blut des Spenders-2 und Spenders-3 isoliert (Kap.II, B.20). Nach der Isolierung wurde eine Zellausbeute von  $2 \times 10^7$  Zellen (Zellebensfähigkeit: 99.4 %) für den Spender-2 und von  $1.6 \times 10^7$  (Zellebensfähigkeit: 99.7 %) für den Spender-3 ermittelt. Nach PHA/LPS-Stimulation wurden die PBMCs aus Spender-2 mit je  $1 \text{ ml}/10^6$  Zellen und die PBMCs aus Spender-3 mit je 0.65 ml GBV-C-Inokulum des Patienten A/ $10^6$  Zellen infiziert. Die RT-PCR-Untersuchung der Zellkulturüberstände und Zellaliquots (6 Stunden n.I. sowie am Tag 7, 11, 15, 19, 23 und 27 n.I.) auf GBV-C-RNA ergab die in Tab. III.25 und Tab.III.26 dargestellten Werte.

**Tab.III.25** Nachweis genomischer GBV-C-RNA in Zellkulturüberständen und Zellaliquots mittels RT-PCR nach *in vitro* GBV-C-Inokulation ( $1 \text{ ml}/10^6$  Zellen) PHA/LPS-stimulierter PBMCs aus Spender-2 (n.g. = nicht getestet; unver. = unverdünnt).

<sup>1)</sup> Mikroskopischer Betrachtung zufolge begannen die Zellen allmählich abzusterben.

<u>Zeit nach Infektion</u>	<u>RNA-Nachweis in Kontrolle</u> (Ansatz 1)		<u>RNA-Nachweis in Kontrolle</u> (Ansatz 2)		<u>RNA-Nachweis nach Inokulation in:</u> (Ansatz 1)		<u>RNA-Nachweis nach Inokulation in:</u> (Ansatz 2)	
	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>
6 h	–	n. g.	–	n. g.	+ (unver.)	+ (unver.)	+ (unver.)	+ (unver.)
Tag 7	–	–	–	–	+ (unver.)	+ (unver.)	+ (unver.)	+ (unver.)
Tag 11	–	–	–	–	–	–	+ (unver.)	+ (unver.)
Tag 15	–	–	–	–	–	–	–	+ (unver.)
Tag 19 <sup>1)</sup>	–	–	–	–	–	–	+ (unver.)	–
Tag 23	–	–	–	–	–	–	–	–
Tag 27	–	–	–	–	–	–	–	–

**Tab.III.26** Nachweis genomischer GBV-C-RNA in Zellkulturüberständen und Zellaliquots mittels RT-PCR nach *in vitro* GBV-C-Inokulation ( $0.65 \text{ ml}/10^6$  Zellen) PHA/LPS-stimulierter PBMCs aus Spender-3 (n.g. = nicht getestet; unver. = unverdünnt).

<sup>1)</sup> Mikroskopischer Betrachtung zufolge begannen die Zellen allmählich abzusterben.

<u>Zeit nach Infektion</u>	<u>RNA-Nachweis in Kontrolle (Ansatz 1)</u>		<u>RNA-Nachweis in Kontrolle (Ansatz 2)</u>		<u>RNA-Nachweis nach Inokulation in: (Ansatz 1)</u>		<u>RNA-Nachweis nach Inokulation in: (Ansatz 2)</u>	
	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>	<u>Überstand</u>	<u>Zellen</u>
6 h	–	n. g.	–	n. g.	+ (unver.)	+ (unver.)	–	+ (unver.)
Tag 7	–	–	–	–	+ (unver.)	+ (unver.)	+ (unver.)	–
Tag 11	–	–	–	–	+ (unver.)	+ (unver.)	–	–
Tag 15	–	–	–	–	–	–	–	–
Tag 19 <sup>1)</sup>	–	–	–	–	–	–	–	–
Tag 23	–	–	–	–	–	–	–	–
Tag 27	–	–	–	–	–	–	–	–

Der letzte Waschschritt war in den Lymphozyten von Spender-2 und Spender-3 negativ für GBV-C. Bei Spender-2 konnte 6 Stunden n.I. sowohl im Überstand der infizierten PBMCs als auch in den zugehörigen Zellen GBV-C-RNA nachgewiesen werden. Im Ansatz 1 war GBV-C anschließend nur für eine Woche nachweisbar, während im Ansatz 2 ein kontinuierlicher Nachweis bis zum Tag 15 n.I. in den Zellen und Tag 19 n.I. im Überstand, mit Ausnahme des Tages 15 n.I., möglich war. Die Überstände und Zellaliquots der Kontrollansätze waren zu jedem Zeitpunkt für GBV-C negativ.

Lymphozyten des Spenders-3 hingegen zeigten im ersten Inokulationsansatz eine kontinuierliche Produktion der GBV-C-RNA bis zum Tag 11 n.I. Im zweiten Ansatz wurde GBV-C 6 Stunden n.I. im Zellaliquot, jedoch nicht im Überstand nachgewiesen. Dieser wurde am Tag 7 n.I. positiv für GBV-C.

#### **Zusammenfassung “*In vitro*-Infektion von PBMCs durch GBV-C”**

Im Verlaufe dieser Arbeit waren PBMCs *in vitro* kurzzeitig mit GBV-C infizierbar und vermehrten sich für einen Zeitraum von 2-3 Wochen mit niedrigen Titern. Eine optimale Infektionsrate der Zellen wurde dabei bei Inokulation mit einem Genomäquivalent/Zelle gefunden. Durch Stimulierung der PBMCs mit LPS, PHA und IL-2 wurde keine Verbesserung hinsichtlich der Infektionsrate der Zellen erreicht.

## **1.4 Epidemiologische Studie mit knochenmarktransplantierten Patienten**

Nachdem mittels *in situ*-Hybridisierung und RT-PCR die Lymphozyten als ein möglicher Replikationsort von GBV-C ermittelt wurden, sollte eine epidemiologische Studie mit knochenmarktransplantierten (KMT) Patienten weitere Hinweise zum Ort der Replikation und einer eventuellen Krankheitsassoziation von GBV-C liefern. Aus einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit Dr. Gero Massenkeil und Dr. Franz Maximilian Zwiebel der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum Charité in Berlin konnten Seren von 45 KMT-Patienten vor (S1) und nach der Transplantation (S2, S3, S4) gewonnen werden. Die Patienten wurden auf eine bestehende, durch den Nachweis der GBV-C-RNA im Serum, bzw. auf eine bereits abgelaufene Infektion mit GBV-C, durch den spezifischen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen das GBV-C E2-Antigen, untersucht.

Der Nachweis der GBV-C-RNA erfolgte nach Extraktion der Nukleinsäure der im Serum enthaltenen Viren (Kap.II, B.3.1) und spezifischer Umschreibung unter Verwendung des Primers YK877 (Kap.II, B.3.5) mit Hilfe einer semiquantitativen nested PCR (Kap.II, B.7.2.2) mit den Primern YK874, YK877, YK875 und YK876 und der Nachweis der Anti-E2-Antikörper mit Hilfe des käuflichen ELISA „µPLATE Anti-HGenv“ (Kap.II, B.19.1). Die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchung sind in Tab.III.27 dargestellt.

**Tab.III.27** Ergebnisse der epidemiologische Untersuchung (mittels RT-PCR und ELISA) von 45 KMT-Patienten auf eine Infektion mit GBV-C.  
S1: Serum vor der Transplantation; S2, S3, S4: Serum nach der Transplantation.

Patient ( <sup>1</sup> ) Gruppe	Serum	PCR (Titer)	ELISA
1 <sup>(5)</sup>	S1	-	-
	S2	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
2 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-4</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
3 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
4 <sup>(5)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
5 <sup>(5)</sup>	S1	-	-
	S2	-	+
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
6 <sup>(6)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	+	-
	S3	(unverdünnt)	-
	S4	- + (10 <sup>-4</sup> )	-
7 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
	S3	-	-
8 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	+
9 <sup>(6)</sup>	S1	+	-
	S2	(unverdünnt)	-
	S3	-	-
10 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-

Patient ( <sup>1</sup> ) Gruppe	Serum	PCR (Titer)	ELISA
11 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	+
12 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-4</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
13 <sup>(5)</sup>	S1	-	-
	S2	+	-
	S3	(unverdünnt) -	+
14 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
15 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
16 <sup>(5)</sup>	S1	-	-
	S2	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S3	-	+
17 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-4</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S4	+ (10 <sup>-3</sup> )	+
	S5	+ (10 <sup>-2</sup> )	+
	S6	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
18 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S3	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
19 <sup>(2)</sup>	S1	-	+
	S2	-	+
	S3	-	+
20 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-1</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-2</sup> )	+
	S3	+ (10 <sup>-1</sup> )	+

Patient ( <sup>1</sup> ) Gruppe	Serum	PCR (Titer)	ELISA
21 <sup>(6)</sup>	S1	+	-
	S2	(unverdünnt)	-
	S3	-	-
22 <sup>(6)</sup>	S1	+	-
	S2	(unverdünnt)	-
	S3	-	-
	S4	- + (unverdünnt)	-
23 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	+	-
24 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
25 <sup>(3)</sup>	S1	-	-
	S2	-	+
26 <sup>(2)</sup>	S1	-	+
	S2	-	+
27 <sup>(6)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	-	+
	S3	-	+
28 <sup>(2)</sup>	S1	-	+
	S2	-	+
29 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
30 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
31 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	+	-
		(unverdünnt)	-

Patient ( <sup>1</sup> ) Gruppe	Serum	PCR (Titer)	ELISA
32 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
33 <sup>(3)</sup>	S1	-	-
	S2	-	+
34 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
35 <sup>(2)</sup>	S1	-	+
	S2	-	+
36 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
37 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
38 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
39 <sup>(6)</sup>	S1	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	S2	-	-
	S3	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
40 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
41 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-
42 <sup>(6)</sup>	S1	+	-
	S2	(unverdünnt)	-
	S3	-	-
43 <sup>(2)</sup>	S1	-	+
	S2	-	+
44 <sup>(4)</sup>	S1	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
	S2	+ (10 <sup>-3</sup> )	-
45 <sup>(1)</sup>	S1	-	-
	S2	-	-

Bei 10 (22.2 %) von 45 KMT-Patienten (100 %) wurde weder eine bestehende noch bereits abgelaufene GBV-C-Infektion (vgl. <sup>(1)</sup> in Tab.III.27) nachgewiesen.

5/45 KMT-Patienten (11.1 %) hatten bereits vor KMT eine abgelaufene GBV-C-Infektion, d.h. es war kein Nachweis von GBV-C-RNA, jedoch von IgG-Antikörpern gegen das GBV-C E2-Antigen möglich (vgl. <sup>(2)</sup> in Tab.III.27). 2/45 KMT-Patienten waren erst nach KMT für Anti-E2-Antikörper positiv (vgl. <sup>(3)</sup> in Tab.III.27).

Bei 28 (62.2 %) von 45 KMT-Patienten wurde mindestens in einem der in die Untersuchung mit einbezogenen Seren GBV-C-RNA nachgewiesen. Davon hatten 16 Patienten (35.5 %) über den gesamten betrachteten Zeitraum eine bestehende Infektion mit GBV-C, die z.T. mit einer Abnahme des Virustiter nach KMT verbunden war (vgl. <sup>(4)</sup> in Tab.III.27).

5 Patienten (11.1 %) wurden erst nach KMT mit GBV-C infiziert, was vermutlich auf kontaminierte(s) Blut/Blutprodukte bzw. auf die Transplantation eines Knochenmarks aus einem GBV-C-infizierten Spender zurückzuführen war (vgl. <sup>(5)</sup> in Tab.III.27). Zwei dieser 5 Patienten konnten die GBV-C-Infektion anschließend durch Bildung von Anti-E2-Antikörpern klären.

7 Patienten (14.5 %), mit bereits vor der KMT vorhandener GBV-C-Infektion, zeigten ca. einen Monat nach KMT eine „Elimination“ bzw. ein Absinken des Virustiters von GBV-C bis unter die Nachweisgrenze der RT-PCR (vgl. <sup>(6)</sup> in Tab.III.27). Bei einem Patienten (Patient 27) konnte die Klärung der GBV-C-Infektion auf Bildung von IgG-Antikörpern gegen das GBV-C E2-Antigen zurückgeführt werden, wohingegen die restlichen 6 Patienten (Patient 6, 9, 21, 22, 39 und 42) keine Anti-E2-Antikörperbildung zeigten. Die PCR-Untersuchung einer weiteren Serumprobe (mindestens 8 Monate nach KMT) der bis dato noch lebenden „Eliminierer ohne Antikörper-Bildung“ 6, 22, 39 und 42 (s. Tab.III.28) ergab einen positiven Nachweis von GBV-C-RNA bei Patient 6, 22 und 39. Die durch semiquantitative PCR bestimmten Virustiter erreichten dabei mindesten den ursprünglichen Ausgangswert. Patient 42 blieb GBV-C-RNA negativ.

Tab.III.28 Epidemiologische Studie von KMT-Patienten mit „Elimination“ von GBV-C.

Patient	Tage vor (-)/nach (+) KMT	PCR	ELISA
Patient 6	+ 14	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	+ 27	+ (unverdünnt)	-
	+ 134	-	-
	+ 904	+ (10 <sup>-4</sup> )	-
Patient 22	+ 8	+ (unverdünnt)	-
	+ 22	-	-
	+ 29	-	-
	+ 583	+ (unverdünnt)	-
Patient 39	- 7	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
	+ 35	-	-
	+ 302	+ (10 <sup>-2</sup> )	-
Patient 42	+ 1	+ (unverdünnt)	-
	+ 36	-	-
	+ 254	-	-

### Zusammenfassung „KMT-Patienten-Studie“

In der KMT-Patienten-Studie konnte bei einem Teil der Patienten nach der Konditionierung (Ganzkörperbestrahlung, Verabreichung von Cyclophosphamid) für die KMT eine „Elimination“ bzw. ein Absinken des Virustiters von GBV-C bis unter die Nachweisgrenze der RT-PCR festgestellt werden. ELISA-Daten zufolge (Anti-E2-Antikörper negativ) konnte dies jedoch in der Regel nicht auf die Bildung von Anti-E2-Antikörpern zurückgeführt werden. Aufgrund des in der *in situ*-Hybridisierung ermittelten Replikationsortes von GBV-C, den Lymphozyten, unterstützte die vorübergehende Konzentrationsabnahme und das Verschwinden des Virus nach KMT zusätzlich die Annahme, daß es sich bei den Lymphozyten um den primären Replikationsort handelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das Absinken des Virustiters auf einer durch die Suppression verursachten allgemeinen Stoffwechselverminderung beruht.

## 2. Herstellung rekombinanter Proteine zum Nachweis von Antikörpern gegen GBV-C

Für den diagnostischen Nachweis einer GBV-C-Infektion sollte ein für GBV-C spezifischer ELISA und Western Blot etabliert werden. Das hierzu notwendige GBV-C-spezifische Antigen sollte nach Amplifikation verschiedener Genomabschnitte von GBV-C mittels RT-PCR und der Klonierung dieser Amplifikate in einen geeigneten Vektor exprimiert und aufgereinigt



werden. Anschließend sollten antigenspezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden. Das aufgereinigte Protein und die monoklonalen Antikörper sollten zur Etablierung eines ELISAs und Western Blots eingesetzt werden.

## **2.1 Gewinnung und Präparation von GBV-C-Amplifikaten**

RNA von GBV-C wurde aus Serum eines GBV-C infizierten Patienten isoliert (Kap.II, B.3.1) und unspezifisch mit Hexanukleotiden und “Superscript™ II Reverser Transkriptase” in cDNA umgeschrieben (Kap.II, B.3.5).

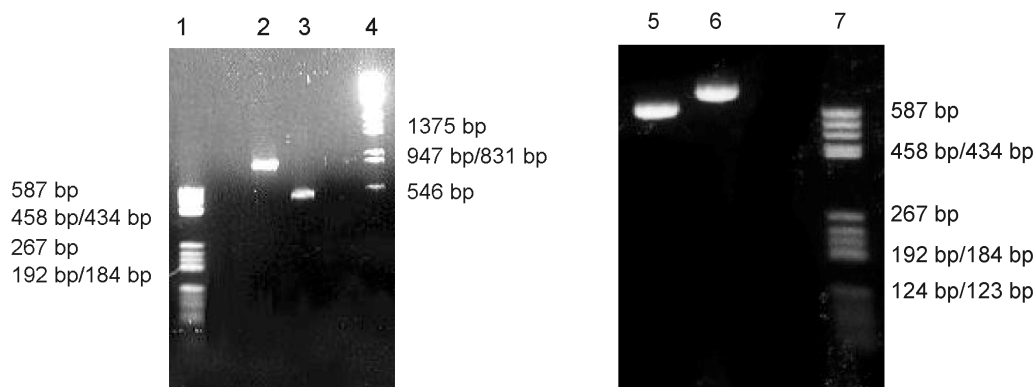
Anhand der veröffentlichten Sequenz von GBV-C (Genbankzutritt U36380) wurden die Primer HG-E1s, HG-E2s, HG-E3s, HG-E4s, HG-E9s, HG-E10s, HG-E2a, HG-E4a, HG-E5a, HG-E6a, HG-E7a, HG-E8a und HG-E11a (Kap.II, A.3.2.2) konstruiert. Unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen wurden selektiv einzelne Genomabschnitte der Strukturgene E1 und E2 von GBV-C amplifiziert (s. Tab.III.29).

**Tab.III.29** Übersicht zu den GBV-C-Amplifikaten aus dem Bereich der Strukturgene E1 und E2.

<u>GBV-C-Amplifikat</u>	<u>Primerkombination</u> (1.PCR)	<u>Primerkombination</u> (nested PCR)
575 bp-Amplifikat (gesamter E1-Bereich)	HG-E9s und HG-E11a	HG-E10s und HG-E2a
509 bp-Amplifikat (C-Terminus von E2)	HG-E3s und HG-E8a	HG-E4s und HG-E7a
645 bp-Amplifikat (N-Terminus von E2)	HG-E1s und HG-E6a	HG-E2s und HG-E4a
819 bp-Amplifikat (N-Terminus von E2)	HG-E1s und HG-E6a	HG-E2s und HG-E5a
[1131 bp-Amplifikat (gesamter E2-Bereich)	HG-E1s und HG-E8a	HG-E2s und HG-E7a]

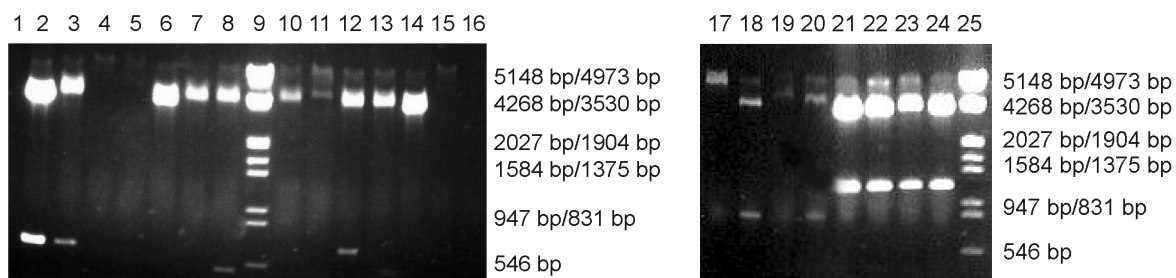
Die nested PCR (Kap. II, B.7.1/B.7.3) ergab nach Analyse durch Agarosegel-Elektrophorese (Kap.II, B.5.1) einzelne Banden von 575 bp, 509 bp, 645 bp und 819 bp. Der Versuch, ein 1131 bp großes E2-Fragment mit den Primern HG-E1s, HG-E8a, HG-E2s und HG-E7a zu amplifizieren, gelang nicht. Stattdessen wurde das den gesamten E2-Bereich überspannende 1131 bp große DNA-Fragment durch Ligation des 645 bp-Fragments mit dem 509 bp-Fragment (s. Kap.III., B.1.1.1) gewonnen.

Die Isolierung der GBV-C-Amplifikate erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung über ein Agarosegel (vgl. Kap.II, B.6). Die Überprüfung der Gelextraktionen ergab nach Abschätzung für alle DNA-Fragmente eine Konzentration von ca. 10 ng/µl (s. Abb.III.25).



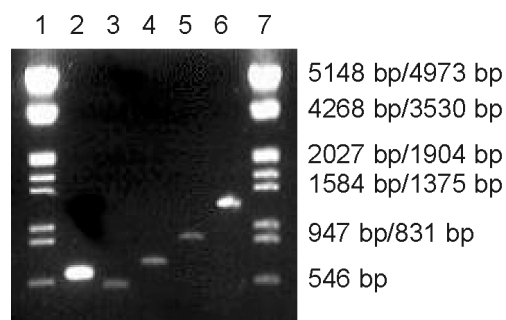
**Abb.III.25** GBV-C-Amplifikate nach Gelextraktion.  
 Spur 1 und 7: DNA-MG-Marker V; Spur 4: DNA-MG-Marker III; Spur 2: 819 bp-E2-Amplifikat; Spur 3: 509 bp-E2-Amplifikat; Spur 5: 575 bp-E1-Amplifikat; Spur 6: 645 bp-E2-Amplifikat.

Das 575 bp-, 509 bp-, 645 bp- und 819 bp-DNA-Fragment wurde mit dem Vektor “pCR®II TOPO” (vgl. Anhang) und das 1131 bp-DNA-Fragment (E2-Religationsfragment) wurde mit dem Vektor “pCR2.1” ( vgl. Anhang) ligiert (s. Kap.II, B.4.3). Nach Transformation aller Ligationsansätze in kompetente *TOP10F<sup>-</sup>-E.coli*-Zellen (Kap.II, B.8.2) wurden ÜN-Kulturen angelegt (Kap.II, B.1) und die Plasmid-DNA in Mini-Präp-Format (Kap.II, B.2.1) isoliert. Die EcoRI-Restriktionsanalyse der Plasmide zeigte eine erfolgreiche Ligation aller fünf DNA-Fragmente (s. Abb.III.26).



**Abb.III.26** EcoRI-Restriktionsanalyse einzelner Klone nach Ligation, Transformation und Plasmidisolierung.  
 Spur 1-5: “575 bp-Fragment”-Klone; Spur 6-8/10-11; “509 bp-Fragment”-Klone; Spur 12-16: “645 bp-Fragment”-Klone; Spur 17-20: “819 bp-Fragment”-Klone; Spur 21-24: “1131 bp-Fragment”-Klone. Spur 9 und 25: DNA-MG-Marker III.

Für die Umklonierung der DNA-Fragmente in den EcoRI-geschnittenen Expressionsvektor wurden diese durch EcoRI-Restriktion (s. Kap.II, B.4.1) aus dem TA-Klonierungsvektor herausgeschnitten und nach präparativer Gelelektrophorese gemäß der in Kap.II, B.6 beschriebenen Methode aus dem Gel isoliert (vgl. Abb.III.27).

