

EINFLUSS DER GBV-C-INFEKTION AUF DIE HIV-1-REPLIKATION

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinae (Dr. rer. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Dipl.-Biol. Solveig Tenckhoff

geboren am 05.07.1979 in Lutherstadt Wittenberg

angefertigt am:

Department für Innere Medizin, Dermatologie und Neurologie des
Universitätsklinikums Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. med. J. Mössner

Prof. Dr. med. H. L. Tillmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.07.2012

INHALTSVERZEICHNIS

	Bibliographische Zusammenfassung	V
	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das humane Immundefizienzvirus	2
1.1.1	Viruspartikel und Genomorganisation des HIV-1	3
1.1.2	Replikation des HIV-1	6
1.1.3	Epidemiologie, Übertragung und Klinik des HIV-1.....	7
1.2	GB-Virus C	10
1.2.1	Struktur und Genomorganisation	12
1.2.2	Replikation.....	13
1.2.3	Übertragung, Prävalenz und Klinik.....	15
1.2.3.1	GBV-C-Koinfektionen mit anderen Viren.....	16
1.3	Ziel der Arbeit	18
2.	METHODEN	19
2.1	RNA-Techniken	19
2.1.1	Extraktion viraler RNA	19
2.1.2	Quantifizierung von GBV-C-RNA mittels quantitativer RT-PCR	19
2.1.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	20
2.2	DNA-Techniken	20
2.2.1	Modifikation von DNA	20
2.2.1.1	Aufspaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	20
2.2.1.2	Dephosphorylierung.....	21
2.2.1.3	Generieren von 3'-Adenosin-Überhängen.....	21
2.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.2.3.1	Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzelllysaten (Kolonie-PCR).....	21
2.2.3.2	Amplifikation von DNA	22
2.2.3.3	High-Fidelity-PCR.....	23
2.2.4	Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten und 3D-Computermodelle	23
2.2.5	Analyse von DNA.....	24
2.2.5.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	24
2.2.5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	24
2.2.5.3	Aufreinigung von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten.....	25
2.2.5.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	25

2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.3	Klonierung der IRES	25
2.3	Protein-biochemische Methoden.....	27
2.3.1	Analyse der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie	27
2.3.2	Extraktion der löslichen Proteinfraction aus eukaryotischen Zellen	28
2.3.3	Luminometrische Bestimmung der Luziferaseaktivität	28
2.3.4	Nachweis viraler Antigene und virusinduzierter Antikörper mittels ELISA	28
2.3.5	Synthese von überlappenden E2-Peptiden.....	29
2.4	Prokaryotische Zellkultur.....	29
2.4.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	29
2.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	29
2.4.3	Langzeitlagerung und Reaktivierung von <i>E. coli</i>	30
2.5	Eukaryotische Zellkultur.....	30
2.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	30
2.5.1.1	Isolation von PBMC	30
2.5.1.2	Langzeitlagerung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen	31
2.5.1.3	Zellzahlbestimmung.....	31
2.5.2	Infektions- und Inkubationsprotokolle humaner Zellen	31
2.5.2.1	TCID ₅₀	31
2.5.2.2	Infektion mit klinischen GBV-C-Isolaten	32
2.5.2.3	Produktion von HIV-1-Stocks.....	33
2.5.2.4	GBV-C/HIV-1-Koinfektionen	33
2.5.2.5	HIV-1-Infektion GBV-C-E2-stimulierter Zellen.....	34
2.5.2.6	IC ₅₀	36
2.5.2.7	Dokumentation der Synzytienbildung infolge der HIV-1-Infektion.....	37
2.5.3	Transfektion eukaryotischer Zellen	37
2.6	Studienkollektive.....	37
2.6.1	Leipziger Blutspenderkohorte	37
2.6.2	Leipziger/Erlangener-HIV-1-Kohorte	38
2.6.3	Multizentrische, prospektive Kohortenstudie zum natürlichen Verlauf der Hepatitis-C-Virusinfektion Genotyp 1b (Anti-D-Studie).....	38
2.6.4	Hemophilia Growth and Development Study (HGDS)	39
2.7	Statistische Analysen.....	40
3.	MATERIALIEN	41
3.1	Oligonukleotide.....	41
3.2	Plasmide.....	42