**Abb.III.27**

Isolierung des 575 bp-, 509 bp-, 645 bp-, 819 bp- und 1131 bp-Fragments aus dem Vektor pCRII-Topo bzw. pCR2.1 durch EcoRI-Restriktion.

Spur 1 und 7: DNA-MG-Marker III; Spur 2: 575 bp-Fragment; Spur 3: 509 bp-Fragment; Spur 4: 645 bp-Fragment; Spur 5: 819 bp-Fragment; Spur 6: 1131 bp-Fragment.

## **2.2 Präparation der Expressionsvektoren**

Nachdem zuvor sowohl mittels einer prokaryotischen Expression in *E. coli* JM109 bzw. M15 (pRep4) und dem Vektor pQE30, 31 bzw. 32 als auch mittels einer eukaryotischen Expression in Sf9-Insektenzellen und dem Vektor pBlueBacHis2 A, B bzw. C keine Proteinexpression erreicht wurde, wurde ein prokaryotisches Expressionssystem unter Verwendung des *E. coli*-Stammes TOP10 bzw. LMG194 (Kap.II, A.2.1) und des Vektorsystems pBAD/His (vgl. Kap.II, A.3.1 und Anhang) ausgetestet.

CaCl<sub>2</sub>-kompetente TOP10- sowie LMG194-*E.coli*-Zellen wurden hergestellt (Kap.II, B.8.1). Die zur Expression notwendigen Vektoren pBAD/His A, B, C und LacZ wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl lyophilisiert. Nach Transformation von je 1 µg lyophilisierter Vektor-DNA in TOP10- bzw. LMG194-*E.coli*-Zellen (Kap.II, B.8.1) und Mini-Präparation der Plasmid-DNA (Kap.II, B.2.1) ergab die EcoRI-Restriktionsanalyse eine erfolgreiche Transformation aller Vektoren. Eine Midi-Präparation der Plasmid-DNA (Kap.II, B.2.2) ergab für den Vektor pBAD/His A eine DNA-Konzentration von 0.169 µg/µl, für pBAD/His B 0.532 µg/µl, für pBAD/His C 0.221 µg/µl und pBAD/His LacZ 0.286 µg/µl. Um die EcoRI-flankierten GBV-C-Fragmente (s.o.) *in frame* in den Expressionsvektor zu klonieren, wurde die Vektor-DNA durch EcoRI-Restriktion linearisiert und nach präparativer Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert (Kap.II, B.6). Dabei ergab sich eine DNA-Konzentration von 100 ng/µl für pBAD/His A bzw. pBAD/His C und von 50 ng/ul für pBAD/His B. Um eine Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden, wurde dieser dephosphoryliert (Kap.II, B.4.2) und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit einer Endkonzentration von 50 ng/µl aufgenommen.

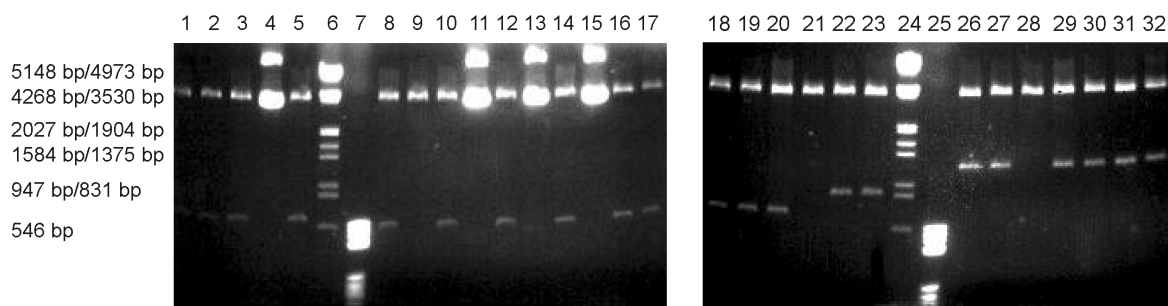
### 2.3 Ligation der GBV-C-Amplifikate und Transformation

Das 509 bp- und 1131 bp-Fragment des E2-Strukturgens wurde mit dem Vektor pBAD/His A und das 575 bp-Fragment des E1-Strukturgens sowie das 645 bp- und 819 bp-Fragment des E2-Strukturgens mit dem Vektor pBAD/His B ligiert (vgl. Tab.III.30).

**Tab.III.30** Übersicht zur Auswahl des Expressionsvektors zur *in frame*-Ligation der E1- und E2-Fragmente.

<u>Expressionsvektor</u>	<u>EcoRI restringiertes DNA-Fragment (begrenzende Primer)</u>
pBAD/His A	509 bp-E2-Fragment (HG-E4s + HG-E7a) 1131 bp-E2-Fragment (HG-E2s + HG-E7a)
pBAD/His B	575 bp-E1-Fragment (HG-E10s + HG-E2a) 645 bp-E2-Fragment (HG-E2s + HG-E4a) 819 bp-E2-Fragment (HG-E2s + HG-E5a)

Anschließend wurden je 3 µl der Ligationsansätze sowie 1 µl des Vektors pBAD/His lacZ (Positivkontrolle für Proteinexpression), pBAD/His A und pBAD/His B (Negativkontrolle für Proteinexpression) in CaCl<sub>2</sub>-kompetente TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert (Kap.II, B.8.1) und auf LB-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin selektiert. Nach ÜN-Kultur (Kap.II, B.1) und Mini-Präparation der Plasmid-DNA (Kap.II, B.2.1) wurde durch KpnI/HindIII-Restriktion das jeweilige Insert in mindestens einem der Klone nachgewiesen (vgl. Abb.III.28).



**Abb.III.28** KpnI/HindIII-Restriktionsanalyse einzelner Klone nach Ligation mit dem Expressionsvektor, Transformation in TOP10 *E. coli* und Plasmidisolierung.

Spur 1-5: 575 bp-Expressionsvektor; Spur 6 und 24: DNA-MG-Marker III; Spur 7 und 25: DNA-MG-Marker V; Spur 8-17: 509 bp-Expressionsvektor; Spur 18-20: 645 bp-Expressionsvektor; Spur 21-23: 819 bp-Expressionsvektor; Spur 26-32: 1131 bp-Expressionsvektor.

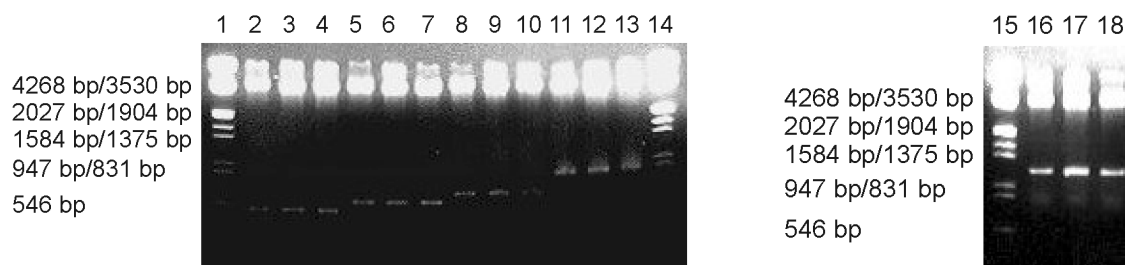
Unter Verwendung des pBAD Forward Primers und der entsprechenden Antisense-Primer der Inserts wurden PCRs (Kap.II, B.7) durchgeführt. Ein Amplifikat konnte gewonnen (vgl. Tab.III.31) und somit auf eine Sense-Orientierung des Inserts geschlossen werden. Bei Antisense-Orientierung des Inserts wäre aufgrund der Primeranordnung keine Amplifizierung möglich gewesen. Die Sequenzierung der Amplifikate (Kap.II, B.9) ergab für alle GBV-C-

Fragmente eine korrekte Insertionsstelle und die Übereinstimmung mit der GBV-C-Sequenz bis auf einige konservative Punktmutationen (vgl. Tab.III.31). Der "645 bp-Fragment"-Klon wies jedoch im Bereich nt 46-58 des EcoRI-restringierten 645 bp-Fragmentes eine zusätzliche Nukleotidinsertion auf, was eine Verschiebung im Leseraster zur Folge hatte. Eine Proteinexpression war somit nicht mehr möglich.

**Tab.III.31** E1- und E2-Amplifikate nach PCR mit dem Antisense-Primer und pBAD Forward Primer und das Ergebnis der Amplifikatsequenzierung.

Klon	PCR-Primer	Amplifikat	Ergebnis der Sequenzierung (mit PCR-Primern)
575 bp-E1-Klon	pBAD Forward Primer/ HG-E2a	817 bp	Insertionsstelle o.k.; Punktmutationen
509 bp-E2-Klon	pBAD Forward Primer/ HG-E7a	760 bp	Insertionsstelle o.k.; Punktmutationen
645 bp-E2-Klon	pBAD Forward Primer/ HG-E4a	887 bp	Insertionsstelle o.k.; Verschiebung des Leserasters durch Nukleotidinsertion im Bereich der nt 46-58 des EcoRI-restringierten Fragmentes
819 bp-E2-Klon	pBAD Forward Primer/ HG-E4a	886 bp	Insertionsstelle o.k.; Punktmutationen
1131 bp-E2-Klon	pBAD Forward Primer/ HG-E4a	895 bp	Insertionsstelle o.k.; Punktmutationen

Nachdem ein Plasmid mit korrekter Insertion des jeweiligen Fragments bestimmt wurde (s.o.), wurde für den Fall, daß es sich bei den zu exprimierenden Proteinen um für *E. coli* toxische Proteine handelte, die Plasmid-DNA zusätzlich in CaCl<sub>2</sub>-kompetente LMG194-*E. coli*-Zellen transformiert (Kap.II, B.8.1). Dieser Bakterienstamm erlaubt unter Verwendung von RM-Medium mit Glucose (s. Kap.II, A.6.1.1) eine niedrige Basalexpression des Proteins. Desweiteren wurden der Vektor pBAD/His LacZ, pBAD/His A und pBAD/His B transformiert. Eine nach ÜN-Kultur und Mini-Präparation durchgeführte EcoRI-Restriktionsanalyse zeigte die erfolgreiche Transformation aller Plasmide (s. Abb.III.29).



**Abb.III.29** EcoRI-Restriktionsanalyse einzelner Klone nach Transformation der E1- und E2-Expressionsvektoren in LMG 194 *E. coli* und Plasmidisolierung.

Spur 1/14/15: DNA-MG-Marker III; Spur 2-4: 509 bp-Vektor; Spur 5-7: 575 bp-Vektor; Spur 8-10: 645 bp-Vektor; Spur 11-13: 819 bp-Vektor; Spur 16-18: 1131 bp-Vektor.

## 2.4 Optimierung der Expressionbedingungen

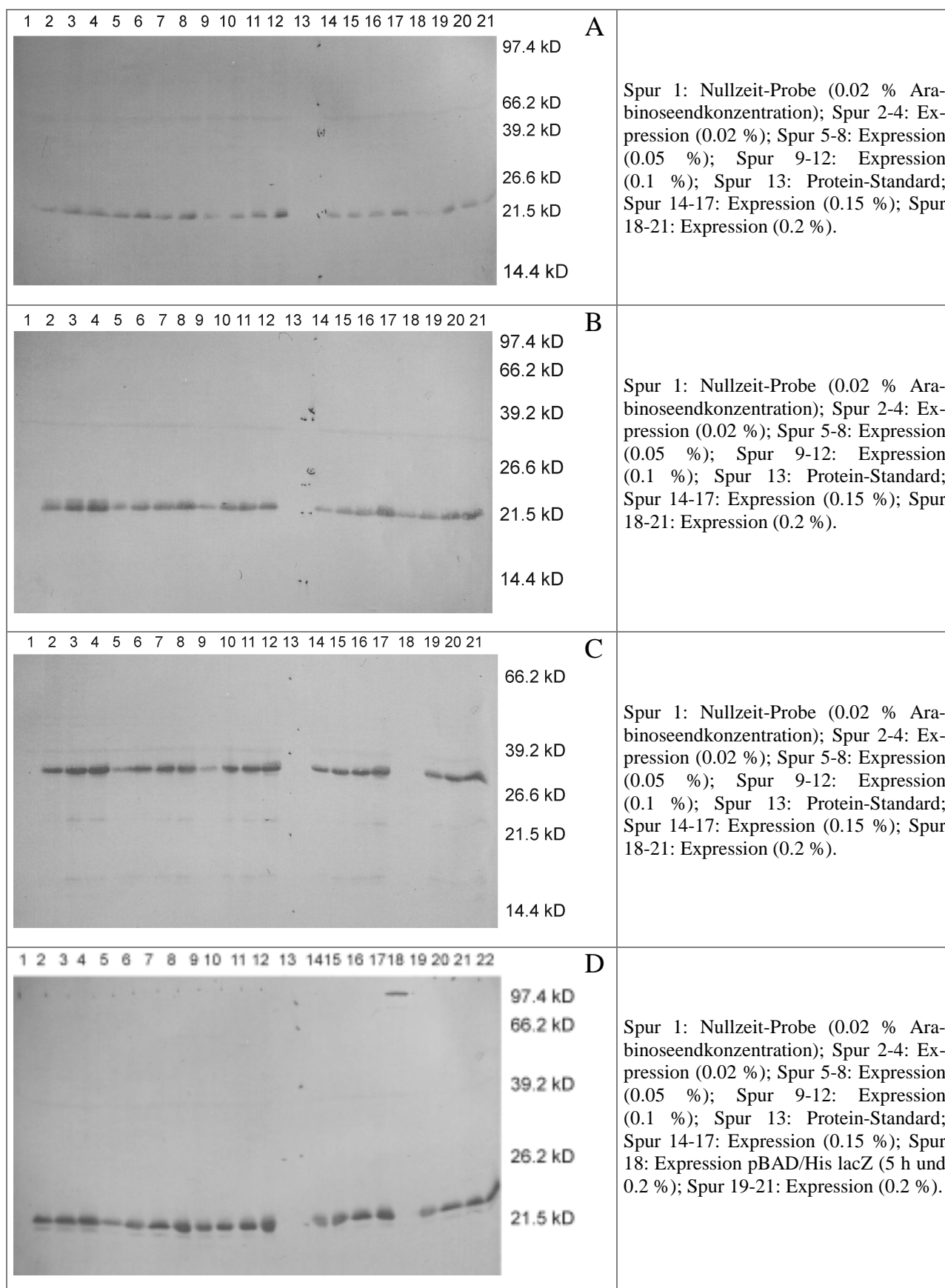
Jedes rekombinante Protein besitzt unterschiedliche Charakteristika, die die Expression beeinflussen können. Daher wurde unter Verwendung geeigneter Negativ- und Positivkontrollen die optimale Arabinosekonzentration und Induktionszeit in einer sogenannten Pilotexpression für jedes Protein ermittelt. Die Expression des „leeren“ Vektors pBAD/His A bzw. pBAD/His B wurde als Negativkontrolle, die des Vektors pBAD/His LacZ als Positivkontrolle der Expression eingesetzt. Die Expression der E1- bzw. E2-Klone sollte zu den in Tab.III.32 aufgezeigten rekombinanten Proteinen führen. Die molekulare Masse der Proteine wurde durch den N-terminalen Aminosäureschwanz um ca. 3 kD vergrößert.

**Tab.III.32** Berechnete molekulare Masse der rekombinanten Proteine.  
Der N-terminale Aminosäureschwanz erhöht die molekulare Masse um 3 kD.

<u>DNA-Fragment (Aminosäureanzahl des Peptids)</u>	<u>Molekulare Masse des rekombinanten Proteins</u>
575 bp-E1-Fragment (= 191 As)	20.7 kD + 3 kD
509 bp-E2-Fragment (= 169 As)	18.6 kD + 3 kD
645 bp-E2-Fragment (= 215 As)	23.2 kD + 3 kD
819 bp-E2-Fragment (= 273 As)	29.3 kD + 3 kD
1131 bp-E2-Fragment (= 377 As)	41.1 kD + 3 kD
pBAD/His lacZ	120 kD

Die Pilotexpression wurde zuerst mit den in TOP10 *E. coli* transformierten Klonen durchgeführt (Kap.II, B.10.1). Zur Induktion der Expression wurden Arabinose-Endkonzentrationen von 0.00002 %, 0.0002 %, 0.002 %, 0.02 % und 0.2 % ausgetestet. Die Vorbereitung der „Nullzeit-Probe“ (vor Induktion) sowie der 1h-, 2h, 3h-, 4h- und 5h-Probe (nach Induktion) erfolgte zunächst nach dem Protokoll für lösliche und unlösliche Proteine und ergab nach Analyse durch SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot nur für die Überstandfraktion (lösliche Proteine) von pBAD/HislacZ eine 120 kD-Bande bei einer Arabinosekonzentration von 0.02-0.2 %. Auch die Pilotexpression (gleiche Bedingungen) der in LMG194 *E. coli* transformierten Klonen ergab mit Ausnahme der Positivkontrolle kein Protein.

Eine weitere Expression mit den TOP10 *E. coli* Klonen wurde mit Arabinosekonzentrationen von 0.02 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.15 % und 0.2 % ausgetestet. Zusätzlich wurden die Proben anhand eines zweiten Protokolls („Preparation of Samples“) vorbereitet, was sich insbesondere durch das Fehlen der sogenannten „Einfrier-Auftau“-Zyklen von dem zuvor angewendeten Protokoll unterschied. Die Proben wurden direkt in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde Protein von pBAD/HislacZ und von dem 575 bp-E1-, 509 bp-, 819 bp- und 1131 bp-E2-Klon in allen Proben, außer den zugehörigen Nullzeit-Proben und der Negativkontrolle, nachgewiesen (s. Abb.III.30).



**Abb.III.30** Pilotexpression des 575 bp-E1-Klons (**A**), des 509 bp-E2-Klons (**B**), des 819 bp-E2-Klons (**C**) und des 1131 bp-E2-Klons (**D**) in *E. coli* TOP10 (pBAD/His-Vektorsystem) unter variierender Arabinoseendkonzentration (0.02-0.2 %) und Induktionszeit (2-5 h).

Alle Proteine, mit Ausnahme des “44.5 kD-Proteins” (vgl. Abb.III.30), zeigten ein ihrer berechneten molekularen Masse entsprechendes Laufverhalten (s. Tab.III.32). Das spezifisch im Western Blot nachgewiesene 44.5 kD-Protein lief auf Höhe der 21.5 kD-Bande des Molekulargewichtsmarkers. Die Expression des 645 bp-Klons ergab, wie erwartet, kein rekombinantes Protein. Tab.III.33 gibt eine Übersicht für die aus der Pilotexpression ermittelten optimalen Expressionsbedingungen (Arabinosekonzentration, Induktionszeit) der einzelnen Proteine.

**Tab.III.33** Optimale Konditionen (Induktionszeit und Arabinosekonzentration) zur Expression der E1- bzw. E2-DNA-Fragmente des GB-Virus-C im Bakterienstamm *E.coli TOP10* bei einer Temperatur von 37°C.

Rekombinantes Protein	Optimale Arabinosekonzentration (Endkonzentration)	Optimale Induktionszeit
191 As Peptid (= 575 bp-E1-Fragment)	10 % (0.1 %)	5 Stunden
169 As Peptid (= 509 bp-E2-Fragment)	2 % (0.02 %)	5 Stunden
273 As Peptid (= 819 bp-E2-Fragment)	2 % (0.02 %)	5 Stunden
377 As Peptid (= 1131 bp-E2-Fragment)	10 % (0.1 %)	5 Stunden

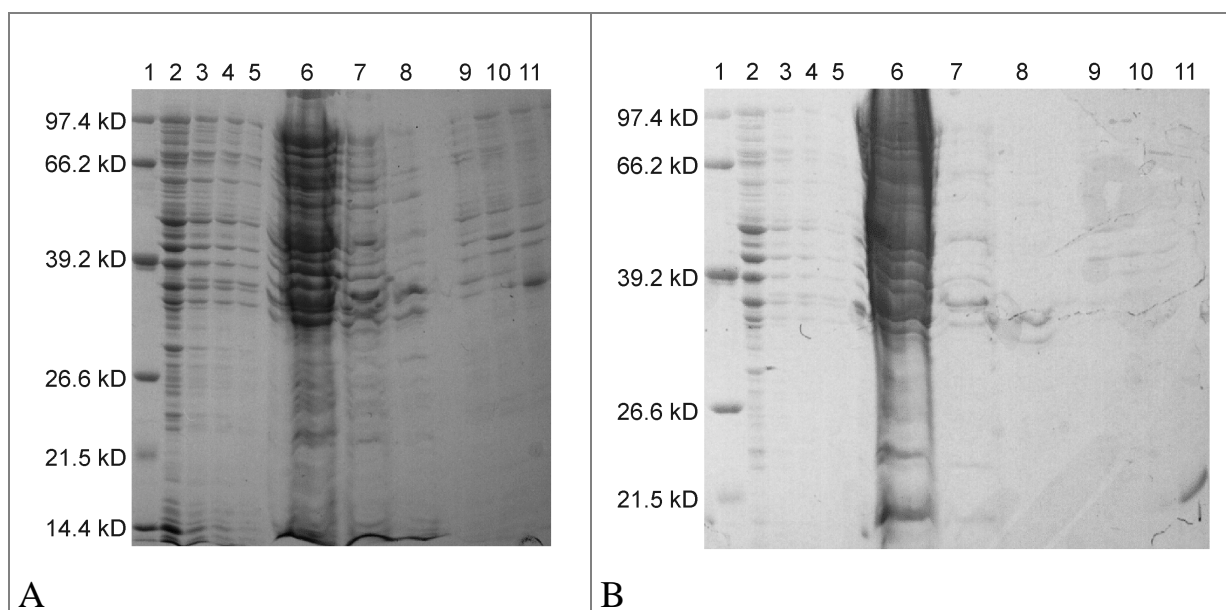
## **2.5 “Scale-up” Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine**

Nach Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen wurde eine Proteinexpression aus einer 50 ml-Kultur des 819 bp-E2-Klones (s. Kap.II, B.10.2) durchgeführt. Da nicht bekannt war, ob es sich um lösliches bzw. unlösliches Protein handelt, wurde sowohl die native als auch denaturierende *E. coli*-Zellysat-Herstellung und Proteinreinigung (Kap.II, B.10.3/ B.10.4) durchgeführt. Unter denaturierenden Bedingungen wurde dabei eine größere Proteinausbeute erzielt. Eine anschließend unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte “Scale-up”-Expression aus einer 50 ml- und 250 ml-Kultur des 575 bp-E1-Klones sowie des 509 bp-, 819 bp- und 1131 bp-E2-Klones ergab nach Analyse der einzelnen Reinigungsschritte geringere Proteinmengen im Eluat als im Zellrest-Pellet (nach Zellyse). Die Verwendung von Lyse-Puffer mit 8 M Harnstoff bewirkte wie eine verminderte Wachstum- und Expressionstemperatur (30°C) keine größere Proteinausbeute.

Alle folgenden “Scale-up”-Expressionen fanden aus 250 ml-Kulturen statt. Die Zellysat-Herstellung erfolgte nach einem vom ursprünglichen Protokoll abgewandelten Verfahren (s. Kap.II, B.10.3). Hierbei wurde das durch Einschlußkörper-Bildung aggregierte und unlösliche Fremdprotein nach Nukleaseverdau der Nukleinsäuren und Extraktion von Proteasen wieder in Lösung gebracht. Nach Dialyse und elektrophoretischer Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde sowohl nach Silberfärbung als auch nach einem Western Blot eine



Proteinbande des 819 bp-E2-Fragmentes und 1131 bp-E2-Fragmentes in der Eluatfraktion identifiziert (vgl. Abb.III.31).



**Abb.III.31** Analytische SDS-PAGE der einzelnen Reinigungsschritte bei der Präparation des C-terminal verkürzten E2-Proteins (32.3 kD; (A)) und des gesamten E2-Proteins (44.1 kD; (B)).

Spur 1: Protein-Standard, low range; Spur 2: Waschschrift I nach Benzonase/Lysozym-Inkubation; Spur 3: Waschschrift II nach Benzonase/Lysozym-Inkubation; Spur 4: Waschschrift III nach Benzonase/Lysozym-Inkubation; Spur 5: Waschschrift IV nach Benzonase/Lysozym-Inkubation; Spur 6: Zell-Pellet nach Lyse; Spur 7: Lysat; Spur 8: Überstand nach Bindung des Lysats an die Säule; Spur 9: Waschschrift pH 6.0; Spur 10: Waschschrift pH 5.3; Spur 11: Eluat.

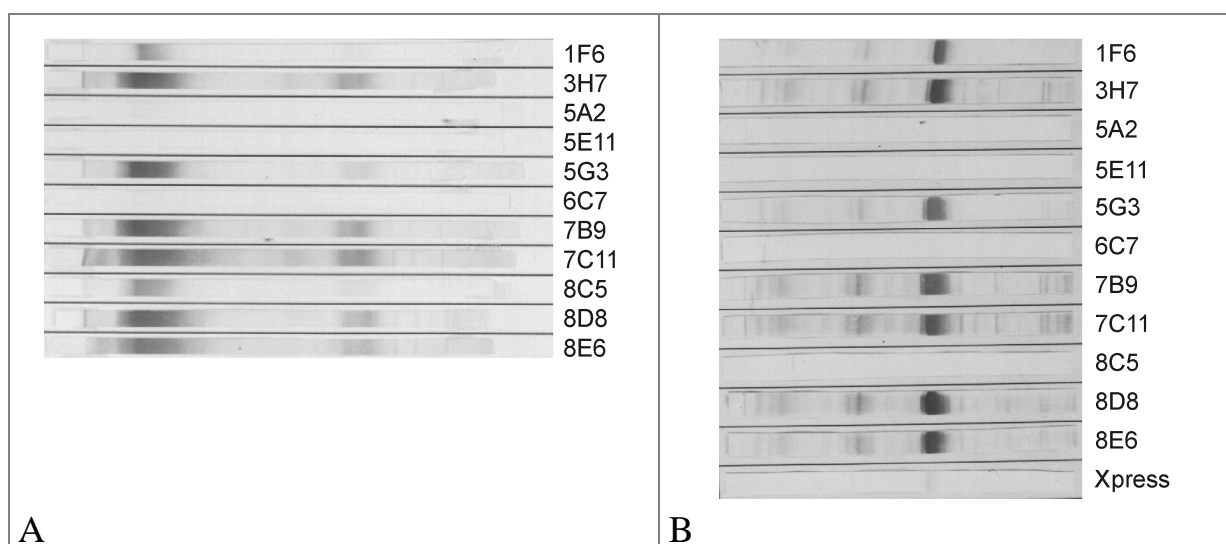
Vergleiche der Proteinmengen zwischen Zellrest- und Eluatfraktion ergaben einen geringeren Proteinanteil im Eluat. Versuche, höhere Proteinmengen zu erzielen, schlugen aufgrund der eingeschränkten maximalen Bindungskapazität der Chromatographiesäulen fehl. Für das 575 bp-E1-Fragment wurde nur eine schwache (nicht gezeigt) und für das 509 bp-E2-Fragment keine Proteinbande der erwarteten Größe nachgewiesen. Die ermittelten Proteinkonzentrationen (Kap.II, B.11) lagen im Bereich von 60 bis 450 µg/ml (vgl. Tab.III.34).

**Tab.III.34** Proteinkonzentration und Gesamtausbeute an Protein nach Expression der E1- und E2-Fragmente in TOP10 *E. coli* (250 ml Kultur) und anschließender Proteinreinigung (denaturierend).

<u>Rekombinantes Protein</u>	<u>Proteinkonzentration</u>	<u>Gesamtmenge an Protein</u>
191 As Peptid (= 575 bp-E1-Fragment)	60 - 100 µg/ml	0.36 – 0.6 mg
169 As Peptid (= 509 bp-E2-Fragment)	kein Protein erhalten	
273 As Peptid (= 819 bp-E2-Fragment)	350 - 660 µg/ml	2.1 – 2.4 mg
377 As Peptid (= 1131 bp-E2-Fragment)	400 - 450 µg/ml	2.4 – 2.7 mg

## 2.6 Herstellung und Austestung monoklonaler Anti-E2-Antikörper

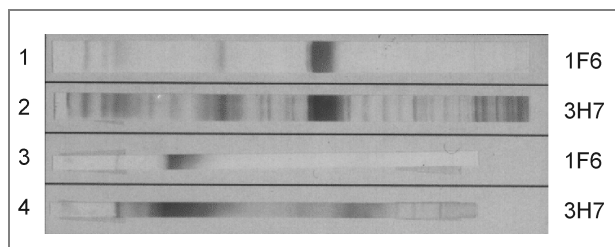
Nach Expression und Aufreinigung des 377As-Peptides aus dem Bereich des E2-Strukturgens wurden monoklonale Antikörper in der Ratte hergestellt (Kap.II, B.13). Die von insgesamt 11 Hybridomen gewonnenen Zellkulturüberstände wurden auf Antikörperproduktion und -spezifität im Western Blot (s. Kap.II, B.18) gegen das 377 Aminosäuren und das C-terminal verkürzte 273 Aminosäuren lange Peptid ausgetestet (vgl. Abb.III.32). Die hierzu notwendigen Western Blot-Streifen wurden hergestellt (Kap.II, B.18). Der Zellkulturüberstand (Anti-E2-Antikörper-haltig) wurde in einer 1:20-Verdünnung und das Konjugat (Anti-rat-IgG-POD-Fab-Fragment) in einer 1:500-Verdünnung eingesetzt (Kap.II, A.7.2).



**Abb.III.32** Austestung der Hybridom-Zellkulturüberstände (1F6-8E6) auf Antikörperproduktion und -spezifität gegenüber dem 377 As Protein (A) und dem 273 As Protein (B).

Xpress: Western Blot mit dem "Xpress"-Epitop (im pBAD/His-Vektor) spezifischen Anti-Xpress-Antikörper.

Von den 11 zu testenden Zellkulturüberständen zeigten acht (1F6, 3H7, 5G3, 7B9, 7C11, 8C5, 8D8 und 8E6) eine spezifische Reaktivität gegenüber dem 377As-Peptid und mit Ausnahme des Überstandes 8C5 auch gegenüber dem 273As-Peptid (s. Abb.III.32), d.h. die zugehörigen Hybridome produzieren spezifische gegen das E2-Antigen gerichtete Antikörper. Aus dem Vergleich des Western Blots mit dem 377As-Peptid und dem Western Blot mit dem 273As-Peptid ergab sich eine größere Bandenschärfe mit dem Verkürzungsfragment. Desweiteren wiesen die Zellkulturüberstände 1F6, 3H7 und 5G3 für beide Peptide die geringste unspezifische Hintergrundfärbung auf. Durch Reklonierung der Hybridome 1F6 und 3H7 wurden die eigentlichen monoklonalen Antikörper gewonnen, die ihrerseits wieder im Western Blot gegen das 377As-Peptid und 273As-Peptid ausgetestet wurden (s. Abb.III.33).

**Abb.III.33**

Austestung der Zellkulturüberstände auf Antikörper-spezifität nach Reklonierung der Hybridome 1F6 und 3H7.

Streifen 1 und 2: 273 As Antigen; Streifen 3 und 4: 377 As Antigen.

Die monoklonalen Antikörper der Hybridome 1F6 und 3H7 zeigten, wie schon vor Reklonierung, gegenüber beiden Peptiden eine spezifische Immunreaktion, wobei der 3H7-Antikörper jedoch wesentlich mehr unspezifische Bindungsreaktion (s. Anzahl der unspezifischen Banden) aufwies. Weitere Arbeiten, wie die Charakterisierung der E2-Bindedomäne des monoklonalen Antikörpers und die Etablierung eines ELISA, wurden daher mit dem Anti-E2-Antikörper 1F6 durchgeführt.

## 2.7 Charakterisierung der E2-Bindedomäne des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers "1F6"

Aufgrund der auch zum C-terminalen Verkürzungsfragment von E2 bestehenden Immunreaktivität des monoklonalen Antikörpers konnte von vornherein der C-Terminus des E2-Antigens als Bindestelle ausgeschlossen und somit die weiteren Untersuchungen auf das 273As-Peptid eingeschränkt werden. Ziel dieser Arbeit war es, nach Spaltung des Antigens mittels spezifischer Proteasen, die entstandenen Fragmente definierter Länge auf Immunreaktivität gegenüber dem monoklonalen Antikörper im Western Blot zu untersuchen und damit die Bindedomäne ausfindig zu machen (sogenanntes "Peptid Mapping").

Durch Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (Kap.II, B.12) des 273As-Peptides (vgl. Abb.III.34) war es möglich, drei geeignete Proteasen mit einer möglichst geringen Anzahl an Spaltstellen hinsichtlich des Antigens zu ermitteln (Tab.III.35).

	1	11	21	31	41	51	
1	SQGAPASVLG	SRPF <sup>E</sup> AGLTW	QSCSCRSNGS	RVPTG <sup>E</sup> RVVW <sup>E</sup>	RGNVTLLC <sup>D</sup>	PNGPWVWVPA	60
61	LCQAIGW <sup>D</sup> DP	ITHWSHGQ <sup>N</sup> Q	WPLSCPQFVY	GAVSVTCVWG	SVSWFASTGG	RDS <sup>K</sup> VD <sup>D</sup> VW <sup>S</sup> SL	120
121	VPVGSASCTI	AALGSS <sup>D</sup> RD <sup>T</sup>	VV <sup>E</sup> LS <sup>E</sup> WGIP	CATCIL <sup>D</sup> RRP	ASCGTCVR <sup>D</sup> C	WP <sup>E</sup> TG <sup>S</sup> VR <sup>F</sup> FP	180
181	FHRCGAGPRL	TR <sup>D</sup> L <sup>E</sup> AVPVA	NRTTPFTIRG	PLGNQGRGNP	VRSP <sup>L</sup> GF <sup>G</sup> SY	TMT <sup>K</sup> IR <sup>D</sup> SL <sup>H</sup>	240
241	LV <sup>K</sup> CPTPAI <sup>E</sup>	PPTGTGF <sup>G</sup> FFP	GVPL <sup>N</sup> NCML	LGT			

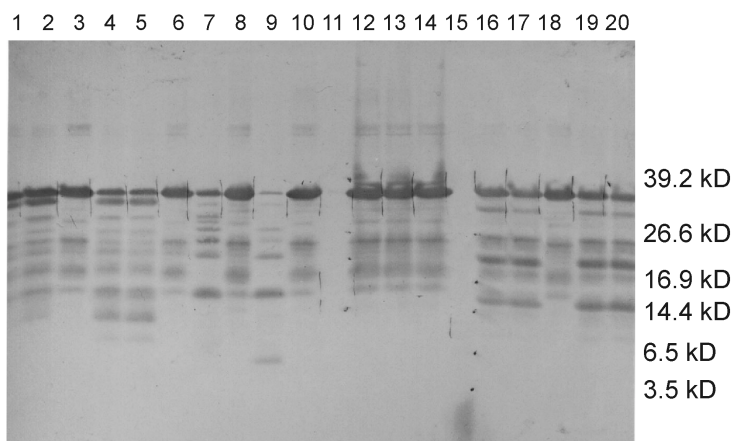
**Abb.III.34** Aminosäuresequenz des C-terminalen Verkürzungsfragments von E2 (273 As) mit spezifischen Spaltstellen der Endoproteinase Lys-C (grün), der Endoproteinase Glu-C (rot) und der Endoproteinase Asp-N (gelb).

**Tab.III.35** Typ, Spezifität und Anzahl der spezifischen Spaltstellen der zur Spaltung des C-terminalen E2-Verkürzungsfragmentes (273 As) eingesetzten Proteasen.

Bei quantitativer, d.h. vollständiger Proteolyse spaltet die Endoproteinase Lys-C (Jekel *et al.*, 1983; Ahmed *et al.*, 1986), die Endoproteinase Glu-C (Houmard *et al.*, 1972) und die Endoproteinase-Asp-N (Drapeau G.R., 1980) entsprechend ihrer Spezifität alle Bindungen und erzeugt damit einen äquimolaren Peptidsatz.

<u>Protease</u>	<u>Typ/Spezifität</u>	<u>Spezifische Spaltstellen</u>	<u>Äquimolarer Peptidsatz bei quantitativer Proteolyse [Molekulare Masse]</u>
Endoproteinase Lys-C (30 kD)	Serinprotease / Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Lysin	3	9 As [1.1 kD] 30 As [3.1 kD] 114 As [12.3 kD] 120 As [12.9 kD]
Endoproteinase Glu-C (27kD)	Serinprotease / Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Glutamat	8	3 / 4 / 15 / 21 / 22 / 23 / 27 As 55 As [6.0 kD] 103 As [11.0 kD]
Endoproteinase Asp-N (27kD)	Metalloprotease / Hydrolyse von Peptidbindung N-terminal von Aspartat und Cysteinsäure	10	2 / 3 / 12 / 18 / 20 / 22 / 24 / 37 / 43 / 44 / 48 As

Nach Spaltung von je 100 µg Protein (Kap.II, B.14) durch Endoproteinase Lys-C (Enzymmenge: 5 µg; Inkubationstemperatur: 37 °C), Endoproteinase Glu-C (Enzymmenge: 5 µg bzw. 10 µg; Inkubationstemperatur: 25°C) bzw. Endoproteinase Asp-N (Enzymmenge: 0.1 µg bzw. 0.2 µg; Inkubationstemperatur: 37°C) unter den entsprechenden Pufferbedingungen (Kap.II, A.7.2) wurde folgende Ergebnisse erzielt (vgl. Abb.III.35):



**Abb.III.35** Western Blot mit monoklonalem Antikörper des Hybridoms 1F6 nach Spaltung des 273 As-Antigens mittels spezifischer Proteasen.

**Endoproteinase Asp-N-Spaltung** (Spur 1-6): Spur 1: 0.1  $\mu\text{g}$  Enzym + 1 h Spaltzeit; Spur 2: 0.2  $\mu\text{g}$  + 1 h; Spur 3: 1h-Kontrolle (ohne Enzym); Spur 4: 0.1  $\mu\text{g}$  + 18 h; Spur 5: 0.2  $\mu\text{g}$  + 18 h; Spur 6: 18 h-Kontrolle.

**Endoproteinase Lys-C** (Spur 7-10): Spur 7: 5  $\mu\text{g}$  + 1 h; Spur 8: 1h-Kontrolle; Spur 9: 5  $\mu\text{g}$  + 18 h; Spur 10: 18 h-Kontrolle.

**Endoproteinase Glu-C** (Spur 16-20): Spur 16: 5  $\mu\text{g}$  + 1 h; Spur 17: 10  $\mu\text{g}$  + 1 h; Spur 18: 1 h-Kontrolle; Spur 19: 5  $\mu\text{g}$  + 18 h; Spur 20: 10  $\mu\text{g}$  + 18 h.

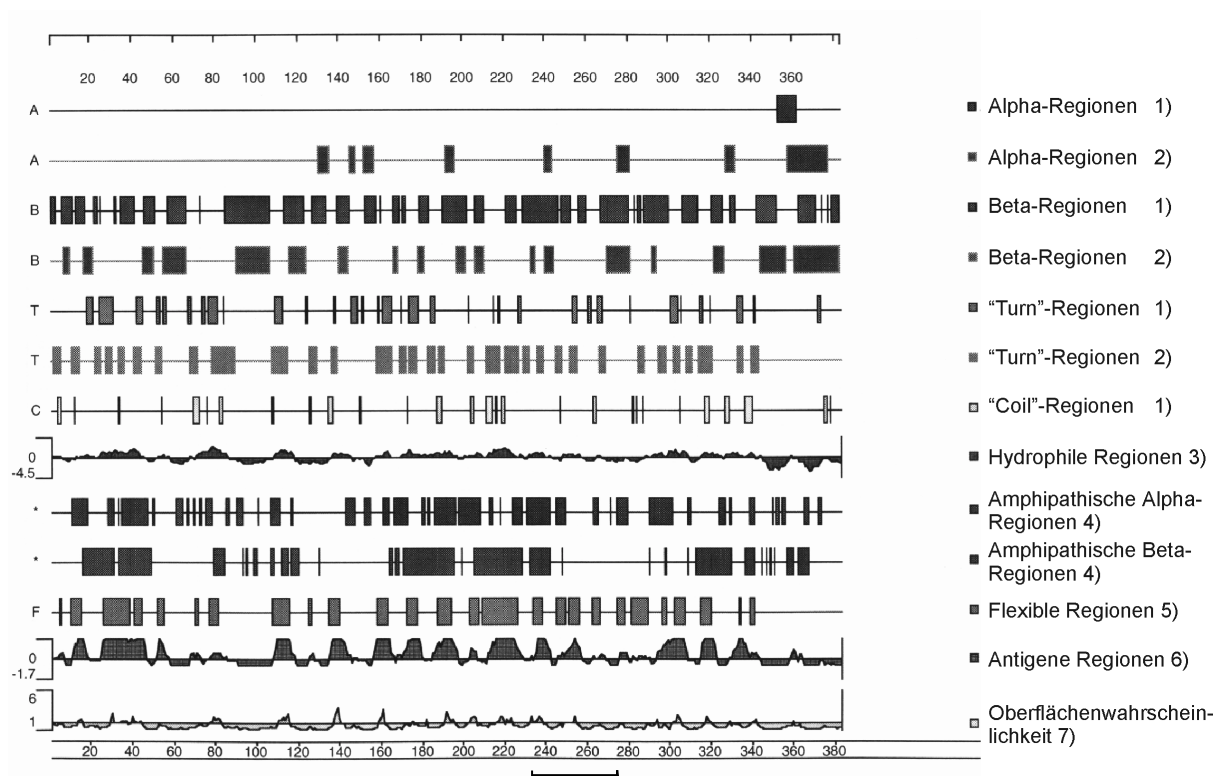
Spur 11: Protein-Standard, low range; Spur 12: 273 As-Protein, ohne Inkubation; Spur 13: 273 As-Protein, 37°C Inkubation; Spur 14: 273 As-Protein, 25 °C Inkubation; Spur 15: Polypeptid-Standard.

- Eine enzymatische Spaltung fand prinzipiell statt, wie aus einem Vergleich der Ansätze mit/ohne Enzym ersichtlich ist. Nach 18 Stunden wurde eine weitgehend vollständige Spaltung des Proteins erreicht (vgl. Spur 4, 5, 9, 19 und 20).
- Nach Inkubation des Proteins bei 37°C bzw. 25°C ohne Enzym wurde keine unspezifische Spaltung festgestellt (s. Spur 12-14).
- Eine eventuell durch den jeweiligen Proteasepuffer hervorgerufenen unspezifische Spaltung wurde nicht analysiert (Vergleich dialysiertes Protein [Spur 3, 6, 8, 10, 18] / nicht dialysiertes Protein [Spur 13, 14]).
- Nach 18 stündiger Proteolyse wurden nach Coomassie-Färbung die kleinsten Proteinbanden in Höhe der 3.5 kD Bande des Molekulargewichtsmarkers nachgewiesen (Spur 9). Es handelte sich hierbei um das 30 As (3.1 kD) und 39 As lange Peptid (4.2 kD: 3.1 kD + 1.1 kD) nach Proteinspaltung mit Endoproteinase Lys-C. Im Western Blot wurde dann jedoch nur für das 39 As lange Peptid (Proteinbande bei 4.2 kD) eine Immunreaktion mit dem Anti-E2-Antikörper nachgewiesen (vgl. Spur 9). Demnach bindet der monoklonale Antikörper 1F6 im C-terminalen Bereich des E2-Verkürzungsfragments (s. Abb.III.36).

	1	11	21	31	41	51	
1	SQGAPASVLG	SRPFEAGLTW	QSCSCRSNGS	RVPTGERVWE	RGNVTLLCDC	PNGPWVWVPA	60
61	LCQAIGWGDP	ITHWSHGQNO	WPLSCPQFVY	GAVSVTCVWG	SVSWFASTGG	RDSKVDVWSL	120
121	VPVGSASCTI	AALGSSDRDT	VVELSEWGIP	CATCILDRRP	ASCGTCVRDC	WPETGSVRFP	180
181	FHRCGAGPRL	TRDLEAVPVA	NRTTPFTIRG	PLGNQGRGNP	VRSPLGFGSY	TMTKIRDSLH	240
241	LVKCPTPAIE	PPTGTFGFFP	GVPPLNNCML	LGT			

**Abb.III.36** Bindedomäne (As 235-273 des E2-Verkürzungsfragments; grau unterlegt) des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers (aus dem Hybridom 1F6).

Anhand des für das gesamte E2-Hüllprotein ermittelten Hydropathie-Diagramms nach Kyte-Doolittle und des Diagramms zur Bestimmung der Oberflächenwahrscheinlichkeit (nach Emimi) sowie des antigenen Index (nach Jameson-Wolf) wurde die Bindedomäne des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers größtenteils als hydrophiler und oberflächenorientierter Bereich mit hoher Antigenität analysiert (vgl. Abb.III.37).



**Abb.III. 37** Charakterisierung der E2-Bindedomäne (As 235-273) des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers: Hydrophile, antigene und oberflächenorientierte Regionen.