3.3	Peptide	42
3.4	Enzyme und Kits.....	44
3.5	Verbrauchsmaterial.....	45
3.6	Chemikalien.....	46
3.7	Puffer und Lösungen	47
3.8	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	49
3.9	Virusstämme.....	49
3.10	Humane Zelllinien.....	50
4.	ERGEBNISSE	51
4.1	Vergleich verschiedener Methoden zur Extraktion viraler RNA	51
4.2	GBV-C im klinischen Kontext.....	52
4.2.1	GBV-C-Prävalenz in Studiengruppen mit unterschiedlichem	
	Transmissionsrisiko zu blutübertragenen Viren.....	53
4.2.2	Einfluss der GBV-C-Infektion auf die Progression von HCV und/oder HIV-1.....	55
4.2.2.1	Einfluss von GBV-C in anti-HCV-positiven hämophilen Kindern mit HIV-1	
	oder ohne HIV-Koinfektion (HGDS-Kohorte).....	55
4.2.2.2	Einfluss von GBV-C auf den natürlichen Verlauf der Hepatitis-C-	
	Virusinfektion (Genotyp 1b) (Anti-D-Studie)	59
4.3	Analyse der viralen Interferenz zwischen GBV-C und HIV-1 in Zellkultur.....	61
4.3.1	Etablierung einer GBV-C-Serumbank	61
4.3.2	Replikation klinischer GBV-C Isolate in Zellkultur.....	61
4.3.3	GBV-C/HIV-1-Koinfektionen in Zellkultur	64
4.3.4	Bedeutung der Sequenzvariationen von GBV-C für die HIV-Replikation.....	68
4.3.5	Einfluss von E2-Peptiden auf die HIV-1-Replikation.....	72
4.3.5.1	Inkubation eukaryotischer Zellen mit HIV-1-Viruspartikeln und	
	E2-abgeleiteten Peptiden.....	73
4.3.5.2	Untersuchung von 124 überlappenden 18mer-Peptiden des E2-Proteins.....	75
4.3.5.3	Charakterisierung HIV-inhibitorischer E2-Peptide	77
4.3.6	Analyse der IRES-Aktivität klinischer GBV-C-Isolate	81
4.3.6.1	Sequenzierreaktion der IRES klinischer GBV-C-Isolate	81
4.3.6.2	Klonierung ausgewählter GBV-C-IRES.....	84
4.3.6.3	Aktivität der GBV-C-IRES in verschiedenen Zelllinien.....	85
4.3.6.4	Einfluss der GBV-C IRES-Aktivität auf die HIV-1-Replikation.....	87
5.	DISKUSSION	90
5.1	Extraktion von GBV-C-RNA	91
5.2	Interferenz von GBV-C mit HCV und/oder HIV-1 im Patienten.....	91

5.2.1	GBV-C-Prävalenz in Studienkollektiven mit erhöhtem Transmissionsrisiko für blutübertragene Viren	91
5.2.1.1	GBV-C-Prävalenz in Blutspendern und Aufbau einer GBV-C-Serumbank	91
5.2.1.2	GBV-C-Prävalenz in der HIV-1- und der HGDS-Kohorte.....	92
5.2.1.3	GBV-C-Prävalenz in HCV-positiven und HCV-negativen Patientinnen der Anti-D-Kohorte	94
5.2.2	GBV-C im klinischen Kontext mit HCV und/oder HIV-1	96
5.3	Einfluss von GBV-C auf die HIV-1-Replikation in Zellkultur.....	98
5.3.1	Charakterisierung klinischer GBV-C Isolate	98
5.3.2	Identifikation und Charakterisierung HIV-neutralisierender GBV-C-E2-Peptide..	101
5.3.3	Analyse der IRES-Aktivität klinischer GBV-C-Isolate	104
6.	ZUSAMMENFASSUNG	109
7.	LITERATURVERZEICHNIS	111
8.	ANLAGEN	123
	Selbstständigkeitserklärung	125
	Lebenslauf	126
	Publikationen	127
	Danksagung	128

BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Tenckhoff, Solveig

Titel: Einfluss der GBV-C-Infektion auf die HIV-1-Replikation

Universität Leipzig, Dissertation

136 Seiten, 284 Literaturverweise, 37 Abbildungen, 17 Tabellen, 2 Anlagen.

Referat:

Das 1995 entdeckte GB-Virus C (GBV-C) gehört als Pegivirus zur Familie der *Flaviviridae* und ist nichtpathogen. In Industrieländern sind 2 bis 12,5 % der gesunden Bevölkerung und bis zu 45 % der Personen aus Risikokollektiven, z.B. Patienten mit Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) oder dem Hepatitis-C-Virus (HCV), virämisch. Die Mehrzahl der klinischen Studien und Metaanalysen zu GBV-C/HIV-1-Koinfektionen zeigten, dass GBV-C mit einem verlangsamten Krankheitsverlauf und einer erhöhten Überlebenschance von GBV-C/HIV-1-koinfizierten Patienten korreliert. In der Hemophilia Growth and Development Study konnte dieser Effekt bei GBV-C/HCV-/HIV-1-infizierten Kindern und Jugendlichen jedoch nur bedingt nachgewiesen werden. Dafür wurde ein Zusammenhang zwischen einer GBV-C/HCV-Koinfektion und dem Ausheilen der HCV-Infektion beobachtet und in einer weiteren Patientenkohorte aus der Anti-D-Studie bestätigt. GBV-C/HCV-koinfizierte Patienten haben schlechtere Chancen, die HCV-Infektion auszuheilen. Der Einfluss von GBV-C auf die HIV-1-Replikation wurde in Zellkulturexperimenten untersucht. Es zeigte sich, dass sich die verschiedenen GBV-C-Isolate hinsichtlich ihrer inhibitorischen Kompetenz unterschieden. Folgende mögliche Ursachen wurden untersucht: 1.) die IRES-Aktivität als Indikator für die Translationseffizienz, 2.) die NS5A-Sequenz des in der Literatur beschriebenen HIV-1-inhibitorisch aktiven 16mer-Peptids sowie 3.) die E2-Sequenz und die HIV-1-inhibitorische Wirkung von 18mer-E2-Peptiden. Es konnten weder Unterschiede in der IRES-Aktivität noch in der NS5A-Sequenz zwischen den unterschiedlich inhibitorisch-kompetenten GBV-C-Isolaten nachgewiesen werden. Im E2-Protein hingegen wurden zwei für alle HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolate einheitliche Mutationen, E143K/H und T204A, identifiziert. Diese könnten eine Ursache für die Varianz in der Fähigkeit, HIV-1 zu inhibieren, darstellen. Die Mutation an Position E143 ist an der Oberfläche des nativen E2-Proteins exponiert und spielt möglicherweise im Hemmmechanismus eine wichtige Rolle. Hinweise darauf gaben die Untersuchungen mit synthetischen 18mer-Peptiden, von denen das Peptid mit dem größten inhibitorischen Potenzial die Aminosäure an Position 143 beinhaltete. Eine mögliche Theorie des Wirkmechanismus des E2-Proteins wäre wie folgt denkbar: Das E2-Protein interagiert über eine Domäne um die Aminosäure E143 mit dem gp41 des HIV-1, verhindert somit die Fusion von Virus- und Zellmembran und in der Folge den Eintritt des HIV-1 in die Zielzelle.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome (erworbenes Immunschwächesyndrom)
Aqua dest.	Aqua destillata
ART	antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BVDV	Bovines Diarrhoevirus
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
CD	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease control and prevention
cDNA	copy-DNA
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxiribonukleinsäure)
dNTP	Desoxiribonukleotid
DV	Denguevirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
eIF3	eukaryotischer Initiationsfaktor 3
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
FLuc	Fireflyluziferase
G	Guanin
GBV-A	GB-Virus A
GBV-B	GB-Virus B
GBV-C	GB-Virus C (auch Hepatitis-G-Virus - HGV)
gp	Glykoprotein
HAART	highly active antiretroviral therapy
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
HGDS	Hemophilia Growth and Development Study
HGV	Hepatitis-G-Virus (auch GBV-C)
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus Typ 1
IC ₅₀	inhibitory concentration 50 (inhibitorische Konzentration 50)
IGF2BP1	Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 1
IL-2	Interleukin 2
IN	Integrase
IRES	internal ribosomal entry site
JEV	Japanisches Enzephalitisvirus