1) nach Garnier-Robson 2) nach Chou-Fasman 3) nach Kyte-Doolittle 4) nach Eisenberg 5) nach Karplus-Schulz 6) nach Jameson-Wolf 7) nach Emimi

## 2.8 Etablierung eines GBV-C-ELISA-Testsystems

Nach Expression und Aufreinigung des C-terminal verkürzten (273 As) und des gesamten E2-Proteins (377 As) von GBV-C wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Elena Roguinskaia vom Max von Pettenkofer-Institut ein ELISA zum Nachweis GBV-C-spezifischer Antikörper etabliert. Neben verschiedenen Antigen- (1:2 bis 1:300), Serum- (1:20 bis 1:200) und Konjugatverdünnungen (1:1000 bis 1:4000) wurden u.a. auch hinsichtlich Zusammensetzung (mit Tween bzw. ohne Tween) und pH-Wert (pH 9.0, pH 8.4 bzw. pH 7.6) unterschiedliche Puffer sowie Blockinglösungen mit 2 % bzw. 3 % BSA ausgetestet. Desweiteren wurden Unterschiede in Bezug auf die Bindungskapazität des Antigens nach Inkubation mit monoklonalem Anti-E2-Antikörper bzw. ohne monoklonalen Antikörper überprüft. Als Negativ- bzw. Positivkontrollen wurden zuvor mittels des käuflichen ELISA "µPLATE Hgenv" auf GBV-C untersuchte Seren eingesetzt. Optimale ELISA-Resultate wurden dabei mit einer Antigenverdünnung von 1:2 bis 1:10, einer Konjugatverdünnung von 1:2000, einer Serumverdünnung von 1:60, PBS mit einem pH-Wert im Bereich von 7.4 bis 7.6 und einer Blocking-Lösung mit 3 % BSA erzielt (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde nach der Vorbeschichtung der Mikrotiterplatte mit monoklonalem Antikörper (1:20-Verdünnung) eine höhere Bindungskapazität des Antigens festgestellt, wobei mit dem C-terminalen Verkürzungsfragment im Vergleich zum Gesamtprotein eine höherer Spezifität, d.h. ein niedrigeres Hintergrundsignal erreicht wurde (s. Tab. III.36).

**Tab.III.36** ELISA-Spezifität des 377 As Antigens im Vergleich zum 273 As Antigen (1:2- bzw. 1:5-Verdünnung) mit bzw. ohne monoklonalen Anti-E2-Antikörper.

Antigen		377 As E2-Protein				273 As E2-Protein			
E2-Ak		-	+	-	+	-	+	-	+
Antigen-verd.		1:2	1:2	1:5	1:5	1:2	1:2	1:5	1:5
Extinktion bei 405 nm	Positiv-	0.455	0.557	0.787	1.228	0.750	1.423	0.979	1.529
		0.554	0.355	0.391	1.583	0.850	1.142	0.808	1.447
	Negativseren	0.244	0.204	0.246	0.666	0.320	0.172	0.157	0.192
		0.275	0.245	0.733	0.594	0.230	0.166	0.210	0.196
		0.261	0.384	0.213	0.464	0.230	0.168	0.157	0.160
		0.152	0.076	0.247	0.165	0.298	0.238	0.255	0.172

Prinzipiell konnte unter Verwendung des rekombinanten E2-Proteins und des monoklonalen Anti-E2-Antikörpers ein ELISA-Testsystem (Kap.II, B.19.2) etabliert werden.

Bei der Untersuchung einer größeren Zahl von im "µPLATE Hgenv"-Test (Kap.II, B.19.1) Antikörper-positiven und Antikörper-negativen Seren konnte jedoch nicht in jedem Fall eine zur Unterscheidung ausreichende Extinktionsdifferenz gefunden werden.

#### **Zusammenfassung "Diagnostischer Nachweis einer GBV-C-Infektion"**

Verschiedene Bereiche der Strukturgene E1 und E2 wurden kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Außerdem gelang es, monoklonale, gegen das E2-Protein von GBV-C gerichtete Antikörper (aus Ratte) zu gewinnen. Durch spezifische Restriktion des E2-Proteins wurde für einen Antikörper ein 39 Aa langes Fragment im C-terminalen Bereich des E2-Verkürzungsfragmentes als antikörperbindende Domäne festgelegt. Dieser Bereich wurde anhand des Hydrophathie- und Oberflächenwahrscheinlichkeitsdiagramms sowie anhand des antigenen Index als hydrophiler, oberflächenorientierter und hoch antigen Bereich analysiert.

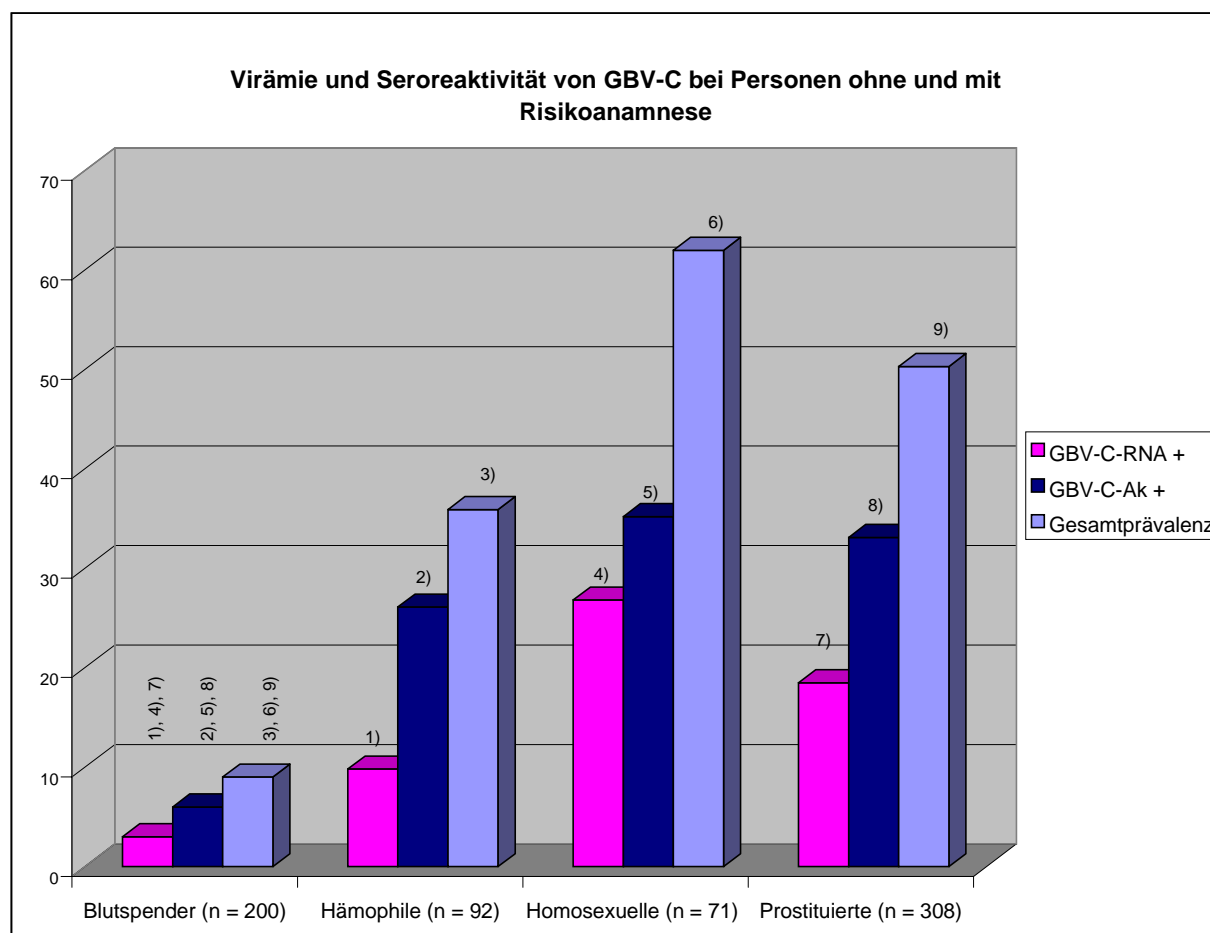
Unter Verwendung des rekombinanten E2-Verkürzungsproteins und des monoklonalen Antikörpers wurde ein ELISA-Testsystem zum Nachweis von Antikörpern gegen das E2-Protein von GBV-C etabliert.

### **3. Untersuchungen zur Prävalenz und Übertragung des GB-Virus-C**

Im Folgenden wurde die Prävalenz von GBV-C innerhalb verschiedener Bevölkerungsgruppen, mit Blutspendern als Stellvertreter der Normalbevölkerung sowie Hämophilie-Patienten, Homosexuellen und Prostituierten als Risikogruppenangehörige, untersucht. Dadurch sollten Hinweise auf eventuelle Übertragungswege von GBV-C und das Infektionsrisiko dieser Gruppen gewonnen werden. Der Nachweis einer bestehenden Infektion erfolgte mittels RT-PCR (s. Kap.II, B.7) unter Verwendung der Primer YK874, YK877, YK875 und YK876 (Kap.II, A.3.2.2), der einer bereits abgelaufenen Infektion durch Nachweis spezifischer, gegen das E2-Glykoprotein von GBV-C gerichteter Antikörper mittels des käuflichen ELISA "µPLATE Hgenv" (Kap.II, B.19.1). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes "Instat" unter Anwendung des "Fisher's Exact Test". P-Werte  $< 0.05$  wurden als signifikant betrachtet.

Abb.III.38 gibt eine Übersicht zur Prävalenz von GBV-C innerhalb einzelner Bevölkerungsgruppen. Mit Ausnahme einiger Seren (bei Prostituierten) wurden GBV-C Anti-E2-Antikörper nicht gleichzeitig mit der GBV-C-RNA nachgewiesen. Das Auftreten von Anti-E2 scheint deshalb, wie bei den Tamarinen beschrieben, mit der Viruselimination und Ausheilung der Infektion assoziiert zu sein.





**Abb.III.38** Vergleich der Prävalenz des GB-Virus-C zwischen Blutspendern einerseits und Hämophilen, Homosexuellen (HIV-infiziert, keine IVDUs) und Prostituierten andererseits.

Hämophile:	1)	p = 0.0214	signifikant	Odds Ratio = 3.509
	2)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 5.529
	3)	P < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 5.655
Homosexuelle:	4)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 11.814
	5)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 8.514
	6)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 16.477
Prostituierte:	7)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 7.343
	8)	p < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 7.757
	9)	P < 0.0001	hoch signifikant	Odds Ratio = 10.243

Sowohl hinsichtlich einer GBV-C-Virämie als auch der Anti-E2-Antikörper-Positivität wurden bei Homosexuellen, Prostituierten und Hämophilen signifikant höhere Werte als bei Blutspendern gefunden. Mit einer Gesamtprävalenz von 62 % und einer "Odds Ratio" von 16 zeigten Homosexuelle im Vergleich zur Blutspendern die höchste Durchseuchungsrate und das größte Infektionsrisiko, gefolgt von Prostituierten mit einer Prävalenz von 50 % und einer "Odds Ratio" von 10 sowie Hämophilen mit 36 % Gesamtprävalenz und einer "Odds Ratio" von 6. Die signifikant höhere Durchseuchung von Homosexuellen und Prostituierten im Vergleich zu Blutspendern spricht für eine Übertragung von GBV-C bei Sexualkontakt. Die

erhöhte Durchseuchung von Hämophilen deutet an, daß das Virus auch parenteral mit Blut und Blutprodukten übertragen werden kann.

Die in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Wächtler (4. Medizinische Abteilung, Krankenhaus München-Schwabing) durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer Assoziation zwischen GBV-C-Markern und anamnestischen Parametern bzw. Laborparametern bei 71 HIV-infizierten Homosexuellen ohne intravenösen (i.v.) Drogenkonsum ergaben die in Tab.III.37 dargestellten Daten.

**Tab.III.37** Assoziation zwischen GBV-C-Markern und anamnestischen bzw. Laborparametern bei 71 HIV-infizierten Homosexuellen ohne intravenöse Drogenabhängigkeit.

	GBV-C RNA und Anti-E2-Ak negativ	GBV-C RNA positiv	GBV-C Anti-E2-Ak positiv
Anzahl der Personen	27	19	25
Mittleres Alter [Jahre]	47 (26 - 75) <sup>1)</sup>	39 (24 - 55) <sup>1) 2)</sup>	47 (29 - 62) <sup>2)</sup>
Zahl der Lues-Antikörper positiven Personen	10 (37 %) <sup>3)</sup>	9 (47 %)	17 (68 %) <sup>3)</sup>
Zahl der Personen mit anamnestischer Lues/Gonorrhoe	5 (19 %) <sup>4)</sup>	3 (16 %)	11 (44 %) <sup>4)</sup>
Mittelwert CD4-Zellen [Zellen/ml]	225 (3 - 644)	273 (50 - 670)	275 (1 - 704)
Mittelwert GPT [IU/L] bzw. Gama-GT [IU/L]	13 (5 - 50) 26 (7 - 125)	14 (4 - 35) 18 (8 - 47)	29 (6 - 242) * 34 (8 - 143) *

- 1) p = 0.0236      signifikant  
 2) p = 0.0350      signifikant  
 3) p = 0.0308      signifikant  
 4) p = 0.0715      nicht signifikant

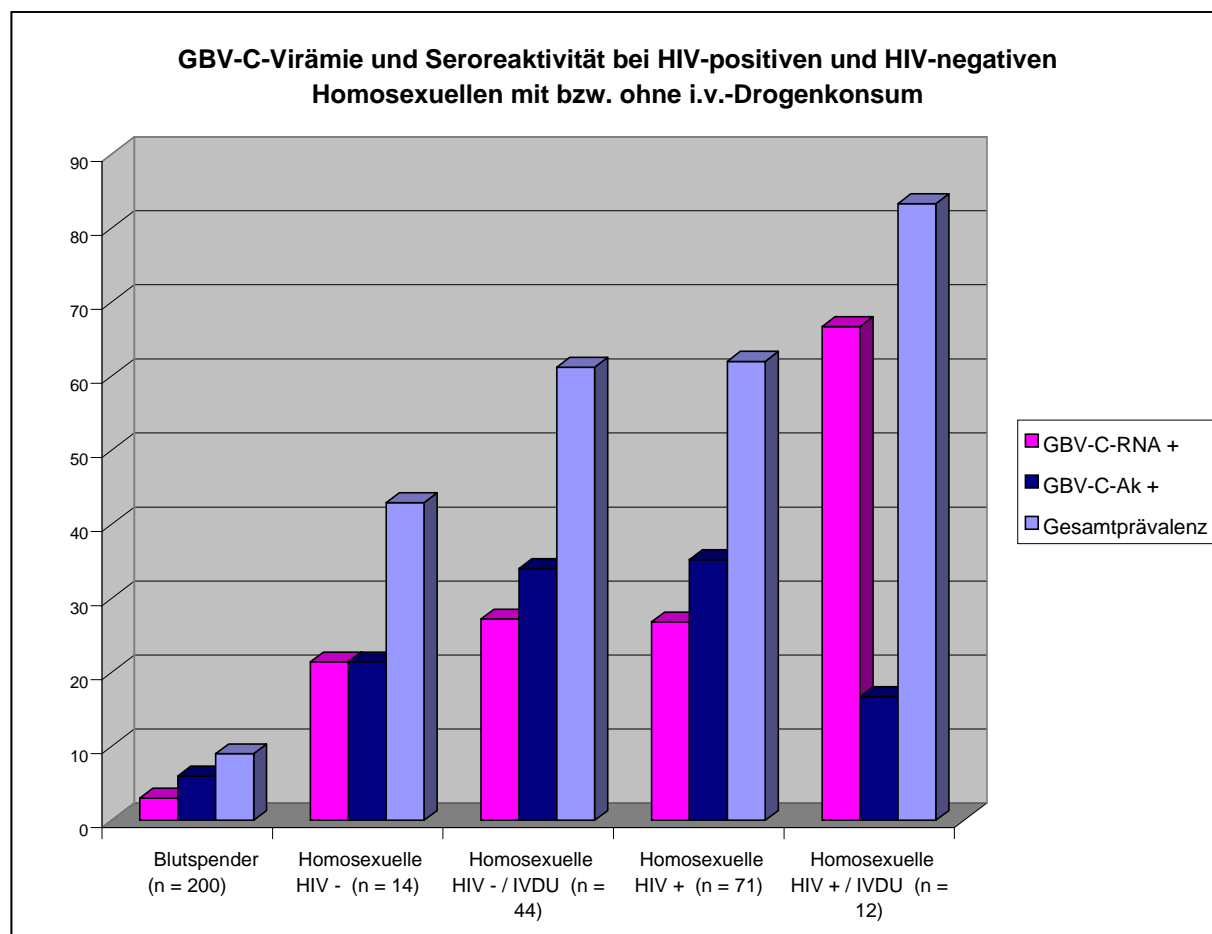
\* In dieser Gruppe war ein chronischer Alkoholiker mit einem GPT-Wert von 242 IU/L und einem Gamma-GT-Wert von 143 IU/L.

Es wurde ein signifikant niedrigeres Durchschnittsalter bei Homosexuellen mit einer bestehenden GBV-C-Infektion im Vergleich zu Homosexuellen mit einer bereits abgelaufenen Infektion festgestellt. Desweiteren zeigten Homosexuelle mit positivem GBV-C-Antikörper-Nachweis im Vergleich zu GBV-C-Marker negativen Homosexuellen eine signifikant höhere Nachweisrate in Bezug auf Lues-Antikörper. Ebenso waren wesentlich mehr Personen mit anamnestischer Lues oder Gonorrhoe bei den GBV-C-Antikörper positiven Homosexuellen als bei den nicht GBV-C infizierten Homosexuellen zu finden. Diese Assoziation zwischen abgelaufener GBV-C-Infektion und serologischen Markern einer Lues bzw. anamnestischer Angabe einer abgelaufenen Lues oder Gonorrhoe spricht dafür, daß GBV-C, wie zuvor auf Seite 134 beschrieben, auf sexuellem Weg übertragen wird.

Die jeweils für CD4-Zellen und die Enzyme GPT und Gama-GT ermittelten Werte zeigten keinen Unterschied zwischen Personen mit bestehender oder abgelaufener GBV-C-Infektion

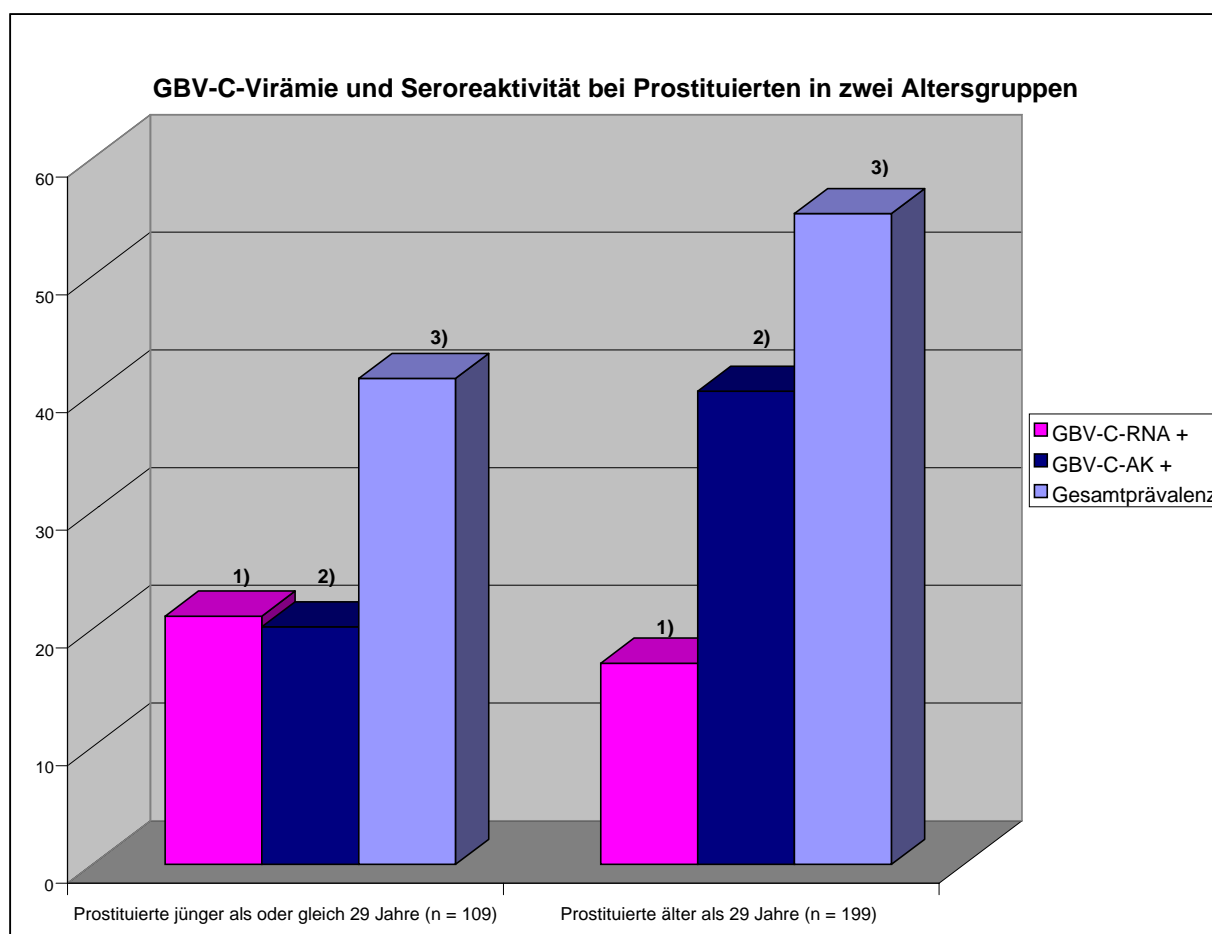
und nicht infizierten Personen. Die GBV-C-Infektion scheint damit weder eine bestehende HIV-Infektion zu beeinflussen noch mit einer Leberentzündung assoziiert zu sein.

Aus Prävalenzvergleichen HIV-infizierter und nicht HIV-infizierter Homosexueller mit bzw. ohne i.v.-Drogenkonsum konnte v.a. bei Homosexuellen mit HIV-Infektion und gleichzeitiger Drogenabhängigkeit eine extrem hohe GBV-C-Gesamtprävalenz (83 %) festgestellt werden (s. Abb.III.39).



**Abb.III.39** Prävalenzvergleich HIV-infizierter bzw. nicht HIV-infizierter Homosexueller mit bzw. ohne i.v.-Drogenkonsum.

Prävalenzstudien bei Prostituierten in zwei Altersgruppen (Abb.III.40) ergaben eine signifikant erhöhte Gesamtprävalenz bei Prostituierten > 29 Jahre im Vergleich zu Prostituierten ≤ 29 Jahre, was insbesondere auf den häufigeren Nachweis GBV-C-spezifischer Antikörper bei älteren Prostituierten zurückzuführen ist.



**Abb.III.40** Nachweis von RNA bzw. Anti-E2-Antikörper des GB-Virus-C bei Prostituierten in zwei Altersgruppen.

- 1)  $p = 0.4433$  nicht signifikant
- 2)  $p = 0.0004$  hoch signifikant
- 3)  $p = 0.0234$  signifikant

### Zusammenfassung “Prävalenz und Übertragung des GB-Virus-C”

Epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz von GBV-C ergaben ein stark erhöhtes Infektionsrisiko für Hämophile, einer Risikogruppe für parenteral mit Blut und Blutprodukten übertragene Infektionen, sowie für Homosexuelle und Prostituierte als Risikogruppen für beim Sexualkontakt übertragene Infektionen, im Vergleich zur Prävalenz bei Blutspendern. Damit wurde neben dem bekannten parenteralen Übertragungsweg durch Blut/Blutprodukte auch der sexuelle Übertragungsweg von GBV-C wahrscheinlich gemacht. Aufgrund dieser Kenntnis kann der B-Lymphozyt nicht der einzige Replikationsort von GBV-C sein.