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	long terminal repeat
MA	Matrixprotein
MCS	multiple cloning site
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholino)propanschwefelsäure
MW	Mittelwert
n.a.	nicht analysiert
NC	Nucleocapsidprotein
NP-40	Nonidet P-40, Octylphenolpoly(ethylenglycolether)
NS	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
NTR	nichttranslatierte Region
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p	Protein
P	Peptid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
Pbs	Primerbindungsstelle
PBS	phosphate-buffered solution
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phythämagglutinin
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RLuc	Renillaluziferase
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell park memorial institute
RT	Reverse Transkriptase/Transkription
SA	Standardabweichung
SDF	stromal derived factor
SDS	sodiumdodecyl sulfate
SEM	standard error of mean (Standardfehler)
SV	Simianvirus
T	Thymin
TAR	transactivation response
TBEV	Thick-borne Enzephalitisvirus
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50
Tris	1-[bis(2,3-dibromopropoxy)phosphoryloxy]-2,3-dipromo-propan
U	Einheit (unit)
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
w/v	weight per volume
YEV	Gelbfiebertvirus (Yellow fever virus)

1. EINLEITUNG

Der menschliche Organismus ist permanent Pathogenen ausgesetzt. Im Lauf der Evolution hat der Mensch deshalb ein Immunsystem entwickelt, das auf die unterschiedlichsten Krankheitserreger reagieren kann. Haut und Schleimhäute bilden die erste Barriere gegen Pilze, Viren und Bakterien. Durch mechanische Gegebenheiten, Sekrete der Schleimhäute und die Aufrechterhaltung einer physiologischen Bakterienflora wird die Besiedlung der Körperoberflächen passiv verhindert. Darüber hinaus treten bereits hier die ersten aktiven Schutzmechanismen im Rahmen der angeborenen bzw. adaptiven Immunabwehr in Kraft. Sie basiert auf sezernierten antipathogen wirkenden Substanzen und zellvermittelten Mechanismen. Zelluläre Determinanten agieren unspezifisch im Rahmen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen) oder spezifisch durch Zellen des adaptiven Immunsystems (B- und T-Lymphozyten) und sind über das Komplementsystem miteinander verknüpft. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt durch die Erkennung pathogengebundener Komplementfaktoren, wodurch eine unspezifische Immunreaktion ausgelöst wird. Die spezifische Immunabwehr durch T-Zellen wird durch die Prozession und Präsentation der pathogenen Strukturen auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen über die MHC(major histocompatibility complex)-Klasse-I und -II-Moleküle initiiert. Von B-Zellen sezernierte spezifische Antikörper hingegen können freie antigene Determinanten in ihrer nativen Form binden. Diese komplexen Mechanismen dienen dazu, Pathogene rasch zu erkennen und schnell und effizient zu bekämpfen.