Zudem wurde gezeigt, daß RNA und Anti-E2-Antikörper in dieser Studie mit Ausnahme einiger Fälle ausschließlich exklusiv auftreten. Die Bildung von Anti-E2-Antikörpern scheint daher mit der Klärung der GBV-C-Infektion assoziiert zu sein.

## **IV. DISKUSSION**

### **A. Das GB-Virus-A und GB-Virus-B**

#### **1. Reinisolierung der GB-Viren GBV-A und GBV-B**

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden die gemeinsam im sogenannten "GB-Agens" vorhandenen Viren GBV-A und GBV-B voneinander getrennt und charakterisiert. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Deinhardt *et al.*, 1967; Frösner *et al.*, persönliche Mitteilung; Schlauder *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995a) standen jetzt Reinisolate des GB-Virus-A und GB-Virus-B zur Verfügung. Die Kreuzimmunität zwischen GBV-A und GBV-B wurde nun in sogenannten Challenge-Experimenten in Affen untersucht. Die Trennung der Viren ermöglichte die Bestimmung des Replikationsortes von GBV-A und GBV-B.

#### **2. Challenge-Experimente mit GBV-A und GBV-B**

Nach erfolgter Infektion von Krallenaffen mit GBV-A bzw. GBV-B bestand Immunität bezüglich einer Reinfektion mit dem gleichen Virus. Eine Kreuzimmunität zwischen GBV-A und GBV-B bestand jedoch nicht. Dies bestätigte die nach Sequenzanalyse (Muerhoff *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995a) sowie molekularer und serologischer Analyse des GB-Hepatitis-Agens (Schlauder *et al.*, 1995) aufgestellte Schlußfolgerung, daß es sich bei GBV-A und GBV-B um verwandte, jedoch unterschiedliche Viren handelt.

Je größer der Verwandtschaftsgrad zweier Viren ist, desto größer wäre die Wahrscheinlichkeit für eine Kreuzimmunität zwischen diesen Viren. Die Verwandtschaft zwischen GBV-A und GBV-B ist jedoch relativ gering (vgl. Tab.I.3). Beide Viren sind näher mit dem Hepatitis C-Virus verwandt als untereinander.

Aufgrund von Challenge-Experimenten wurde die Existenz einer humoralen Immunität gegenüber dem GB-Virus-B (Schlauder *et al.*, 1995; Pilot-Matias *et al.*, 1996) bestätigt. Ein Affe mit einer bereits abgelaufenen GBV-B-Infektion konnte im Challenge-Experiment nicht erneut mit GBV-B reinfiziert werden. Entsprechend konnte auch eine humorale Immunreaktion gegenüber dem GB-Virus-A gezeigt werden. Ein mit GBV-A und GBV-B infizierter Affe konnte 778 Tage nach der ersten Infektion nicht erneut mit GBV-A reinfiziert werden.

In Bezug auf die Pathologie der GB-Viren GBV-A und GBV-B wurde mit Hilfe der Challenge-Experimente unter Verwendung der Reinisolate die schon zuvor aufgestellte

Hypothese, daß es sich bei GBV-B um das alleinig kausale Agens der GB-Hepatitis handelt (Schlauder *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995a), bestätigt. Die Leberpathogenität zeigte sich durch den histologischen Nachweis einer Hepatitis und die Erhöhung des Transaminasenspiegels.

Durch Inokulation des GBV-A-Reinisolats konnte dahingegen keine Transaminaseerhöhung > 100 IU/L ausgelöst werden. Niedrigere Anstiege waren meist nur in einer Blutabnahme nachweisbar und wurden wahrscheinlich durch andere Ursachen bedingt (Kämpfe der Affen untereinander, Muskelquetschung beim Fangen und bei der Blutabnahme). Solche geringen, kurzfristigen Transaminaseerhöhungen wurden regelmäßig auch bei nicht inokulierten Affen beobachtet. Für GBV-A wurde jedoch kein mit einer GBV-A-Infektion assoziiertes Krankheitsbild gefunden.

### **3. Bestimmung des Replikationsortes von GBV-A und GBV-B**

Die beste Möglichkeit, Hinweise auf die Pathologie einer GBV-A-Infektion zu finden, bestand in der Bestimmung des Replikationsortes des GB-Virus-A. Anfängliche Versuche, den Replikationsort mittels RT-PCR zu ermitteln, scheiterten aufgrund der Blutkontamination der Organe. Das Virus wurde in allen Organen gefunden. Die hier gewählte Methode der *in situ*-Hybridisierung ermöglichte die spezifische Detektion von RNA-Sequenzen des GB-Virus-A bzw. GB-Virus-B mittels Digoxigenin-markierter RNA-Sonden in morphologisch konservierten Gewebeschnitten. Die untersuchten Gewebe wurden dabei in parallelen Ansätzen sowohl mit der Antisense- als auch der Sense-Sonde *in situ* hybridisiert, wodurch neben dem Nachweis der genomischen RNA (Plusstrang-RNA der GB-Viren) auch der replikativen RNA (Minusstrang-RNA der GB-Viren) ermöglicht wurde. Als Replikationsort wurde das Organ betrachtet, in dem sowohl mit der Sense- als auch der Antisense-Sonde ein deutliches *in situ*-Hybridisierungssignal nachweisbar war. Im Falle des GB-Virus-A wurde das Gehirn als Ort der Replikation gezeigt. Damit wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung GBV-A als Verursacher der GB-Hepatitis im Tamarinen ausgeschlossen. Die Frage nach einer Krankheitsassoziation von GBV-A im Krallenen Affen blieb jedoch weiterhin unbeantwortet. Es wird jedoch insbesondere zu prüfen sein, ob GBV-A neurologische Erkrankungen auslösen kann.

GBV-B, das als kausales Agens der GB-Hepatitis in Tamarinen beschrieben wurde (Deinhardt *et al.*, 1967; Schlauder *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1995a), wurde mittels *in situ*-Hybridisierung auf Hepatotropismus und Replikation in der Leber überprüft. Wie für GBV-A

waren auch hier anfängliche Versuche, den Replikationsort mittels RT-PCR zu bestimmen, aufgrund der Blutkontamination der Organe erfolglos geblieben (A. Kekulé, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung wurde, wie erwartet, die Leber als Replikationsort von GBV-B gezeigt und dadurch GBV-B als Verursacher der GB-Hepatitis im Tamarinen bestätigt. Im Gehirn, dem Replikationsort von GBV-A, konnte GBV-B nicht nachgewiesen werden.

## **B. Das humane GB-Virus-C**

### **1. Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C**

Hinsichtlich des GB-Virus-C stand insbesondere die Frage nach assoziierten Erkrankungen und damit die Rolle von GBV-C als Krankheitserreger im Mittelpunkt. So war u.a. der Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Infektion und fulminanten (Yoshida *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1996; Kanda *et al.*, 1996; Moaven *et al.*, 1996; Sallie *et al.*, 1996; Hadziyannis *et al.*, 1997) sowie akuten und chronischen Non-A-E Hepatitiden (Fiordalisi *et al.*, 1996; Alter *et al.*, 1997a; Alter *et al.*, 1997b; Miyakawa *et al.*, 1997; Yashina *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Frider *et al.*, 1998) diskutiert worden. Bei Koinfektion mit HBV bzw. HCV (Yashina *et al.*, 1997; Colombatto *et al.*, 1997; Fabris *et al.*, 1998) konnte jedoch keine signifikante Änderung des klinischen Verlaufs und des histologischen Schweregrades einer HBV- bzw. HCV-Erkrankung festgestellt werden. Den meisten Untersuchungen zufolge wurde GBV-C als kausales Agens einer Lebererkrankung zunehmend in Frage gestellt. Eine mögliche Assoziation zwischen GBV-C und aplastischer Anämie (Zaidi *et al.*, 1996; Byrnes *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Moriyama *et al.*, 1997) konnte bislang nicht bewiesen, jedoch auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Aussagekräftige Hinweise auf die Pathogenität und Virulenz von GBV-C gaben v.a. die Überprüfung des Hepatotropismus und die Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C.

Untersuchungen verschiedener Organe auf strangspezifischen Nachweis des GBV-C-Genoms mittels RT-PCR (A. Kekulé, persönliche Mitteilung; Fabris *et al.*, 1998; Laskus *et al.*, 1998) ergaben nicht nur einen positiven Nachweis von Plus- und Minusstrang-RNA in der Leber, sondern z.B. auch in der Milz und im Knochenmark. Aufgrund der nicht auszuschließenden Gefahr einer Blutkontamination der Organe (GBV-C ist mittels RT-PCR in hohen Konzentrationen im Serum Infizierter nachweisbar), sowie einer eventuellen unspezifischen

Bindung der in der PCR verwendeten Primer wurden diese Daten wegen möglicher falsch-positiver Ergebnisse jedoch nicht als zuverlässig betrachtet. Durch Vergleich der viralen RNA-Menge (in Serum und Leber) von GBV-C mit der des hepatotropen HCV (Fan *et al.*, 1999; Kudo *et al.*, 1997; Pessoa *et al.*, 1998) gelang es, eine Beziehung zwischen einer GBV-C-Infektion und einer Hepatitis weitestgehend auszuschließen. Die Annahme, daß GBV-C primär in einem anderen Organ als der Leber repliziert, war angebracht.

Wie schon zuvor für GBV-A und GBV-B, war die *in situ*-Hybridisierung die aussagekräftigste Methode, um den primären Replikationsort von GBV-C zu ermitteln. Unter Verwendung dieser Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit der Lymphknoten, speziell das Zytoplasma der Lymphozyten, als Replikationsort von GBV-C nachgewiesen. In der Leber, insbesondere den Hepatozyten der Leber, wurde hingegen kein GBV-C-spezifisches Hybridisierungssignal gefunden. Somit handelt es sich bei GBV-C nicht um ein hepatotropes Virus.

Jüngste Veröffentlichungen (Kudo *et al.*, 1997; Laskus *et al.*, 1997; Laskus *et al.*, 1998; Mellor *et al.*, 1998; Pessoa *et al.*, 1998; ; Fan *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Lefrère *et al.*, 1999) unterstützen dieses Ergebnis. So wurden u.a. auch Positiv- und Negativ-RNA-Stränge von GBV-C im Zytoplasma mononukleärer Zellen, die im Portalbereich der Leberläppchen als Infiltrate vorhanden waren, mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Andere Teile der Leber, einschließlich der Hepatozyten, enthielten keine RNA von GBV-C (Kobayashi *et al.*, 1999). Eine für die GBV-C-RNA teilweise stark positive PCR mit Lebergewebe eines Hepatitispatienten beruhte deshalb wohl auf eingewanderten virushaltigen Lymphozyten im Rahmen einer Leberentzündung, nicht aber auf einer Infektion der Leberzellen selbst.

Eine Studie von Lefrère *et al.* (1999) zeigte, daß der jeweilige Immunstatus einen Einfluß auf den GBV-C-Titer ("RNA viral load") hat. Immundefiziente und Immunsupprimierte hatten im Vergleich zu immunkompetenten GBV-C-Infizierten einen signifikant niedrigeren GBV-C-RNA-Titer. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung, daß bei immundefizienten Personen oft besonders hohe Viruskonzentrationen beobachtet werden können (z.B. bei HBV, HCV, HSV, CMV). Ausgehend von der durch *in situ*-Hybridisierung gewonnenen Erkenntnis, daß GBV-C in Lymphozyten repliziert, könnte die verringerte GBV-C-Konzentration auf die geringere Lymphozytenanzahl oder -aktivität bei Immundefizienz/-suppression zurückgeführt werden.

Auch die häufig bei einer GBV-C-Infektion auftretende hochtitrige Viruspersistenz konnte damit gut erklärt werden. Die Lymphozyten, als sich ständig erneuernde und hochaktive



Zellen, bieten sich für eine kontinuierliche Virusreplikation an. Zusätzlich erhöht die Vermehrung von GBV-C in Lymphozyten die Chance, der Abwehr des Immunsystems über einen längeren Zeitraum (Monate bis Jahre) zu entgehen (vgl. Humanes Immundefizienz Virus, HIV). Der Mechanismus der Viruspersistenz konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist lediglich bekannt, daß das Versagen der Immunkontrolle nicht, wie bei HCV, auf dem Vorhandensein sogenannter hypervariablen Regionen innerhalb des E2-Proteins beruht (Surowy *et al.*, 1997). Eventuell liegt bei GBV-C ein anderer Mechanismus vor (Paroli *et al.*, 1995).

Zur genaueren Charakterisierung der GBV-C infizierten Zellen wurde in dieser Arbeit versucht, das *in situ*-Hybridisierungssignal im Lymphknoten zu lokalisieren. Das Signal war besonders im äußeren Cortexbereich des Lymphknotens, der überwiegend B-Lymphozyten enthält, vorhanden. Dies legte die Vermutung nahe, daß es sich bei den GBV-C infizierten Zellen in der Regel um B-Lymphozyten handelt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden PBMCs aus Blut eines GBV-C infizierten Patienten isoliert und unter Verwendung des MACS-Systems in einzelne Zellfraktionen (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen [NK-Zellen]) aufgetrennt. Aufgrund der vermutlich unzureichenden Abtrennung der Monozyten von den verbleibenden B- bzw. T-Zellen und NK-Zellen wurden nur das reine T- und B-Zellen-Eluat, sowie die jeweiligen Negativfraktionen in die vergleichenden Untersuchungen einbezogen. Durch semiquantitative PCR wurde dabei für das B-Zellen-Eluat ein GBV-C-Genomäquivalent pro 2.500 B-Lymphozyten und für das T-Zellen-Eluat hingegen nur ein GBV-C-Genomäquivalent pro 50.000 T-Lymphozyten ermittelt. Dieses Ergebnis bestätigt die Replikation von GBV-C in mononukleären Zellen und weist darauf hin, daß, in Übereinstimmung mit der Signallokalisierung im Lymphknoten, B-Lymphozyten der hauptsächliche Replikationsort von GBV-C sind.

Aufgrund der Verwandtschaft von GBV-C zu HCV (beide Mitglieder der Familie der Flaviviren) und der im Falle von HCV beschriebenen *in vitro*-Infektion von PBMCs und bestimmten T- und B-Zelllinien (Shimizu *et al.*, 1992; Zignegno *et al.*, 1992; Bertolini *et al.*, 1993; Ferri *et al.*, 1993; Cribier *et al.*, 1995) sowie des hier erfolgten Nachweises der GBV-C-Replikation im Lymphozyten, wurde auch für GBV-C eine *in vitro*-Infektion von PBMCs und ihre Verwendung als Wirtszellen für die Replikation von GBV-C überprüft. Unter den für das vorliegende Zellkultursystem etablierten Bedingungen wurde die GBV-C-RNA nach Inokulation nicht GBV-C infizierter Zellen für ca. 2-3 Wochen (nicht immer kontinuierlich) in den Zellen und Zellkulturüberständen durch RT-PCR nachgewiesen. Ein Anstieg der GBV-C-RNA-Konzentration und damit der Beweis der Virusreplikation wurde meist in der

ersten bis dritten Woche n.I. verzeichnet. Die Viruskonzentration stieg bis auf  $10^2$ - $10^3$  Genomäquivalenten/ml, obwohl der wöchentliche Mediumwechsel zu einer Verdünnung der Virusmenge im Überstand führte. Das Verschwinden der GBV-C-RNA (negative RT-PCR) ab Beginn der dritten bzw. vierten Woche n.I. wurde auf die begrenzte Lebensdauer der Zellen zurückgeführt. Drei bis vier Wochen n.I. konnten erste Anzeichen von Zelltod (Abkugeln der Zellen, Entstehen von Zellfragmenten) verzeichnet werden.

Daß sich die Zellen verschiedener Personen hinsichtlich der Virusproduktion unterscheiden, wurde auch schon für HCV beschrieben (Cribier *et al.*, 1995) und deutete auf die mögliche Existenz spezifischer Wirtsfaktoren hin, die mit der unterschiedlichen Empfänglichkeit für eine Infektion mit GBV-C zusammenhängen. Desweiteren wurde festgestellt, daß die Effizienz einer experimentellen *in vitro*-Infektion auch von der Art und der eingesetzten Menge des Inokulums (Genomäquivalente/Zelle) abhängt. Die beste Virusreplikation wurde nach *in vitro*-Infektion mit etwa einem Genomäquivalent pro Zelle erreicht. Eine Stimulation mit PHA, LPS und IL-2 bewirkte keine Erhöhung der Infektionsrate. Insgesamt gesehen wurde durch diese Studie eine mäßige Replikation von GBV-C in PBMCs nach experimenteller *in vitro*-Infektion gezeigt. Zur weiteren Bestätigung der Replikation von GBV-C in Lymphozyten wäre es empfehlenswert, eine Reinfektion von bislang nicht infizierten PBMCs mit GBV-C-haltigem Zellkulturüberstand durchzuführen (= Passage von GBV-C).

Inzwischen publizierte *in vitro*-Infektionsstudien anderer Forschergruppen (Fogeda *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1999) bestätigen die hier erhobenen Daten. So konnte GBV-C u.a. nach Inokulation Interferon-sensitiver Daudi-Zellen, einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie, für maximal 44 Tage und nach Inokulation Interferon-resistenter Daudi-Zellen sogar für mehr als 130 Tage mittels RT-PCR in der Zellkultur nachgewiesen werden. Desweiteren konnte eine produktive GBV-C-Infektion in Daudi-Zellen bewiesen werden.

Zusätzliche Hinweise auf eine GBV-C-Replikation im Lymphgewebe lieferte die in Zusammenarbeit mit Dr. Franz Maximilian Zwiebel und Dr. Gero Massenkeil (Klinikum Charité, Berlin) durchgeführte Studie mit Knochenmark transplantierten Patienten. Hierbei wurden Folgeseren einzelner KMT-Patienten hinsichtlich einer akuten GBV-C-Infektion durch den Nachweis von viraler RNA oder einer bereits abgelaufenen Infektion durch den Nachweis von Anti-E2-Antikörper untersucht. Sieben von 23 KMT-Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation mit GBV-C infiziert waren, zeigten nach der Konditionierung für die KMT und der Transplantation innerhalb eines Zeitraumes von ca. 30 Tagen eine "Elimination" bzw. ein Absinken des Virustiters bis unter die Nachweisgrenze der RT-PCR. Nach Untersuchung einer weiteren Serumprobe (mindestens 8 Monate nach KMT) von vier

der sieben "Eliminierer" konnte GBV-C mittels RT-PCR in 3 von 4 Fällen wieder nachgewiesen werden. Das lymphatische System wird durch die Konditionierung vor der KMT (Ganzkörperbestrahlung, Behandlung mit Cyclophosphamid) weitestgehend zerstört. Dadurch werden die Zellen, in denen sich GBV-C offensichtlich vermehrt, stark reduziert, was zu einer Abnahme der Virusproduktion und damit zu einer Abnahme der Viruskonzentration im Blut führt.

Nach der Regeneration des lymphatischen Systems (Dauer: z.T. bis zu 2 Jahre, bis das lymphatische System wieder vollkommen rekonstituiert ist) und der Infektion der Spenderlymphozyten mit GBV-C steigt die Viruskonzentration im Blut wieder an. Die hier nach KMT beobachteten Titterschwankungen des GBV-C stellen daher einen weiteren Hinweis auf die Lymphozyten als den hauptsächlichen Replikationsort von GBV-C dar.

Desweiteren ist aufgrund der Titterschwankungen davon auszugehen, daß durch die Konditionierung der Virustiter wahrscheinlich nur unter die Nachweisgrenze der RT-PCR gedrückt, und GBV-C nicht vollständig eliminiert wird.

Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit für die "Elimination" von GBV-C nach KMT stellt die sogenannte "Transplantat-anti-Wirt-Reaktion" ("graft versus host disease", GVH) dar. Die immunologisch kompetenten und nicht GBV-C-infizierten Zellen des Spenders erkennen dabei die Histokompatibilitätsantigene des Wirtes und reagieren dagegen. Dadurch würden GBV-C infizierte Wirtszellen zerstört werden und der Virustiter sinken. Bei Patienten mit "Elimination" des Virus wurde tatsächlich eine starke GVH festgestellt (M. Zwiebel, persönliche Mitteilung).

Neben den sogenannten "Eliminierern" gab es auch Patienten mit persistierendem Virus (trotz Konditionierung). Diese Verläufe sind möglicherweise mit einem Überleben von GBV-C in nicht zerstörtem lymphatischem Gewebe des Wirtes und einer schnellen Infektion der Spenderlymphozyten zu erklären. Eventuell kann GBV-C auch als ein nicht primär hepatotropes Virus in einem anderen Organ, wie z.B. der Leber, persistieren. Eine mögliche Persistenz in der Leber wird durch Daten anderer Forschergruppen unterstützt, die GBV-C-RNA schon in der Leber nachweisen konnten (Laskus *et al.*, 1997; Fabris *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 1999).

Die GBV-C-Neuinfektion einzelner Patienten nach KMT war vermutlich ebenso wie die Anti-E2-Serokonversion bei zwei Patienten (nach KMT) auf die Gabe kontaminierten Bluts und Blutprodukte bzw. direkt auf die Transplantation eines GBV-C positiven Spenderknochenmarks zurückzuführen.

Bei Patienten mit einer GBV-C-Neuinfektion nach KMT wurde eine Tendenz zur verlangsamten Zellproliferation von Lymphozyten und Leukozyten festgestellt. In dieser besonderen Situation scheint GBV-C eine pathogene Wirkung auf das lymphatische System auszuüben (Massenkeil *et al.*, 1998).

Aus der Summe aller hier erhobenen Daten konnten B-Lymphozyten als Replikationsort von GBV-C definiert werden. Damit weist GBV-C als Mitglied der Flaviviren ein weiteres für die Flaviviren typisches Merkmal auf. Für die meisten Flaviviren, einschließlich HCV, konnte ebenfalls eine Replikation in mononukleären Zellen gezeigt werden (Saleh *et al.*, 1994; Cribier *et al.*, 1995; Kao *et al.*, 1997b; Rodriguez-Inigo *et al.*, 2000).

Ein Zusammenhang mit Lebererkrankungen wurde auch in dieser Studie nicht gefunden. Die Frage hinsichtlich der klinischen Bedeutung von GBV-C bleibt deshalb weiterhin ungeklärt. Aufgrund der hauptsächlichlichen Replikation in Lymphozyten sollte in weiteren Studien nach einer Assoziation der GBV-C-Infektion mit lymphatischen Erkrankungen gesucht werden.

## **2. Diagnostischer Nachweis einer GB-Virus-C-Infektion**

Für den Nachweis spezifischer Antikörper, die gegen Proteine des GB-Virus-C gerichtet sind, wurde ein ELISA-Testsystem etabliert. Das im Test eingesetzte GBV-C spezifische Antigen stammte aus dem Bereich der Hüllproteine E1 bzw. E2, da es sich bei diesen erfahrungsmäßig um hydrophile, oberflächenorientierte und meist antigene Proteine handelt. Anderen Arbeitsgruppen gelang es vorher, diese Protein zu exprimieren (Pilot-Matias *et al.*, 1996b; Surowy *et al.*, 1997). Durch Auswahl des pBAD-Expressionssystems, das speziell im Falle von toxischen und unlöslichen Proteinen eingesetzt wird, wurde letztendlich von vier der fünf E1- bzw. E2-Amplifikate Protein gewonnen. Das fünfte Fragment war aufgrund einer im Verlaufe der PCR bzw. Klonierung entstandenen Nukleotidinsertion nicht mehr exprimierbar. Durch die spezifische Reaktivität mit dem Anti-Xpress-Antikörper und einem Vergleich der berechneten molekularen Masse mit dem Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel (Höhe der Proteinbande) wurde bestätigt, daß es sich um die gewünschten Proteine handelte. Für das im Vergleich zur errechneten molekularen Masse zu schnelle Laufverhalten des E2-Gesamtproteins (44.5 kD) konnte die Ursache nicht abgeklärt werden, jedoch wurde dieses Phänomen auch schon bei anderen Proteinen beobachtet. Möglicherweise kommt es zu einer proteolytischen Spaltung des exprimierten Proteins.

Trotz der Existenz eines Polyhistidinpeptids am N-Terminus aller Proteine konnten nur das gesamte (377 As) und das C-terminal verkürzte E2-Protein (273 As) effektiv aufgereinigt werden. Bei den restlichen Proteine gelang es trotz spezieller Einschlußkörper-Behandlung

nicht, diese in eine ausreichend lösliche Form zu überführen und damit einer Reinigung über Ni-NTA-Säulen zugänglich zu machen.

Ein monoklonaler Antikörper mit einer spezifischen Immunreaktion gegenüber dem 377 As und 273 As Protein wurde gewonnen. Aufgrund der auch mit dem C-terminalen Verkürzungsfragment festgestellten Immunreaktion wurde von Anfang an der C-Terminus des E2-Antigens als Bindestelle für diesen Antikörper ausgeschlossen. Durch Proteaseverdau des Verkürzungsfragments wurden Fragmente definierter Länge gewonnen. Der anschließend durchgeführte Western Blot zeigte, daß es sich bei der Antikörper-Bindestelle um ein 39 As langes Peptid am C-terminalen Ende des Verkürzungsfragments handelt. Nachdem Hydrophathie-, Oberflächenwahrscheinlichkeits- und Antigenitätsanalysen des 273 As Proteins ergaben, daß es sich bei dem ermittelten Bindebereich um eine überwiegend hydrophile, oberflächenorientierte und antigene Region handelt, wurde von einer korrekten Analyse der Bindestelle ausgegangen.

Nach Aufreinigung des gesamten (377 As) und des C-terminal verkürzten (273 As) E2-Proteins und nach Produktion eines spezifischen monoklonalen Anti-E2-Antikörpers, wurde ein GBV-C-E2-ELISA unter Verwendung des Verkürzungsproteins und des monoklonalen Antikörpers entwickelt. Das 377 As lange Protein erwies sich aufgrund des vermutlich hydrophoben und membranverankerten C-Terminus als weniger geeignet. Die beobachtete höhere ELISA-Spezifität nach Vorbehandlung der ELISA-Platte mit monoklonalem Anti-E2-Antikörper ("Coating") im Vergleich zu ELISAs ohne Vorbehandlung mit monoklonalem Anti-E2-Ak ließ sich durch die spezifischere Bindung des E2-Antigens in Gegenwart des Antikörpers erklären.

Die bei Verwendung von zuvor eingefrorenem Antigen beobachteten niedrigeren Extinktionswerte der Positivkontrollen wurden auf eine Instabilität des E2-Antigens zurückgeführt. So wurde schon bei der Analyse der Proben auf Proteinexpression festgestellt, daß mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Zelllösung den Verlust einer nachweisbaren Proteinbande im Western Blot zur Folge hatte. Desweiteren ergab die Berechnung des Instabilitätsindex für das 377 As Protein einen Wert von 43.91 und für das C-terminal verkürzte Protein einen Wert von 39.76. Damit wurde das Gesamt-E2-Protein als instabil und das verkürzte Protein als stabil klassifiziert (nach Guruprasad *et al.*, 1990). Für Untersuchungen zur Antikörperprävalenz wurde jedoch ein einfach durchführbares experimentelles Nachweissystem der Firma Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics verwendet ( $\mu$ PLATE Anti-Hgenv).

### **3. Prävalenz des GB-Virus-C**

Epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz des GB-Virus-C sollten weitere Hinweise zur klinischen Bedeutung, zu Risikogruppen sowie möglichen Übertragungswegen von GBV-C liefern. Alle in die Prävalenzstudie einbezogenen Seren wurden hinsichtlich einer akuten GBV-C-Virämie durch RT-PCR und einer abgelaufenen GBV-C-Infektion durch den Nachweis von Anti-E2-Antikörper untersucht. Somit wurden auch Personen identifiziert, die GBV-C bereits eliminiert hatten. Die alleinige Verwendung einer PCR zum Nachweis der GBV-C-RNA hätte zu einer beträchtlichen Unterschätzung der Prävalenz dieser Infektion geführt.

Nach den Ergebnissen früherer Studien wurde GBV-C insbesondere in solchen Gruppen gefunden, die ein hohes Risiko für parenteral übertragbare Viren haben (z.B. IVDUs, Hämophile). Blutspender, die ein niedriges und der Normalbevölkerung ähnliches Infektionsrisiko aufweisen, wurden als Vergleichsgruppe für die Untersuchung von Risikogruppen, wie Hämophilie-Patienten, Homosexuelle und Prostituierte, ausgewählt. Die Untersuchung von Blutspendern (aus Bayern) ergab beim GBV-C-RNA-Nachweis in 3 % und beim Antikörpernachweis gegen das virale E2-Hüllprotein in 6 % ein positives Ergebnis (Gesamtprävalenz von 9 %). Ähnliche Werte wurden auch in anderen Regionen und Länder gefunden (Jarvis *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997b; Dille *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Casteling *et al.*, 1998; Pring-Akerblom *et al.*, 1998; Brojer *et al.*, 1999). Aus dem Prävalenzvergleich mit Risikogruppen ergab sich für Hämophile ein sechsfach, für Prostituierte ein zehnfach und für Homosexuelle ein sechzehnfach höheres GBV-C-Infektionsrisiko. Die hohe GBV-C-Prävalenz von 36 % bei Hämophilen bestätigte den schon bekannten parenteralen Übertragungsweg von GBV-C durch kontaminierte(s) Blut und Blutprodukte. Die hohe Durchseuchung von 62 % bei HIV-infizierten Homosexuellen und 50 % bei Prostituierten machen die sexuelle Übertragung als wichtigen weiteren Übertragungsweg wahrscheinlich. Dafür spricht auch eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern gegen GBV-C und der Anamnese einer Lues/Gonorrhoe bzw. dem Nachweis von Lues-Antikörpern bei Homosexuellen (keine IVDUs). Bei doppeltem Infektionsrisiko in einer Untergruppe der HIV-infizierten Homosexuellen, die zusätzlich intravenös Drogen konsumierten, stieg die Gesamtprävalenz der GBV-C-Infektion sogar auf Werte von 83 %.

Mit Ausnahme einiger Seren von KMT-Patienten und Prostituierten wurde in einem Serum nicht gleichzeitig GBV-C-RNA und E2-Antikörper nachgewiesen. Das Auftreten von Anti-E2 scheint deshalb mit dem Verschwinden von GBV-C-RNA und damit der Ausheilung einer GBV-C-Infektion assoziiert zu sein. Bei der Verlaufsbeobachtung der KMT-Patienten wurde

nach Auftreten von Anti-E2 innerhalb weniger Wochen keine GBV-C-RNA mehr nachgewiesen. Patienten ohne E2-Antikörperbildung entwickelten eine persistierende GBV-C-Infektion (Langzeitvirämie). Diese Ergebnisse führten zu der Schlußfolgerung, daß Personen mit E2-Antikörper-Bildung in der Lage sind, die GBV-C-Virämie im Blut zu klären. Personen ohne diese Fähigkeit, entweder infolge ihrer Immunreaktion, die nicht in der Lage ist, GBV-C zu erkennen, oder infolge des Virus, das in der Lage ist, effektiv dem Immunsystem zu entkommen, bleiben jedoch über Monate bis Jahre virämisch für GBV-C.

Zusammenfassend konnte die Serokonversion zur E2-Antikörper-Positivität mit der Klärung der GBV-C-Virämie assoziiert werden. Der bei Prostituierten beobachtete Anstieg der Prävalenz von E2-Antikörpern mit dem Alter bei konstanter Rate der GBV-C-RNA-Träger spricht ebenfalls dafür, daß die häufig auftretende chronische Verlaufsform einer GBV-C-Infektion auch nach vielen Jahren mit der Bildung von Anti-E2 ausheilen kann.

### **C. Ausblick**

In dieser Arbeit konnten in Hinsicht auf die Biologie, speziell die Pathologie der GB-Viren GBV-A, GBV-B und GBV-C eine Vielzahl neuer Daten erhoben werden. Insbesondere durch die Bestimmung des Replikationsortes von GBV-C war es möglich, eine Assoziation der GBV-C-Infektion mit einer Lebererkrankung weitgehend auszuschließen. Die verbleibenden 10-20 % ätiologisch unklarer Virushepatitiden sind somit vermutlich einem anderem bislang unbekanntem viralem Erreger zuzuschreiben. Derzeit werden das 1998 entdeckte TT-Virus (T.T. = Initialen des Patienten, aus dessen Serum erstmals dieses Virus isoliert werden konnte) und das erst vor kurzem in Italien beschriebene SEN-Virus (*Clinica*, 1999) als mögliche Verursacher der Non-A-E-Hepatitis diskutiert. Die Wahrscheinlichkeit, eine Hepatitis auszulösen, ist jedoch für beide Viren gering.

Auch in dieser Arbeit konnte somit weder die Frage nach anderweitig mit GBV-C assoziierten Erkrankungen, noch die Frage der klinischen Bedeutung einer GBV-C-Infektion geklärt werden. Die Aufklärung der Pathogenität und Virulenz von GBV-C wird erst durch klinische Studien (z.B. Auftreten von Krankheiten, insbesondere Erkrankungen des lymphatischen Systems, in Assoziation mit einer GBV-C-Infektion) möglich sein.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt eine Charakterisierung der im Jahr 1995 von Wissenschaftlern der Firma Abbott Diagnostics (North Chicago, USA) entdeckten flaviähnlichen, im Tamarinen vorkommenden GB-Viren, GBV-A und GBV-B, sowie des humanen GB-Virus-C dar.

GBV-A und GBV-B sind beide im sogenannten "GB-Agens H205", das als Referenzmaterial dient, vorhanden. GBV-A und GBV-B wurden isoliert und charakterisiert. Da GBV-A im Gehirngewebe in höheren Konzentrationen als GBV-B vorhanden war, gelang die Isolierung von GBV-A durch eine Tamarinpassage mit verdünntem inokuliertem Gehirnmateriel. GBV-B wurde durch Tamarinpassage des Serums eines Affen, der nach Ausheilen der GBV-A-Infektion noch GBV-B-RNA positiv war, in reiner Form gewonnen.

In Re- und Kreuzinfektionsstudien mit Tamarinen konnte eine homologe Immunität gegen den gleichen Erreger, aber das Fehlen einer Kreuzimmunität gegen den anderen Erreger gezeigt werden.

Die Untersuchung von histologischen Schnitten der Organe infizierter Krallenaffen mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung gab Aufschluß über den Ort der Replikation dieser Viren. GBV-B ist der Erreger einer Hepatitis bei Krallenaffen und war mit einer für dieses Virus spezifischen Sonde durch Hybridisierung im Zytoplasma von Hepatozyten nachzuweisen. Mit einer für GBV-A spezifischen Sonde wurde dieses Virus nur in Gehirngewebe nachgewiesen.

Für das humane GBV-C wurde der Lymphknoten, genauer das Zytoplasma der Lymphozyten, als Replikationsort ermittelt. Eine Leberpathogenität dieses Virus konnte nicht gefunden werden. Klinische Studien könnten eine Assoziation von GBV-C mit Erkrankungen des lymphatischen Systems untersuchen.

Entsprechend der Lokalisation des Hybridisierungssignals im Bereich der Lymphknotenrinde (überwiegend B-Lymphozyten) konnten, nach Auftrennung von PBMCs mit Hilfe des MACS-Systems in einzelne Zellfraktionen, die B-Lymphozyten als hauptsächlicher Replikationsort wahrscheinlich gemacht werden. Weitere Hinweise auf die Replikation von GBV-C in Lymphozyten lieferte die *in vitro*-Infektion von PBMCs durch GBV-C mit einem anschließend beobachteten Anstieg der GBV-C-Konzentration im Kulturüberstand.

In knochenmarktransplantierten Patienten wurde durch weitgehende Zerstörung des Knochenmarks ein Absinken der GBV-C-Konzentration gezeigt. Nach der Regeneration des lymphatischen Systems wurde häufig die ursprüngliche GBV-C-Konzentration wieder erreicht. Auch



dieses Ergebnis läßt sich durch die Replikation von GBV-C in Zellen des lymphatischen Systems erklären.

Zur Bestimmung der Prävalenz von GBV-C wurde ein Enzymimmuntest zum Nachweis von E2-Antikörpern mit rekombinanten Virusproteinen und monoklonalen Antikörpern gegen dieses Virus entwickelt. Ein 39 Aa langes Peptid im C-Terminus eines C-terminal verkürzten E2-Proteins war die antikörperbindende Domäne des monoklonalen Antikörpers.

Für GBV-C hatten Hämophile, Homosexuelle und Prostituierte ein erhöhtes Infektionsrisiko. Deshalb ist neben dem parenteralen Übertragungsweg auch die sexuelle Übertragung des Virus bedeutend. Für eine sexuelle Übertragung des Virus spricht, daß bei Homosexuellen das Vorhandensein von Antikörpern gegen GBV-C mit der Anamnese einer durchgemachten Syphilis oder Gonorrhoe korreliert.

Normalerweise führt die Produktion von E2-Antikörpern zu einer Elimination von GBV-C und einem Ausheilen der Infektion.

## VI. Literatur

- Aikawa T., Sugai Y., Okamoto H.** (1996) Hepatitis G infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 334: 195-196.
- Alter H.J.** (1996) The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *New England Journal of Medicine* 334: 1536-1537.
- Alter H.J., Nakatsuji Y., Melpolder J., Wages J., Wesley R., Shih J.W.K., Kim J.P.** (1997) The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *New England Journal of Medicine* 336: 747-754.
- Alter M.J., Margolia H.S., Krawczynski K., Judson F.N., Mares A., Alexander W.J., Hu P.Y., Miller J.K., Gerber M.A., Sampliner R.E., Meeks E.L., Beach M.J.** (1992) The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *New England Journal of Medicine* 327: 1899-1905.
- Alter M.J., Gallagher M., Morris T.T., Moyer L.A., Meeks E.L., Krawczynski K., Kim J.P., Margolis H.S.** (1997) Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. *New England Journal of Medicine* 336: 741-746.
- Berenguer M., Terrault N.A., Piatak M., Yun A., Kim J.P., Lau J.Y., Lake J.R., Roberts J.R., Ascher N.L., Ferrell L., Wright T.L.** (1996) Hepatitis G virus infection in patients with hepatitis C virus infection undergoing liver transplantation. *Gastroenterology* 111: 1569-1575.
- Berg T., Naumann U., Fukumoto T., Bechstein W.O., Neuhaus P., Lobeck H., Hohne M., Schreier E., Hopf U.** (1996) GB virus C infection in patients with chronic hepatitis B and C before and after liver transplantation. *Transplantation* 62: 711-714.
- Berg T., Dirla U., Naumann U., Heuft H.G., Kuther S., Lobeck H., Schreier E., Hopf U.** (1996) Responsiveness to interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *Journal of Hepatology* 25: 763-768.
- Bertolini L., Iovacci S., Ponzetto A., Gorini G., Battaglia M., Carloni G.** (1993) The human bone-marrow B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Research in Virology* 144: 281-285.
- Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica** (1996) Nonradioactive *in situ* hybridization, Application Manual; Second Edition.
- Boyum A.** (1968) Density gradient centrifugation on Isopaque-Ficoll. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* 21: 77-89.

- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bralet M.-P., Roudot-Thoraval F., Pawlotsky J.-M., Bastie A., Van-Nhieu J.T., Duval J., Dhumeaux D., Zafrani E.S.** (1997) Histopathology impact of GB virus C infection on chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 112: 188-192.
- Breitschopf H., Suchanek G., Gould R.M.; Colman D.R., Lassmann H.** (1992) *In situ* hybridization with digoxigenin-labeled probes: Sensitive and reliable detection method applied to myelinating rat brain. *Acta Neuropathology* 84: 581-587.
- Breitschopf H. and Suchanek G.** (1996) Detection of mRNA on paraffin embedded material of the central nervous system with DIG-labeled RNA probes. *Nonradioactive In Situ Hybridization. Application Manual. Procedures for In Situ Hybridization to Chromosomes, Cells and Tissue Section. Second edition.* Boehringer Mannheim.
- Brojer E., Grabarczyk P., Kryczka W., Kucharski W., Kubicka J., Zupanska B.** (1999) Analysis of hepatitis G virus infection markers in blood donors and patients with hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 6: 471-475.
- Brown K.E., Wong S., Young N.S.** (1997a) Prevalence of GBV-C/HGV, a novel „hepatitis“ virus, in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* 97: 492-496.
- Brown K.E., Wong S., Buu M., Binh T.V., Be T.V., Young N.S.** (1997b) High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in healthy persons in Ho Chi Minh City, Vietnam. *The Journal of Infectious Diseases* 175: 450-453.
- Byrnes J.J., Banks A.T., Piatak Jr. M., Kim J.P.** (1996) Hepatitis G-associated aplastic anaemia. *The Lancet* 348: 472.
- Casteling A., Song E., Sim J., Blaauw D., Heyns A., Schweizer R., Margolius L., Kuun E., Field S., Schoub B., Vardas E.** (1998) GB virus C prevalence in blood donors and high risk groups for parenterally transmitted agents from Gauteng, South Africa. *Journal of Medical Virology* 55: 103-108.
- Chen M., Sönnnerborg A., Johansson B., Sällberg M.** (1997) Detection of Hepatitis G Virus (GB Virus C) RNA in human saliva. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 973-975.
- Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A., Overby L.R., Bradley D.W. and Houghton M.** (1989) Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.

- Choo Q.-L., Weiner A.J., Overby L.R., Kuo G., Houghton M., Bradley D.W.** (1990) Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *British Medical Bulletin* 46: 423-441.
- Cribier B., Schmitt C., Bingen A., Kirn A., Keller F.** (1995) *In vitro* infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus. *Journal of General Virology* 76: 2485-2491.
- Dawson G.J., Schlauder G.G., Pilot-Matias T.J., Thiele D., Leary T.P., Murphy P., Rosenblatt J.E., Simons J.N., Martinson F.E.A., Gutierrez R.A., Lentino J.R., Pachucki C., Muerhoff A.S., Widell A., Tegtmeier G., Desai S., Mushahwar I.K.** (1996) Prevalence studies of GB Virus-C infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 50: 97-103.
- Deinhardt F., Holmes A.W., Capps R.B., Popper H.** (1967) Studies on the transmission of disease of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passage and description of liver lesions. *Journal of Experimental Medicine* 125: 673-687.
- Deinhardt F., Peterson D., Cross G., Wolfe L., Holmes A.** (1975) Hepatitis in marmosets. *American Journal of Medical Science* 270: 73-80.
- Deka N., Sharma M.D., Mukerjee R.** (1994) Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis. *Journal of Virology* 68: 7810-7815.
- Dille B.J., Surowy T.K., Gutierrez R.A., Coleman R.F., Knigge M.F., Carrick R.J., Aach R.D., Hollinger F.B., Stevens C.E., Barbosa L.H., Nemo G.J., Mosley J.W., Dawson G.J., Mushahwar I.K.** (1997) An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *Journal of Infectious Diseases* 175: 458-461.
- Fabris P., Biasin M.R., Infantolino D., Romanó L., Benedetti P., Tositti G., Pellizzer G.P., Zanetti A.R., Stecca C., Marchelle G., de Lalla F.** (1998) HGV/GBV-C in liver tissue and in sera from patients with chronic hepatitis C. *Infection* 26: 283-287.
- Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.** (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.
- Fan X., Xu Y., Solomon H., Ramrakhiani S., Neuschwander-Tetri B.A., Di Bisceglie A.M.** (1999) Is Hepatitis G/GB Virus-C hepatotropic? Detection of Hepatitis G/GB Virus-C viral RNA in liver and serum. *Journal of Medical Virology* 58: 160-164.
- Ferri C., Monti M., La Civita L., Longonbardo G., Greco F., Pasero G., Gentilini P., Bombardieri S., Zignegno A.L.** (1993) Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 82: 3701-3704.

- Feucht H.H., Zöllner B., Polywka S., Laufs R.** (1996) Vertical transmission of hepatitis G. *The Lancet* 347: 615
- Fiordalisi G., Zanella I., Mantero G., Bettinardi A., Stellini R., Paraninfo G., Cadeo G., Primi D.** (1996) High prevalence of GB Virus C infection in a group of italian patients with hepatitis of unknown aetiology. *Journal of Infectious Diseases* 174: 181-183.
- Fischler B., Lara C., Chen M., Sonnerborg A., Nemeth A., Sallberg M.** (1997) Genetic evidence for mother-to-infant transmission of hepatitis G virus. *Journal of Infectious Diseases* 176: 281-285.
- Fogeda M., Navas S., Martin J., Casqueiro M., Rodriguez E., Arocena C., Carreno V.** (1999) *In vitro* infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/ Hepatitis G Virus. *Journal of Virology* 73: 4052-4061.
- Francesconi R., Giostra F., Ballardini G.** (1997) Clinical implication of GBV-C/HGV infection in patients with „HCV-related“ chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 26: 1165-1172.
- Frider B., Sookoian S., Castano G., Gonzalez J., Flichman D., Viudez P., Dawson G.J., Schlauder G.G., Mushahwar I.K.** (1998) Detection of hepatitis G virus RNA in patients with acute non-A-E hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 5: 161-164.
- Frösner G.** (1996) Moderne Hepatitisdiagnostik. *Kilian Verlag*.
- Gall J.G., Pardue M.L.** (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 63: 378-383.
- Guruprasad K., Reddy B.V., Pandit M.W.** (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering* 4: 155-161.
- Gutierrez R.A., Dawson G.J., Knigge M.F., Melsin S.L., Heynen C.A., Kyrk C.R., Young C., Carrick R.J., Schlauder G.G., Surowy T.K., Dille G.J., Coleman P.F., Thiele D.L., Lentino J.R., Pachucki C., Mushahwar I.K.** (1997) Seroprevalence of GB virus C and persistence of RNA and antibody. *Journal of Medical Virology* 53: 167-173.
- Haagsma E.B., Cuypers H.T., Gouw A.S., Sjerps M.C., Huizenga J.R., Slooff M.J., Jansen P.L.** (1997) High prevalence of hepatitis G virus after liver transplantation without apparent influence on long-term graft function. *Journal of Hepatology* 26: 921-925.
- Hadziyannis S.J.** (1997) Fulminant hepatitis and the new hepatitis G/GBV-C flavivirus. *Journal of Viral Hepatitis* 4: 15-19.