Einige Krankheitserreger jedoch haben sich an diese Gegebenheiten angepasst und Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, diese Schutzmechanismen zu umgehen. Papillomaviren zum Beispiel infizieren Zellen der äußersten Hautschichten, die für bestimmte Zellen des Immunsystems nur begrenzt zugänglich sind und eine vor Reinfektion schützende Immunantwort verhindern. Adenoviren und das Epstein-Barr-Virus reduzieren die Anzahl der MHC-Klasse-I-Proteine auf der Oberfläche der infizierten Zelle und vermindern dadurch die effektive Präsentation der pathogenen Antigene. Aufgrund dessen können zytotoxische T-Zellen diese nicht erkennen, und das Virus entgeht der Eliminierung durch das Immunsystem. Eine andere Strategie, die Immunantwort zu umgehen, ist die latente Infektion. Das Humane Herpesvirus 1 produziert während der Latenzphase in Nervenzellen keine viralen Proteine, und die infizierten Zellen werden so vom Immunsystem nicht erkannt. Das Humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) und die Influenzaviren modifizieren kontinuierlich die Sequenz und Struktur ihrer an der Oberfläche exponierten Proteinregionen und entgehen so den neutralisierenden Antikörpern des Wirts. Darüber hinaus infiziert HIV-1 CD4-Zellen und führt zu einer Hyperaktivierung des Immunsystems, indem es die CD4-T-Zellen aktiviert und für die eigene Replikation nutzt. Dies führt im Verlauf der HIV-1-Infektion zu einer drastischen Abnahme der T-Zellen. In diesem Zusammenhang gewinnen Koinfektionen wie zum Beispiel chronische Hepatitisvirusinfektionen und andere

opportunistische Infektionen an Bedeutung [¹Gougeon et al. 1992]. Das vermehrte Auftreten derartiger Infektionen und der Abfall der CD4-T-Zellzahl auf weniger als 200 Zellen/ μ l sind charakteristisch für die Manifestation des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) [²Mellors et al. 1997]. Somit können bei HIV-1-Infektionen Erkrankungen beobachtet werden, die in anderen Situationen nicht relevant werden. Diese Koinfektionen führen mehrheitlich zu einer signifikanten Reduktion der Überlebensrate.

Im Gegensatz zur negativen Assoziation von Koinfektionen können durch die gleichzeitige Infektion mit einem anderen Pathogen auch positive Effekte auf Erkrankungen erzielt werden. So erhielt Julius Wagner-Jurek 1927 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für seine Entdeckung, die progressive Paralyse, einem Spätstadium der Syphilis, durch die Infektion der Patienten mit einem Malaria-Erreger (*Plasmodium vivax* oder *Plasmodium ovale*) zu therapieren [³Aronoff et al. 2002]. Wahrscheinlich ist das ausgelöste Fieber für die Bekämpfung des Malariaerregers maßgeblich. Auch Studien mit HIV-1 demonstrierten die Reduktion der HIV-1-Replikation infolge der Infektion mit Pathogenen wie dem Humanen Herpesvirus Typ 6, Influenzaviren und dem Masernvirus [⁴Asada et al. 1999, ⁵Pinto et al. 2000, ⁶Moss et al. 2002, ⁷Gracia et al. 2005, ⁸Ruel et al. 2008]. Ihre Wirksamkeit ist jedoch entweder zeitlich begrenzt oder die Untersuchungen beschränken sich derzeit auf Zellkulturexperimente. Darüber hinaus verursachen diese Pathogene ebenfalls Erkrankungen, die sich in erheblichem Umfang negativ auf den Organismus auswirken können.

Vor diesem Hintergrund sind retrospektive/prospektive epidemiologische Arbeiten von Interesse, die zeigen, dass chronische Koinfektionen mit dem GB-Virus-C (GBV-C) bei HIV-1-Patienten mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate, gekennzeichnet durch höhere CD4-T-Zellzahlen und eine langsamere Progression zu AIDS, assoziiert sind [⁹Heringlake et al. 1998, ¹⁰Tillmann et al. 2001, ¹¹Xiang et al. 2001, ¹²Zhang et al. 2006]. Da GBV-C bislang mit keiner Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte, wird es als nichtpathogen eingestuft.

1.1 DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS

Mitarbeiter der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) beschrieben 1981 eine Erkrankung, die durch Störungen des Immunsystems, eine Reduktion der CD4-positiven T-Zellfraktion und opportunistische Infektionen gekennzeichnet war [¹³CDC weekly report 1981, ¹⁴1982]. In den folgenden zwei Jahren charakterisierten mehrere Arbeitsgruppen diese neue Krankheit, die den Namen erworbenes Immunschwächesyndrom (AIDS) erhielt. 1983 gelang es Forschern des Pasteurinstituts um Montagnier, ein Pathogen unbekanntes Ursprungs aus den Lymphknoten eines Patienten mit generalisierter Lymphadenopathie zu isolieren [¹⁵Barré-Sinoussi et al. 1983]. Dieses Virus zeigte in vitro einen starken zytopathischen Effekt in peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), wobei

vornehmlich die CD4-T-Zellen depletiert wurden. Die in hohen Titern freigesetzten Viruspartikel enthielten eine Reverse Transkriptase und wiesen morphologische Charakteristika der Retroviren auf [¹⁵Barré-Sinoussi et al. 1983, ¹⁶Gallo et al. 1983, ¹⁷Levy et al. 1984]. Dieses neue, in den USA, Europa und Afrika entdeckte Retrovirus wurde als Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) bezeichnet [¹⁸Coffin et al. 1986]. HIV-1-Isolate zeigen genetische Unterschiede und werden in die drei Gruppen M (major) mit 9 Subtypen (A-K), O (outlier) und N (non-M/non-O) unterteilt. Dabei unterscheiden sich die Gruppen genetisch um wenigstens 30 %, während die Subtypen zwischen 15 und 20 % differieren [¹⁹Levy et al. 2009].

Im Jahre 1986 wurde ein weiteres HI-Virus aus dem Blut westafrikanischer Patienten isoliert [²⁰Clavel et al. 1986]. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu HIV-1 wurde das neue Virus als Humanes Immundefizienzvirus Typ 2 (HIV-2) klassifiziert. Bei einer HIV-2-Infektion ist im Vergleich zu HIV-1 ein langsamerer Abfall der CD4-T-Zellpopulation und eine deutlich längere asymptomatische Phase sowie eine geringere Mortalitätsrate bei CD4-T-Zellzahlen über 500 Zellen/ μ l zu verzeichnen. Patienten mit HIV-2-induziertem AIDS zeigen zu HIV-1-infizierten Patienten vergleichbare Prognosen [²¹Schirm van der Loeff et al. 2002].

1.1.1 Viruspartikel und Genomorganisation des HIV-1

Infektiöse HIV-1-Viruspartikel haben eine Größe von 100 nm und sind von einer lipoproteinhaltenen Hüllmembran umgeben, die während des Replikationszyklus von der Zellmembran der Wirtszelle abgeleitet wird. In dieser Lipidmembran sind die viralen Glykoproteine (gp) gp41 und gp120 eingebettet. Das Hüllprotein gp41 hat eine Molekülmasse von 41 kDa und ist als Trimer in der Membran verankert. An den außerhalb der Membran gelegenen Bereich des gp41 sind ebenfalls trimere Komplexe des Glykoproteins gp120 (120 kDa) nichtkovalent gebunden. Über Myristinsäurereste am aminoterminalen Bereich sind die Matrixproteine (MA, p17) mit der Hüllmembran assoziiert. Sie liegen als Trimere vor und bilden eine netzwerkartige Proteinschicht aus. Das Viruscapsid (Core), das sich im Inneren des Viruspartikels befindet, weist eine konische Form auf und wird aus den Capsidproteinen (CA, p24) gebildet. Das Capsid umschließt zwei identische 9,7 kb-lange RNA-Stränge, die mit dem Nucleocapsidprotein (NC, p7) komplexiert sind. Über komplementäre Basenpaarung dimerisieren die beiden RNA-Genome. Zusätzlich enthält das Capsid die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT, mit der RNase H-Domäne), Integrase (IN) und Protease (PR) (Abbildung 1.1).

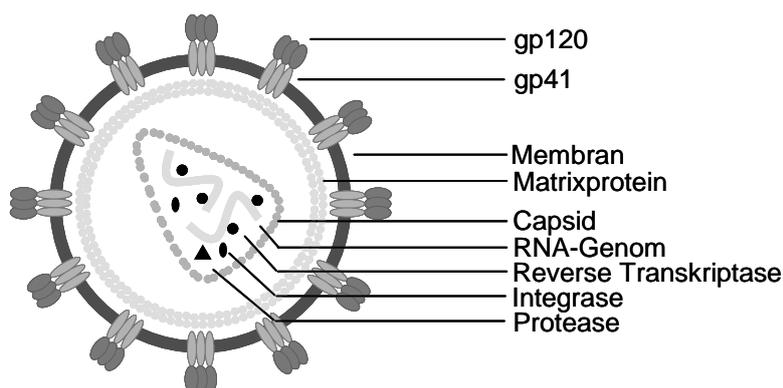


Abbildung 1.1: Aufbau eines HIV-1-Viruspartikels (modifiziert nach Lou Henderson) [²²Retroviruses, Kapitel 3].
gp: Glykoprotein.

Das Protein p6 ist an der Freisetzung des Viruspartikels beteiligt [²³Garrus et al. 2001]. Neben diesen strukturellen Proteinen enthält das Viruspartikel weitere virale Proteine (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev, Nef), die die Virusreplikation beeinflussen [²⁴Gonda et al. 1985, ²⁵Gelderblom et al. 1987, ²⁶McCune et al. 1988, ²⁷Earl et al. 1990, ²⁸Weiss et al. 1990, ²⁹Kuznetsov et al. 2003, ³⁰Zhu et al. 2006, ³¹Knipe et al. 2006]. Die RNA-bindenden Proteine Tat und Rev sind essentiell für die virale Replikation. Während Tat die Expression der HIV-1-Gene um ein Vielfaches verstärkt, ermöglicht Rev den Export der nichtprozessierten oder noch nicht vollständig prozessierten viralen mRNA sowie der nichtprozessierten genomischen viralen RNA aus dem Kern ins Zytoplasma und umgeht so einen zellulären Kontrollmechanismus [³²Felber et al. 1989]. Nef ist unter anderem für die Aktivierung der Zelle durch zelluläre Signaltransduktion und die Verminderung der Expression des CD4-Rezeptors auf der Zelloberfläche verantwortlich [³³Sawai et al. 1994]. Vif inhibiert die Translation der gegen HIV-1 wirkenden zellulären Zytosindeaminasen der APOBEC-Familie [³⁴Sheehy et al. 2002, ³⁵Mercenne et al. 2010]. Vpu unterstützt Zusammenbau und Freisetzung neuer Viren. Der Arrest des Zellzyklus und die Möglichkeit der Integration transkribierter cDNA in den Zellkern teilungsinaktiver Zellen wird durch das Protein Vpr gewährleistet [³⁶Greene et al. 2002, ³⁷Sakai et al. 2006, ³⁸Belzile et al. 2010].