- Heukeshoven J., Dernick R.** (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Holmes A.W., Deinhardt F., Wolfe L., Frösner G., Peterson D., Casto B.** (1973) Specific neutralization of human hepatitis type A in marmoset monkeys. *Nature* 243: 419-420.
- Invitrogen** (1997a) Original TA Cloning® Kit. *Handbuch, Version C.*
- Invitrogen** (1997b) TA Cloning® Kit Dual Promotor (pCR®II). *Handbuch, Version A.*
- Invitrogen** (1998a) Anti-Xpress™ Antibody. *Handbuch, Version F.*
- Invitrogen** (1998b) pBAD/His A, B, C and pBAD/Myc-His A, B, C. *Handbuch, Version A.*
- Invitrogen** (1998c) TOPO TA Cloning. *Handbuch, Version C.*
- Invitrogen** (1998d) Xpress™ System Protein Purification. *Handbuch, Version C.*
- Invitrogen Homepage** (2000) <http://www.invitrogen.com>.
- Jarvis L.M., Davidson F., Hanley P.L., Ludlam C.A., Simmonds P.** (1996) Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 348: 1352-1355.
- Kallinowski B., Buhrmann C., Seipp S.** (1996) Infection with hepatitis GB-C virus after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 24: 289A.
- Kanda T., Yokosuka O., Ehata T.** (1996) GBV-C is unlikely to be the cause of non-A-E fulminant hepatitis in Japan. *Hepatology* 24: 531A.
- Kao J.H., Chen P.-J., Chen D.-S.** (1996) GBV-C in the aetiology of fulminant hepatitis. *The Lancet* 347: 120.
- Kao J.H., Chen W., Chen P.J., Lai M.Y., Lin R.Y., Chen D.S.** (1997a) GB Virus C/ Hepatitis G Virus infection in prostitutes: Possible role of sexual transmission. *Journal of Medical Virology* 52: 381-384.
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y., Wang T.H., Chen D.S.** (1997b) Positive and negative strand of hepatitis C virus RNA sequences in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C: no correlation with viral genotypes 1b, 2a and 2b. *Journal of Medical Virology* 52: 270-274.
- Karayiannis P., McGarvey M.J.** (1995) The GB hepatitis viruses. *Journal of Viral Hepatitis* 2: 221-226
- Karayiannis P., Pickering J., Chiaramonte M., Thomas H.C.** (1997) Hepatitis G virus infection. *The Lancet* 349: 954.
- Karayiannis P., Brind A.M., Pickering J., Mathew J., Burt A.D., Hess G., Bassendine M.F.** (1998) Hepatitis G virus does not cause significant liver disease after liver transplantation. *Journal of Viral Hepatitis* 5: 35-42.

- Katayama K., Kageyama T., Fukushi S., Hoshino F.B., Kurihara C., Ishiyama N., Okamura H., Oya A.** (1998) Full-length GBV-C/HGV genomes from nine Japanese isolates: characterization by comparative analyses. *Arch. Virology* 143: 1063-1075.
- Kekulé A.S., Frösner G.G.** (1997) Molekularbiologie und Pathogenese des Hepatitis G-Virus. *Deutsches Ärzteblatt* 94: 2064-2068.
- Khudyakov Y.E., Cong M.-E., Bonafonte M.-T., Abdulmalek S., Nichols B.L., Lambert S., Alter M.J., Fields H.A.** (1997) Sequence variation within a nonstructural region of the hepatitis G virus genome. *Journal of Virology* 71: 6875-6880.
- Kim J., Linnen J., Wages J., Zhang-Keck Z.-Y., Belyaev A., Zhang Y., Fung K., Krawczynski K., Alter M., Koonin E., Lim M., Hadlock K., Young L., Hoover C., Fernandez J., Piatak M., Chong S., Karayiannis P., Thomas H., Hadziyannis S., Hess G., Bradley D., Fong S., Margolis H., Shih J., Alter H., Fry K.** (1997) Molecular cloning and characterization of hepatitis G virus (HGV) *Submitted for publication*.
- Kobayashi M., Tanaka E., Nakayama J., Furuwatari C., Katsuyama T., Kawasaki S., Kiyosawa K.** (1999) Detection of GB virus C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *Journal of Medical Virology* 57: 114-121.
- Köhler G., Milstein C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Köhler G., Milstein C.** (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal of Immunology* 6: 511-519.
- Kudo T., Morishima T., Shibata M.** (1997) Hepatitis G infection. *The New England Journal of Medicine* 337: 276.
- Kuwada S.K., Patel V.M., Hollinger B., Lin H.J., Yarbough P.O., Wiesner R.H., Kaese D., Rakela J.** (1994) Non-A, non-B fulminant hepatitis is also non-E and non-C. *American Journal of Gastroenterology* 89: 57-61.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laskus T., Wang L.F., Radkowski M., Jang S.J., Vargas H., Dodson F., Fung J., Rakela J.** (1997) Hepatitis G virus infection in American patients with cryptogenic cirrhosis: no evidence for liver replication. *Journal of Infectious Diseases* 176: 1491-1495.
- Laskus T., Radkowski M., Wang L.-F., Vargas H., Rakela J.** (1998) Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *Journal of Virology* 72: 3072-3075.

- Laufs R., Feucht H.-H., Polywka S., Zöllner B., Schröter M., Knödler B., Kühnl P., Oehler G., Nolte H., Bärsch J.** (1997a) Übertragungswege und klinische Bedeutung des Hepatitis-G-Virus. *Deutsches Ärzteblatt* 94: 2069-2071.
- Laufs R., Feucht H.-H., Polywka S., Schröter M., Schäfer P.** (1997b) Epidemiology of the new hepatitis viruses C and G. *Biotest Bulletin* 5: 271-276.
- Leary T.P., Muerhoff A.S., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Erker J.C., Chalmers M.L., Schlauder G.G., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1996a) Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the *Flaviviridae* associated with human non-A-E hepatitis. *Journal of Medical Virology* 48: 60-67.
- Leary T.P., Muerhoff A.S., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Erker J.C., Chalmers M.L., Schlauder G.G., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1996b) Consensus oligonucleotide primers for the detection of GB virus C in human cryptogenic hepatitis. *Journal of Virological Methods* 56: 119-121.
- Lefrère J.J., Férec C., Roudot-Thoraval F., Loiseau P., Cantaloube J.F., Biagini P., Mariotti M., LeGac G., Mercier B.** (1999) GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individuals and in immunocompetent individuals. *Journal of Medical Virology* 59: 32-37.
- Lin H.-H., Kao J.-H., Chen P.-J., Chen D.-S.** (1996) Mechanism of vertical transmission of hepatitis G. *The Lancet* 347: 1116
- Lin H.-H., Kao J.-H., Yeh K.-Y., Liu D.-P., Chang M.-H., Chen P.-J., Chen D.-S.** (1998) Mother-to-infant transmission of GB virus C/hepatitis G virus: The role of high-titered maternal viremia and mode of delivery. *Journal of Infectious Diseases* 177: 1202-1206.
- Linnen J., Wages J., Zhang-Keck Z.-Y., Fry K.E., Krawczynski K.Z., Alter H., Koonin E., Gallagher M., Alter M., Hadziyannis S., Karayiannis P., Fung K., Nakatsuji Y., Shih J.W., Young L., Piatak M. Jr., Hoover C., Fernandez J., Chen S., Zou J.C., Morris T., Hyams K.C., Ismay S., Lifson J.D., Kim J.P.** (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 271: 505-508.
- Linnen J.M., Fung K., Fry K.E., Mizokami M., Ohba K., Wages Jr. J.M., Zhang-Keck Z.-Y., Song K., Kim J.P.** (1997) Sequence variation and phylogenetic analysis of the 5' terminus of hepatitis G virus. *Journal of Viral Hepatitis* 4: 293-302.
- Lisitsyn N., Wigler M.** (1993) Cloning the difference between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.
- Lou S., Qiu X., Leitza S.** (1997) GBV-C E2 immunoassays to study prevalence of GBV-C in US blood donors. *Journal of Hepatology* 26: 86A.



- Manolakopoulos S., Morris A., Davies S., Brown D., Hajat S., Dusheiko G.** (1998) Influence of GB virus C viraemia on the clinical, virological and histological features of early hepatitis C-related hepatic disease. *Journal of Hepatology* 28: 173-178.
- Marcellin P., Martinot-Peignoux M., Gabriel F., Branger M., Degott C., Elias A., Xu L.Z., Larzul D., Erlinger S., Benhamou J.P.** (1993) Chronic non-B, non-C hepatitis among blood donors assessed with HCV third generation tests and polymerase chain reaction. *Journal of Hepatology* 19: 167-170.
- Masahide O., Norio H., Eiji M., Sadaharu I., Naoki H., Taizo H., Michio K., Manabu M., Yutaka S., Akinori K., Masatsugu H.** (1998) GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: Its effect on clinical features and interferon therapy. *Journal of Medical Virology* 55: 98-102.
- Massenkeil G., Zwiebel F.M., Stefanic M., Rosen O., Zachoval R., Frösner G., Arnold R.** (1998) Hepatitis G virus detection after allogeneic bone marrow transplantation. *Abstract: Gemeinsame Jahrestagung der deutschen und österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Frankfurt.*
- Masuko K., Mitsui T., Iwano K., Yamazaki C., Okuda K., Meguro T., Murayama N., Inoue T., Tsuda F., Okamoto H., Miyakawa Y., Mayumi M.** (1996) Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *New England Journal of Medicine* 334: 1485-1490.
- 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. *Journal of General Virology* 79: 705-714.
- Miltenyi Biotec** (1999) Instructions for use MiniMACS and MidiMACS. *Handbuch.*
- Miyakawa Y., Mayumi M.** (1997) Hepatitis G virus – a true hepatitis virus or an accidental tourist? *New England Journal of Medicine* 336: 795-796.
- Moaven L., Angus P., Bowden D.S.** (1996) Hepatitis G virus is not the cause of Non-A-E fulminant hepatitis. *The IX Triennial International Symposium of Viral Hepatitis and Liver Disease. Abstract Volume, CpA: 252.*
- Moaven L., Locarnini S.A., Bowden D.S., Kim J.P., Breschkin A., McCaw R., Yun A., Wages J. Jr., Jones B., Angus P.** (1997) Hepatitis G virus and fulminant hepatic failure: evidence for transfusion-related infection. *Journal of Hepatology* 27: 613-619.
- Modrow S., Falke D.** (1997) Molekulare Virologie. *Spektrum, Akademischer Verlag*

- Moriyama K., Okamura T., Nakano S.** (1997) Hepatitis GB virus C genome in the serum of aplastic anaemia patients receiving frequent blood transfusions. *British Journal of Haematology* 96: 864-867.
- Müller C.** (1999) Pathogenicity of GBV-C/HGV infection. *Journal of Viral Hepatitis* 6: 49-52.
- Muerhoff A.S., Leary T.P., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Dawson G.J., Erker J.C., Chalmers M.L., Schlauder G.G., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1995) Genomic organization of GB viruses A and B: Two new members of the *Flaviviridae* associated with GB agent hepatitis. *Journal of Virology* 69: 5621-5630.
- Muerhoff A.S., Simons J.N., Leary T.P., Erker J.C., Chalmers M.L., Pilot-Matias R.J., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1996) Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *Journal of Hepatology* 25: 379-384.
- Mukaide M., Mizokami M., Orito E., Ohba K., Nakano T., Ueda R., Hikiji K., Iino S., Shapiro S., Lahat N., Park Y.-M., Kim B.-S., Oyunsuren T., Rezeig M., Al-Ahdal M.N., Lau J.Y.N.** (1997) Three different GB virus C/hepatitis G virus genotypes. Phylogenetic analysis and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Letters* 407: 51-58.
- Mushahwar I.K., Zuckerman J.N.** (1998) Clinical implications of GB virus C. *Journal of Medical Virology* 56: 1-3.
- Ng S.-Y., Gunning P., Eddy R., Ponte P., Leavitt J., Shows T., Kedes L.** (1985) Evolution of the functional human  $\beta$ -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Molecular and Cellular Biology* 5: 2720-2732.
- Okamoto H.Y., Sugiyama Y., Okada S., Kurai K., Akahane Y., Sugai Y., Tanaka T., Sato K., Tsuda F., Miyakawa Y., Mayumi M.** (1992) Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. *Journal of General Virology* 73: 673-679.
- Okamoto H., Nakao H., Inoue T., Fukuda M., Kishimoto J., Iizuka H., Tsuda F., Miyakawa Y., Mayumi M.** (1997) The entire nucleotide sequence of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *Journal of General Virology* 78: 737-745.
- Old R.W., Primrose S.B.** (1992) Gentechnologie: Eine Einführung. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

- Papaevangelou V., Spanou E., Kattamis C., Hadziyannis S.** (1997) GBV-C infection in multiply transfused thalassemia patients with chronic non A-E hepatitis. *Journal of Hepatology* 26: 91.
- Pardue M.L., Gall J.G.** (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Methods of Cellular Biology* 10: 1-16.
- Parks W.P. and Melnick J.L.** (1969a) Attempted isolation of hepatitis viruses in marmosets. *Journal of Infectious Diseases* 120: 539-547.
- Parks W.P., Melnick J.L., Voss W.R., Singer D.B., Rosenberg H.S., Alcott J., Casazza A.M.** (1969b) Characterization of marmoset hepatitis virus. *Journal of Infectious Diseases* 120: 548-559.
- Paroli M., Accapezzato D., Barnaba V.** (1995) Virus escape from immune control: mechanisms of persistence within the host. *Research in Virology* 146: 267-271.
- Pawlotsky J.-M., Roudot-Thoraval F., Pellerin M.** (1996) GBV-C infection in HCV-infected patients: Epidemiological characteristics, influence on HCV infection and response to interferon alpha therapy. *Hepatology* 24: 226A.
- Perkin Elmer** (1995) Sequenzierungsprotokoll "ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (with AmpliTaq® DNA Polymerase, FS)".
- Pessoa M.G., Terrault N.A., Detmer J., Kolberg J., Collins M., Hassoba H.M., Wright T.L.** (1998) Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: Evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 27: 877-880.
- Pilot-Matias T.J., Muerhoff A.S., Simons J.N., Leary T.P., Buijk S.L., Chalmers M.L., Erker J.C., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1996a) Identification of antigenic regions in the GB hepatitis viruses GBV-A, GBV-B and GBV-C. *Journal of Medical Virology* 48: 329-338.
- Pilot-Matias T.J., Carrick R.J., Coleman P.F., Leary T.P., Surowy T.K., Simons J.N., Muerhoff A.S., Buijk S.L., Chalmers M.L., Dawson G.J., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1996b) Expression of the GB virus C E2 glycoprotein using the Semliki Forest virus vector system and its utility as a serologic marker. *Virology* 225: 282-292.
- Pring-Akerblom P., Maiworm M., Harpain O., Eiz B.** (1998) Prevalence and sequence variability of hepatitis G virus genomes among blood donors in Northern Germany. *Persönliche Mitteilung, Skript*.
- Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K., Young L.M., Fry K.E. and Bradley D.W.** (1990) Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted Non-A, Non-B. *Science* 247: 1335-1339.

- Reyes G.R., Yarbough P.O., Tam A.W., Purdy M.A., Huang C.C., Kim J.S., Bradley D.W., Fry K.E.** (1991) Hepatitis E virus (HEV): the novel agent responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Gastroenterologia Japonica* 26: 142-147.
- Rodriguez-Inigo E., Casqueiro M., Navas S., Bartolomé J., Pardo M., Carreno V.** (2000) Fluorescent „in situ“ hybridization of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 60: 269-274.
- Saleh M.G., Tibbs C.J., Koskinas T.J., Pereira L.M.M.B., Bomford A.B., Portmann B.C., McFarlane I.G., Williams R.** (1994) Hepatic and extrahepatic hepatitis C virus replication in relation to response to interferon therapy. *Hepatology* 20: 1399-1404.
- Sallie R., Shaw J., Mutimer D.** (1996) GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *The Lancet* 347: 1552.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Scallan M.F., Clutterbuck D., Jarvis L.M., Scott G.R., Simmonds P.** (1998) Sexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus. *Journal of Medical Virology* 55: 203-208.
- Schlauder G.G., Dawson G.J., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Gutierrez R.A., Heynen C.A., Knigge M.F., Kurpiewski G.S., Buijk S.L., Leary T.P., Muerhoff A.S., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1995) Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *Journal of Medical Virology* 46: 81-90.
- Schlueter V., Schmolke S., Stark K., Hess G., Ofenloch-Haehnle B., Engel A.M.** (1996) Reverse transcription-PCR detection of hepatitis G virus. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2660-2664.
- Schröter M., Feucht H.-H., Schäfer P., Zöllner B., Laufs R.** (1999) GB virus C/hepatitis G virus infection in hemodialysis patients: Determination of seroprevalence by a four-antigen recombinant immunoblot assay. *Journal of Medical Virology* 57: 230-234.
- Seemayer C.A., Viazov S., Philipp T., Roggendorf M.** (1997) Detection of GBV-C/HGV RNA in saliva and serum, but not in urine of infected patients. *Infection* 26: 39-41.
- Shimizu Y.K., Iwamoto A., Hijikata M., Purcell R.H., Yoshikuba H.** (1992) Evidence for *in vitro* replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5477-5481.
- Shimizu Y.K., Hijikata M., Kiyohara T., Kitamura Y., Yoshikura H.** (1999) Replication of GB virus C (hepatitis G virus) in interferon-resistant Daudi cells. *Journal of Virology* 73: 8411-8414.

- Simmonds P., McOmish F., Yap P.L., Chan S.W., Lin C.K., Dusheiko G., Saeed A.A., Holmes E.C.** (1993) Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: Identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *Journal of General Virology* 74: 661-668.
- Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Leary T.P., Dawson G.J., Desai S.M., Schlauder G.G., Muerhoff A.S., Erker J.C., Buijk S.L., Chalmera M.L., Van Sant C.L., Mushahwar I.K.** (1995a) Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3401-3405.
- Simons J.N., Leary T.P., Dawson G.J., Pilot-Matias T.J., Muerhoff A.S., Schlauder G.G., Desai S.M., Mushahwar I.K.** (1995b) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine*, 1: 564-569.
- Simons J.N., Desai S.M., Schultz D.E., Lemon S.M., Mushahwar I.K.** (1996) Translation initiation in GB viruses A and C: Evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *Journal of Virology*, 70: 6126-6135.
- Smith D.B., Cuceanu N., Davidson F., Jarvis L.M., Mokili J.L.K., Hamid S., Ludlam C.A., Simmonds P.** (1997) Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5' non-coding region. *Journal of General Virology* 78: 1533-1542.
- Stark K., Bienzle U., Hess G., Engel A.M., Hegenscheid B., Schluter V.** (1996) Detection of the hepatitis G virus genome among injecting drug users, homosexual and bisexual men and blood donors. *Journal of Infectious Diseases* 174: 1320-1323.
- Stark K., Doering C.D., Bienzle U., Pauli G., Hamouda O., Engel A.M., Schreier E.** (1999) Risk and clearance of GB virus C/hepatitis G virus infection in homosexual men: A longitudinal study. *Journal of Medical Virology* 59: 303-306.
- Stuyver L., Rossau R., Wyseur A., Duhamel M., Vanderborght B., Van-Heuverswyn H.V., Maerteus G.** (1993) Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* 74: 1093-1102.
- Surowy T.K., Leary T.P., Carrick R.J., Knigge M.F., Pilot-Matias T.J., Heynen C., Gutierrez R.A., Desai S.M., Dawson G.J., Mushahwar I.K.** (1997) GB virus C E2 glycoprotein: expression in CHO cells, purification and characterization. *Journal of General Virology* 78: 1851-1859.
- Tacke M., Kiyosawa K., Stark K., Schlueter V., Ofenloch-Haehnle B., Hess G.** (1997) Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *The Lancet* 349: 318-320.

- Thomas D.L., Nakatsuji Y., Shih J.W., Alter H.J., Nelson K.E., Astemborski J.A., Lyles C.M., Vlahov D.** (1997) Persistence and clinical significance of hepatitis G virus infections in injecting drug users. *Journal of infectious diseases* 176: 586-592.
- Thomas D.L., Vlahov D., Alter H.J., Hunt J.C., Marshall R., Astemborski J.A., Nelson K.E.** (1998) Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. *Journal of infectious diseases* 177: 539-542.
- Thomas H.C., Pickering J., Karayiannis P.** (1997) Identification, prevalence and aspects of molecular biology of hepatitis G virus. *Journal of Viral Hepatitis* 4: 51-54.
- Tucker T.J., Smuts H., Eickhaus P., Robson S.C., Kirsch R.E.** (1999) Molecular characterization of the 5' non-coding region of South Africa GBV-C/HGV isolates: Major deletion and evidence for a fourth genotype. *Journal of Medical Virology* 59: 52-59.
- Viazov S., Riffelmann M., Sarr S., Ballauff A., Meisel H., Roggendorf M.** (1997) Transmission of GBV-C/HGV from drug-addicted mothers to their babies. *Journal of Hepatology* 27: 85-90.
- Westermeier et al.**
- Wu R.-R., Mizokami M., Cao K., Nakano T., Ge X.-M., Wang S.-S., Orito E., Ohba K.-I., Mukaide M., Hikiji K., Lau J.Y.N., Iino S.** (1997) GB virus C/hepatitis G virus infection in Southern China. *The Journal of Infectious Diseases* 175: 168-171.
- Xiang J., Klinzman D., McLinden J., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Gish R., Stapleton J.T.** (1998) Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: Evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *Journal of Virology* 72: 2738-2744.
- Xiang J., Daniels K.J., Soll D.R., Schmidt W.N., LaBrecque D.R., Stapleton J.T.** (1999) Visualization and characterization of GB virus-C particles: evidence for a nucleocapsid. *Journal of Viral Hepatitis* 6: 16-22.
- Yashina T.L., Favorov M.O., Khudyakov Y.E., Fields H.A., Znoiko O.O., Shkurko T.V., Bonafonte T., Sevall J.S., Agopian M.S., Peter J.B.** (1997) Detection of hepatitis G virus (HGV) RNA: Clinical characteristics of acute HGV infection. *Journal of Infectious Diseases* 175: 1302-1307.
- Yoshida M., Okamoto H., Mishiro S.** (1995) Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *The Lancet* 346: 1131-1132.
- Zaidi Y., Chapman C.S., Myint S.** (1996) Aplastic anaemia after HGV infection. *The Lancet* 348: 471-472.

**Zhang X.H., Shinzawa H., Shao L., Ishibashi M., Saito K., Ohno S., Yamada N., Misawa H., Togashi H., Takahashi T.** (1997) Detection of hepatitis G virus RNA in patients with hepatitis B, hepatitis C and non-A-E hepatitis by RT-PCR using multiple primer sets. *Journal of Medical Virology* 52: 385-390.