Weitere regulatorische Aufgaben übernehmen die den kodierenden Bereich flankierenden 5'- und 3'-Sequenzen des HIV-1-Genoms. Die essentiellen Kontrollsequenzen für die reverse Transkription und die Integration in die zelluläre DNA sind die R-Regionen. Daran schließt sich die eine R-Region unmittelbar an die Cap-Struktur an und eine zweite ist vor der Poly-A-Sequenz lokalisiert. Der R-Region im 5'-Bereich folgt die U5-Region mit Sequenzen für die Integration ins zelluläre Genom. Die nachfolgende Primerbindungsstelle (Pbs) ist mit dem 3'-Ende einer tRNA komplexiert und geht in eine Spleißdonorstelle über, der die sogenannte Ψ -Domäne folgt, die das Verpackungssignal beinhaltet. An die 5'-nichttranslatierte Region (NTR) schließen sich die kodierenden Genbereiche von HIV-1 an. Die darauf folgende Sequenz der 3'-NTR beinhaltet unter anderem einen Polypurintrakt (PPT) und ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstrangs im Zuge der reversen Transkription

verantwortlich. Wie die U5-Region dient die dem PPT folgende U3-Region der Integration ins Wirtszellgenom und ist zudem für die Genexpression des integrierten Provirus verantwortlich. Sie enthält den HIV-1-Promotor und cis-aktive Elemente, an die transaktive zelluläre Proteine binden. Das HIV-1-Genom schließt C-terminal mit einer Polyadenylierungssequenz ab (Abbildung 1.2).

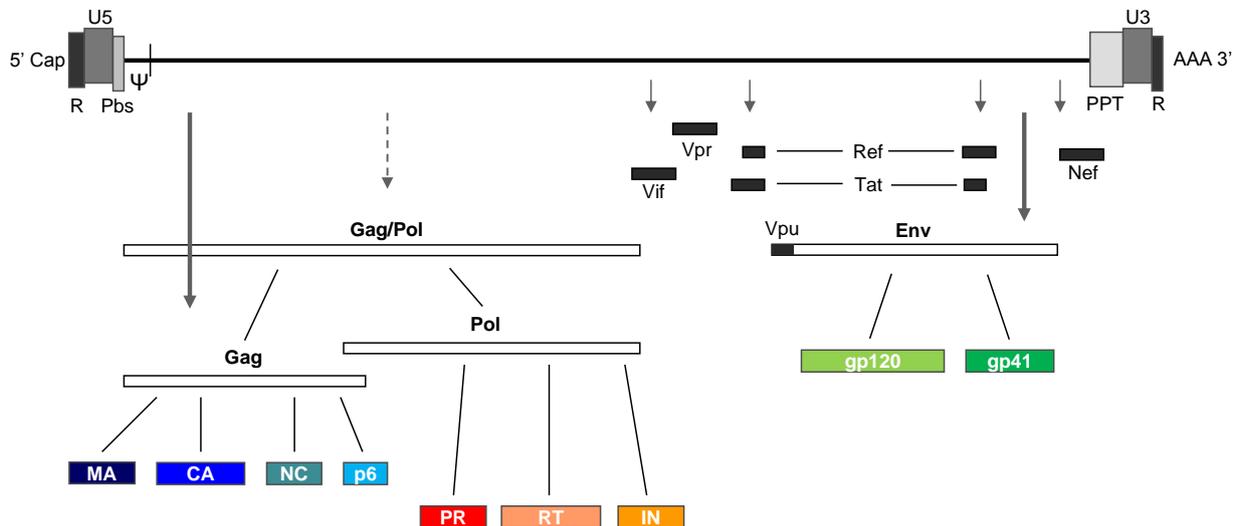


Abbildung 1.2: Genomorganisation und Prozessierung der viralen Proteine des HIV-1.

Die Pfeile symbolisieren die Stärke der Expression der einzelnen Genprodukte [modifiziert nach ³⁹Freed 2004].
 CA: Capsid; gp: Glykoprotein; IN: Integrase; MA: Matrix; NC: Nucleocapsid; p6: Protein 6; Pbs: Primerbindungsstelle; PPT: Polypurintrakt; PR: virale Protease; R: R-Region; RT: Reverse Transkriptase; U3/5: U3/5-Region; Ψ: Verpackungssignal.

Das einzelsträngige HIV-1-RNA-Molekül in Sense-Orientierung weist mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierungssequenz Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Die RNA kodiert für die sich teilweise überlappenden Leserahmen *gag*, *pol* und *env*. Die viralen Proteine werden aus den Vorläuferproteinen Gag (55 kDa), Gag/Pol (160 kDa) und Env (gp160, 160 kDa) synthetisiert und durch virale oder zelluläre Proteasen in die einzelnen Proteine gespalten. Aus dem Gag-Vorläuferprotein gehen das Matrix-, Capsid-, Nucleocapsid- und p6-Protein hervor, während das Gag/Pol-Polyprotein mittels Autokatalyse in die für die virale Replikation erforderlichen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease sowie in die viralen Strukturproteine prozessiert wird. Die beiden Hüllproteine gp41 und gp120 werden durch die zelluläre Protease Furin aus dem Env-Vorläuferprotein prozessiert. Darüber hinaus kodiert die RNA für die sechs regulatorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev und Nef, die als mehrfach gespleißte primäre Transkripte freigesetzt werden [⁴⁰Cullen et al. 1990, ⁴¹Hallenberger et al. 1992, ⁴²Subbramanian et al. 1994, ⁴³Cohen et al. 1996].

1.1.2 Replikation des HIV-1

Initial für die HIV-1-Replikation ist die Bindung des Viruspartikels über das Glykoprotein gp120 an den CD4-Rezeptor. Diese CD4-positiven Zellen sind Bestandteil des Immunsystems. Zu ihnen gehören T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten sowie dendritische Zellen. Neben CD4 spielen Chemokinrezeptoren, wie der CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und der CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5), eine wichtige Rolle als Korezeptoren für Adsorption und Fusion [44Deng et al. 1996, 45Doranz et al. 1996, 46Feng et al. 1996]. Infolge der Bindung des viralen Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor wird eine Konformationsänderung des Glykoproteins induziert, die die Membranfusionsaktivität des aminoterminalen Bereichs des gp41 aktiviert. Nach Fusion von Virus- und Zellmembran wird das das RNA-Genom enthaltende Capsid ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Dabei wird es strukturell derart verändert, dass die Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA (reverse Transkription) durch die mit dem RNA-Genom assoziierte Reverse Transkriptase erfolgen kann. Die DNA-Synthese beginnt mit der Bindung des 3'-OH der tRNA an die Primerbindungsstelle in der 5'-NTR, wodurch die Synthese des Minusstrangs in 5'-3'-Richtung mit der Bildung eines kurzen DNA-Strangs bis zum 5'-Ende der RNA initiiert wird. Die RNase-H-Domäne des Reverse Transkriptase/RNase H-Komplexes baut in der Folge den RNA-Strang des RNA-DNA-Hybrids ab, sodass das kurze einzelsträngige DNA-Molekül übrig bleibt. Es wird an das 3'-Ende des RNA-Genoms transferiert (1. Strangtransfer) und dient als Primer für die Elongation des ersten kompletten DNA-Strangs. Das daraus resultierende RNA-DNA-Molekül wird wiederum durch die RNase H zu einem DNA-Einzelstrang prozessiert. Lediglich die RNA im Bereich des Polypurintraktes bleibt erhalten und dient als Primer für die Synthese des ersten doppelsträngigen DNA-Abschnitts. Dieser beinhaltet noch die tRNA, die in der Folge ebenfalls abgebaut wird. Der so entstehende 3'-Überhang hybridisiert über komplementäre Basenpaarung mit dem 3'-Ende des durchgehenden DNA-Strangs und stellt die Primerstruktur für die nachfolgende Synthese des DNA-Doppelstrangs zur Verfügung (2. Strangtransfer). Die Vervollständigung des DNA-Doppelstrangs erfolgt durch die Polymerase-Aktivität der Reversen Transkriptase. Die provirale DNA, assoziiert mit Matrixproteinen, der Integrase sowie dem Vpr-Protein, bildet den Präintegrationskomplex. Dieser wird in den Zellkern transportiert, wo die Integrase den Einbau linearer doppelsträngiger viraler DNA in das Wirtszellgenom katalysiert. Dabei werden am 3'-Terminus zwei bis drei Nukleotide abgespalten, sodass 5'-Überhänge entstehen. In der zellulären DNA erzeugt die Integrase an nicht spezifischen Stellen des Genoms ebenfalls 5'-Überhänge. Danach werden die 3'-Enden der viralen und die 5'-Enden der zellulären DNA ligiert und die Einzelstrangbrüche durch die zelluläre Reparaturmaschinerie aufgefüllt. Im Zuge des Integrationsprozesses verliert die virale DNA die 5'-überhängenden Nukleotide, wogegen 4 bis 6 Basen des zellulären Genoms dupliziert werden. Die Integrase katalysiert ausschließlich die Integration linearer viraler DNA. Ausgehend von der integrierten Provirus-

DNA werden von der zellulären RNA-Polymerase II zu Beginn mehrfach gespleißte mRNA generiert, welche die Proteine Tat, Rev und Nef codieren. Das Tat-Protein bindet an das TAR-Element (transactivation response) im LTR(long terminal repeat)-Promotor, stabilisiert den Transkriptionsinitiationskomplex und fördert die Synthese längerer RNA-Transkripte. Rev bindet die RNA-Transkripte und induziert deren Transport aus dem Nukleus ins Zytoplasma, wo die Synthese der Vorläuferproteine stattfindet. Durch den Rev-vermittelten Transport erfolgt auch der Transfer viraler Vollängengenome aus dem Nukleus. Die Prozessierung der viralen Proteine erfolgt mittels zellulärer bzw. viraler Proteasen. Das Env-Vorläuferprotein wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und im Lumen des ER glykosyliert. Die Furinprotease spaltet dann während des Transports des Proteins zur Zellmembran die beiden Proteine der Hüllmembran (gp41, gp120) aus dem Env-Vorläuferprotein. Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und zur Innenseite der Plasmamembran transportiert, wo sie über myristylierte Aminotermini der Matrixproteine binden. Dort findet die Morphogenese statt. Dabei lagern sich zwei RNA-Moleküle mit den jeweiligen Ψ -Domänen in die Nucleocapsidproteinabschnitte ein, und die Vorläuferproteine viraler Enzyme assoziieren. Daraufhin stülpt sich der mit den anderen viralen Proteinen angereicherte Bereich der Zellmembran um und schnürt sich als Vesikel ab. In diesem unreifen Viruspartikel prozessiert die autokatalytische virale Protease die viralen Proteine MA, CA, NC, p6, IN, RT und PR aus dem Gag/Pol-Vorläuferprotein. Gleichzeitig kommt es zu strukturellen Veränderungen, wodurch infektiöse Viruspartikel entstehen [⁴⁷Miller et al. 1997, ⁴⁸Freed et al. 2001, ⁴⁹Gomez et al. 2005].