**Zignegno A.L., Macchia D., Monti M., Thiers V., Mazetti M., Foschi M., Maggi E., Romagnani S., Gentilini P., Brechot C.** (1992) Infection of peripheral mononuclear cells by hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 15: 382-386.

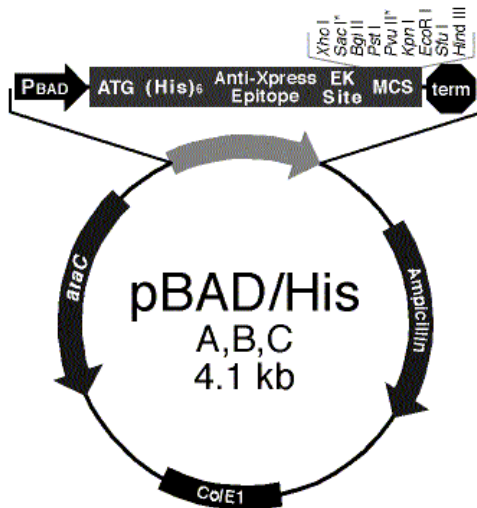
**VII. ANHANG****A. Abkürzungen**

Abb.	Abbildung	IU/L	International Units/Liter
A <sub>x</sub>	Absorption bei x nm	k	als Vorsilbe: kilo
Ag	Antigen	Kan	Kanamycin
Ak	Antikörper	Kap.	Kapitel
ALT	Alanin-Aminotransferase	kb	Kilobase(n)
Amp	Ampicillin	L	Liter
As	Aminosäure	m	als Vorsilbe: milli
bp	Basenpaar(e)	MG	Molekulargewicht
BSA	Rinderserumalbumin	min	Minute
bzw.	beziehungsweise	n.g.	nicht getestet
C	Core	n.I.	nach Inokulation
°C	Grad Celsius	NS	Nichtstruktur
ca.	circa	nt	Nukleotid
cDNA	copy-DNA	3`-NTR	3`-Nichttranslatierende Region
D	Dalton	5`-NTR	5`-Nichttranslatierende Region
d.h.	das heißt	OD	optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ORF	Offener Leserahmen
DNase	Desoxyribonuklease	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dsDNA	Doppelstrang-DNA	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
E1	Envelope 1 (Hüllprotein 1)	RDA	Representational Difference Analysis
E2	Envelope 2 (Hüllprotein 2)	RNA	Ribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraadenylat	RT	Reverse Transkription
ELISA	Enzym-linked Immuno Sorbent Assay	Rt	Raumtemperatur
FKS	Fötale Kälberserum	s	Sekunde(n)
g	Gramm	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
GT	Glutamin-Transpeptidase	s.o.	siehe oben
GBV-A	GB-Virus-A	ssDNA	Einzelstrang-DNA
GBV-B	GB-Virus-B	s.u.	siehe unten
GBV-C	GB-Virus-C	Tab.	Tabelle
GdmCl	Guanidin-Hydrochlorid	U	Unit (enzymatische Einheit)
GPT	Glutamin-Phosphat-Transferase	u.a.	unter anderem
h	Stunde	ÜN	über Nacht
HAV	Hepatitis A-Virus	U/min	Umdrehungen pro Minute
HBV	Hepatitis B-Virus	Verd.	Verdünnung
HCV	Hepatitis C-Virus	vgl.	vergleiche
HDV	Hepatitis D-Virus	v/v	Volumen pro Volumen
HEV	Hepatitis E-Virus	w/v	Gewicht pro Volumen
HGV	Hepatitis G-Virus	w/w	Gewicht pro Gewicht
H <sub>2</sub> O	Wasser	z.B.	zum Beispiel
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	bidestilliertes Wasser	z.T.	zum Teil



## B. Vektoren

### 1. Expressionsvektoren



\*Sac I und PvuII sind in pBAD/His C nicht vorhanden.

#### **Anmerkungen zu pBAD/His A:**

4104 Nukleotide

BAD Promotorregion: Base 2-250

Start-ATG: Base 320-322

Polyhistidinschwanz: Base 332-349

Anti-Xpress™ Epitop: Base 389-412

Enterokinase-Erkennungsstelle: Base 398-412

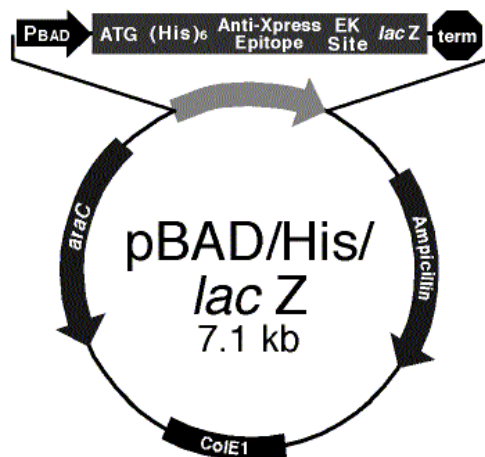
Multiple cloning site: Base 421-461

rrnB Transkriptionsabbruchregion: Base 554-711

Ampicillin ORF: Base 991-1851

ColE1 ori: Base 1996-2669

AraC ORF: Base 4078-3200



#### **Anmerkungen zu pBAD/His lacZ:**

7115 Nukleotide

BAD Promotorregion: Base 2-250

Start-ATG: Base 320-322

Polyhistidinschwanz: Base 332-349

Anti-Xpress™ Epitop: Base 389-412

Enterokinase-Erkennungsstelle: Base 398-412

LacZ Anteil für Fusion: Base 413-3478

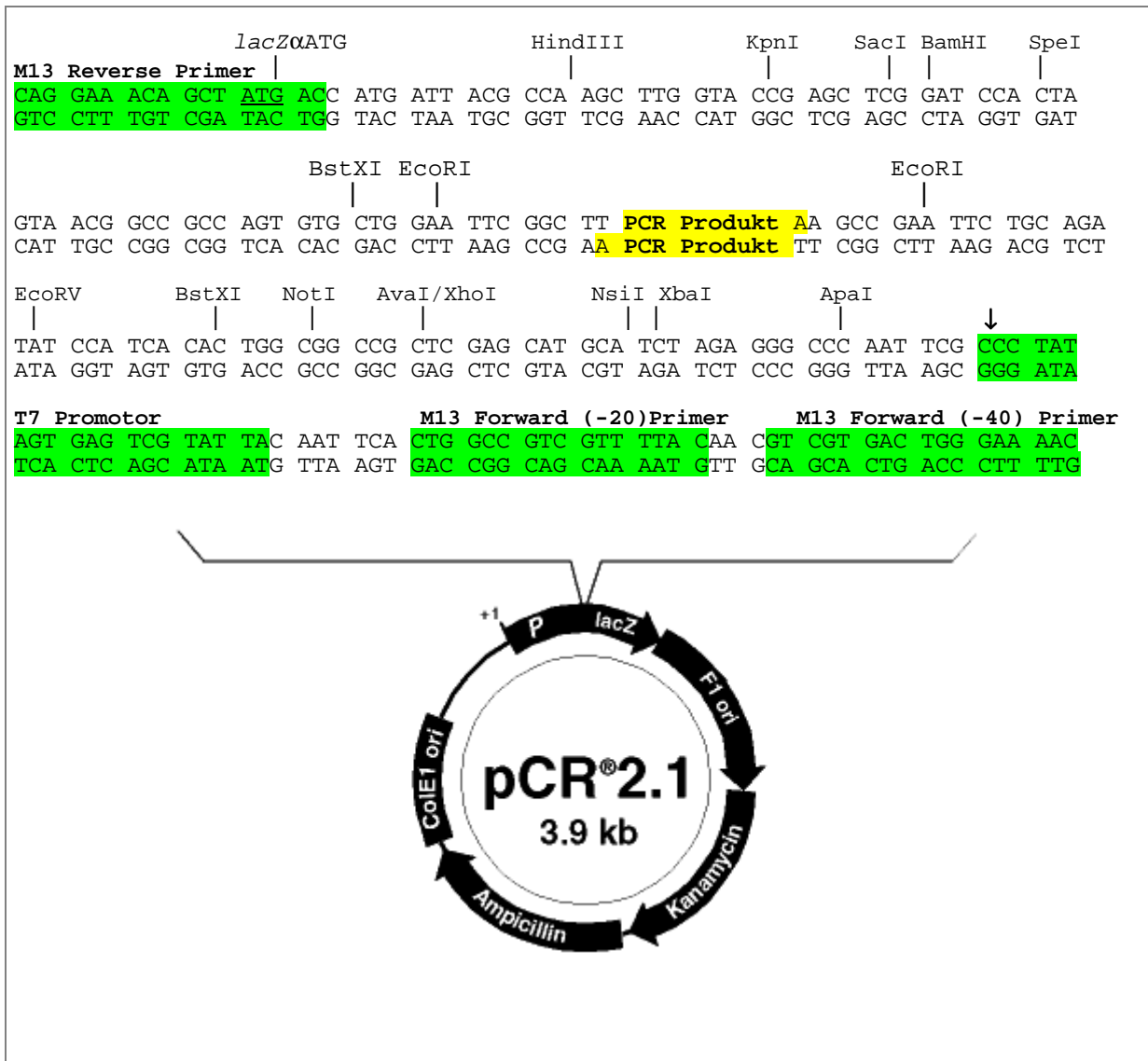
rrnB Transkriptionsabbruchregion: Base 3565-3722

Ampicillin ORF: Base 4002-4862

ColE1 ori: Base 5007-5680

AraC ORF: Base 7089-6211

## 2. TA-Klonierungsvektoren



Oberhalb ist die Sequenz des Vektors pCR®2.1 mit einem PCR-Produkt, das durch TA-Klonierung eingefügt wurde, zu sehen. Das eingefügte PCR-Produkt ist auf beiden Seiten durch EcoRI-Schnittstellen flankiert. Der Pfeil (↓) zeigt den Transkriptionsstart der T7 RNA Polymerase an.

### Anmerkungen zu pCR®2.1 (3890 Nukleotide)

LacZ alpha Fragment: Base 1-571

M13 reverse Bindestelle: Base 205-221

Multiple cloning site: Base 234-339

T7 Promotor/Bindestelle: Base 346-365

M13 Forward (-20) Bindestelle: Base 373-388

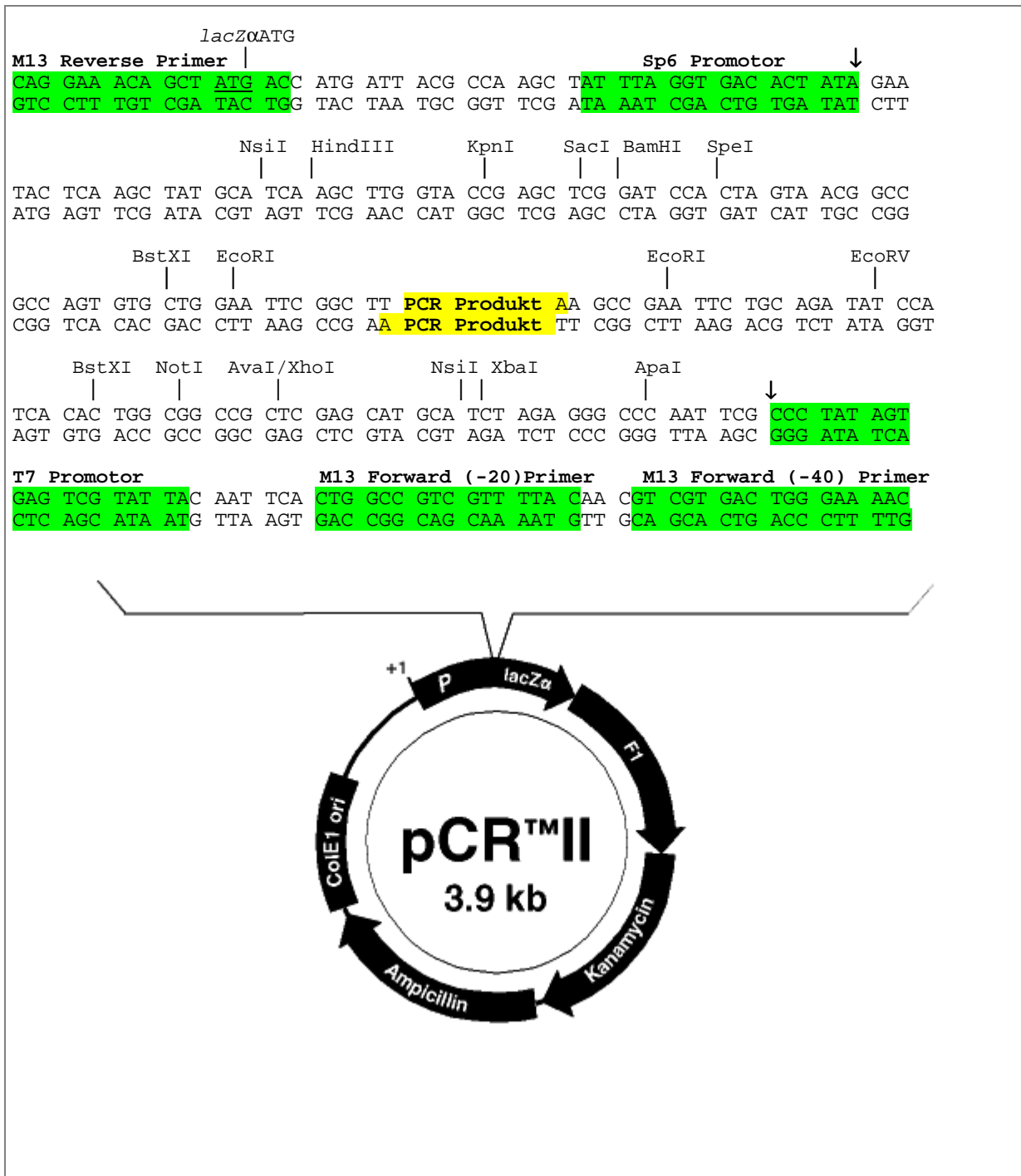
M13 Forward (-40) Bindestelle: Base 392-408

f1 origin: Base 530-944

Kanamycinresistenz ORF: Base 1278-2072

Ampicillinresistenz ORF: Base 2090-2950

ColE1 origin: Base 3095-3768



Oberhalb ist die Sequenz des Vektors pCR®II mit einem PCR-Produkt, das durch TA-Klonierung eingefügt wurde, zu sehen. Das eingefügte PCR Produkt ist auf beiden Seiten durch EcoRI-Schnittstellen flankiert. Pfeile (↓) zeigen den Transkriptionsstart der Sp6 und T7 RNA Polymerasen an.

#### Anmerkungen zu pCR®II (3932 Nukleotide)

LacZ Gen: Base 1-571

Sp6 Promotor: Base 239-255

Multiple cloning site: Base 269-381

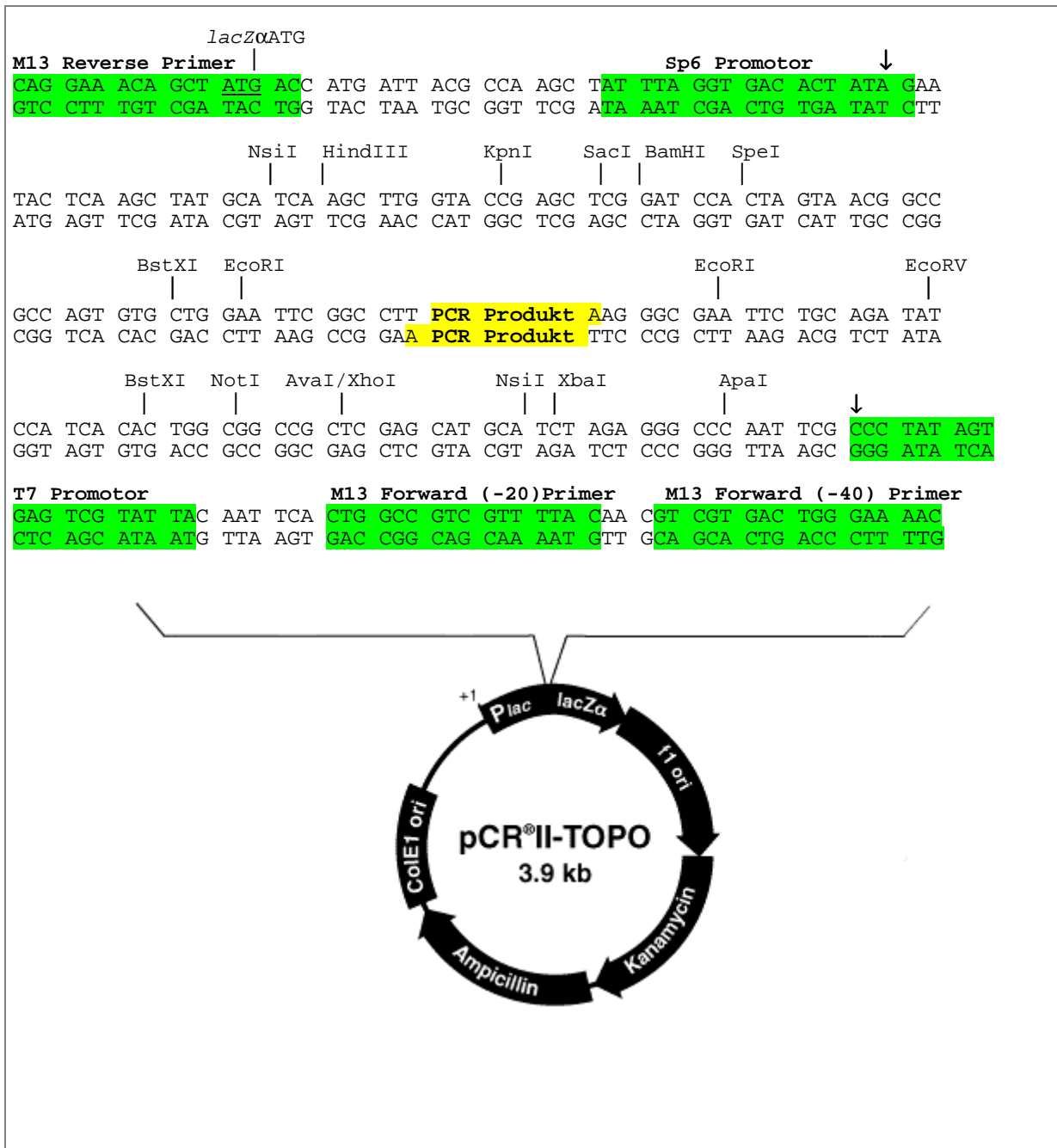
T7 Promotor: Base 388-407

f1 origin: Base 572-986

Kanamycinresistenz: Base 987-2114

Ampicillinresistenz: Base 2133-2992

ColE1 origin: Base 3182-3765



Oberhalb ist die Sequenz des Vektors pCR®II-TOPO mit einem PCR-Produkt, das durch TA-Klonierung eingefügt wurde, zu sehen. Das eingefügte PCR Produkt ist auf beiden Seiten durch EcoRI-Schnittstellen flankiert. Pfeile (↓) zeigen den Transkriptionsstart der Sp6 und T7 RNA Polymerasen an.

#### Anmerkungen zu pCR®II-TOPO (3950 Nukleotide)

LacZ Gen: Base 1-588

M13 reverse Bindestelle: Base 205-221

Sp6 Promotor: Base 239-256

Multiple cloning site: Base 269-399

T7 Promotor: Base 406-425

M13 (-20) Forward Bindestelle: Base 433-448

M13 (-40) Forward Bindestelle: Base 453-468

f1 origin: Base 590-1004

Kanamycinresistenz ORF: Base 1338-2132

Ampicillinresistenz ORF: Base 2150-3010

ColE1 origin: Base 3155-3828

## C. Publikationen/Vorträge

**Hofmann A.**, Luthardt B., Nitschko H., Breitschopf H., Frösner G. (1998) Nachweis des GB-Virus-A und GB-Virus-B im Gewebe von Tamarinen mittels Digoxigenin-markierten RNS-Sonden. Poster und Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg (Deutschland).

**Hofmann A.**, Tucker T., Zchoval R., Nitschko H., Breitschopf H., Frösner G. (1998) Localisation of Replication Site of GB-Virus-A, GB-Virus-B and GB-Virus-C by *in situ* Hybridization. Poster auf dem Kongreß „Progress in Clinical Virology IV“ der European Society for Clinical Virology, Hamburg (Deutschland).

**Hofmann A.**, Breitschopf H., Wächtler M., Zwiebel F.M., Massenkeil G., Frösner G. (1999) Bestimmung der Replikationsorte der GB-Viren und Prävalenz des GB-Virus-C/Hepatitis G-Virus. Poster auf dem 5. Deutschen Kongreß für Infektions- und Tropenmedizin, München (Deutschland).

Wächtler M., **Hofmann A.**, Müller G., Frösner G., Karwat M., Nitschko H., Knetsch I., Emminger C., Eichenlaub D. (1999) Prevalence of GBV-C/HGV RNA and anti-E2 glycoprotein antibody in homosexual men with HIV-coinfection: Risk factor analysis of infection. (wird eingereicht bei „*Infection*“).

Wächtler M., **Hofmann A.**, Müller G., Frösner G., Karwat M., Nitschko H., Knetsch I., Emminger C., Eichenlaub D. (1999) GBV-C-RNA and anti-E2 glycoprotein antibody seroprevalence in homosexual men with HIV-coinfection: Risk factor analysis of infection. Poster auf dem 13. Meeting der „International Society for Sexually Transmitted Diseases Research“, Denver (USA).

# *Curriculum vitae*

## Persönliche Daten

Alexandra Hofmann  
geb. am 26. Juli 1970 in Laupheim  
ledig

## Wissenschaftlicher Bildungsweg

### momentane Tätigkeit

#### **seit April 1996**

Doktorand am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl Virologie, AG Prof. Dr. G. G. Frösner. Molekularbiologische Untersuchung der GB-Viren: Nachweis des Replikationsorts der GB-Viren; Expression und Aufreinigung von Virusproteinen; Etablierung eines ELISA; Prävalenzstudien.

Angestrebter Abschluß: *Dr. rer. nat.*

### Diplomarbeit

#### **Dezember 1994 bis Dezember 1995**

Am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg, Prof. Dr. R. Jaenicke.

Triosephosphat-Isomerase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*: Rekombinante Herstellung des getrennten Gens und dessen Expression in *Escherichia coli*.

Abschluß: *Dipl. Biol. Univ.* Note: 1.

### Studium

#### **November 1990 bis November 1994**

Biologiestudium an der Universität Regensburg.

Hauptfach: Biochemie, Wahlfächer: Mikrobiologie, Medizinische Mikrobiologie, Genetik.

### Schulzeit

#### **September 1981 bis Mai 1990**

Ostalb Gymnasium Bopfingen

Abschluß: Abitur, Note: 1,8.

Leistungskurse: Sport, Französisch.

#### **September 1977 bis Juli 1981**

Grundschule Bopfingen.