1.1.3 Epidemiologie, Übertragung und Klinik des HIV-1

Die Infektionsraten für HIV sind im weltweiten Durchschnitt in den letzten Jahren gesunken. Dennoch lebten im Jahr 2009 33,3 Millionen Menschen mit HIV, wobei sich 2,6 Millionen Menschen neu infizierten. 1,8 Millionen starben durch AIDS-assoziierte Erkrankungen sowie 2 Millionen durch opportunistische Infektionen. Die größte HIV-Prävalenz findet sich in den afrikanischen Staaten südlich der Sahara, wo 2009 22,5 Millionen Menschen (68 % der weltweit HIV-Infizierten) mit dem Erreger infiziert waren. Die Zahl der Neuinfektionen ist zwar im Vergleich zu den Jahren 1990 bis 1995 rückläufig, jedoch steigt die Rate der Menschen, die mit HIV leben, aufgrund einer effizienteren antiviralen Therapien (ART) weiter an [⁵⁰UNAIDS report 2010].

HIV-1 wird vor allem durch kontaminiertes Blut, Sexualkontakt und von Mutter zu Kind übertragen. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion abhängig von der HIV-1-Viruslast der übertragenen Körperflüssigkeit, den genetischen Eigenschaften des Virus und den zellulären sowie immunologischen Gegebenheiten des menschlichen Organismus. Studien zeigen, dass bei einer Viruslast von weniger als 1500 RNA-Kopien/ml Plasma die Infektionsrate stark reduziert ist [⁵¹Quinn et al. 2000, ⁵²Gray et al. 2001]. Die höchsten

Viruskonzentrationen finden sich in PBMC, im Blutplasma, in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Ejakulat sowie in weiblichen Genitalsekreten [⁵³Busch et al. 1996, ⁵⁴Quinn et al. 1996, ⁵⁵Kashuba et al. 1999, ⁵⁶Shepard et al. 2000].

Der Verlauf der HIV-1-Infektion wird in drei Phasen unterteilt, die durch ihre jeweilige Klinik und die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen im Blut charakterisiert sind. Infolge der Primärinfektion können bei bis zu 70 % der Patienten relativ unspezifische, grippeähnliche Symptome beobachtet werden (Fieber, Lymphknotenschwellung). Sie treten ca. 2 Wochen nach der Infektion auf. Gleichzeitig mit den Symptomen sind hohe Titer viraler RNA im Plasma nachweisbar (10^6 - 10^7 Kopien/ml) [⁵⁷Piatak et al. 1993]. Die Anzahl der CD4-T-Zellen nimmt signifikant ab. Vor allem im Gastrointestinaltrakt sterben ein Großteil der CD4-T-Zellfraktion sowie über 50 % der CD4-T-Gedächtniszellen des peripheren Blutes. Im Rahmen der Primärinfektion integriert HIV-1 als Provirus in einen Teil der verbleibenden T-Zellen und hat so über Jahrzehnte ein Reservoir zur Verfügung. Im Verlauf der akuten HIV-1-Infektion werden Antikörper gegen virale Proteine (p24, p17, p6, gp41, gp120) gebildet, die zum Teil in der Lage sind, HIV-1 zu neutralisieren. Hierfür binden sie z. B. an das gp41/gp120 freier Viren bzw. an den CD4/gp120-Komplex und verhindern damit die Fusion von Zell- und Virusmembran [⁵⁸Burton et al. 2004]. Im weiteren Krankheitsgeschehen nimmt die Anzahl der CD8-T-Zellen zu. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis CD4- zu CD8-positiven T-Zellen zugunsten der CD8-T-Zellen. Durch den antiviralen Effekt dieser zytotoxischen T-Zellen kommt es zu einem Absinken des HIV-1-RNA-Titers auf 10^3 bis 10^5 Kopien/ml [⁵⁹Borrow et al. 1994, ⁶⁰Kuop et al. 1994]. Der Abfall der HIV-1-Viruslast und das Abklingen der initialen Symptome kennzeichnen den Beginn der zweiten Phase der HIV-1-Infektion (ca. 6 Wochen nach Infektion). Diese Phase ist durch die Abwesenheit von HIV-1-assoziierten Erkrankungen sowie durch eine geringe, aber permanente Virusreplikation und stabile CD4-T-Zellzahlen (> 500 Zellen/ μ l) charakterisiert. Aufgrund der spezifischen Immunabwehr entstehen, bedingt durch den Selektionsdruck, Virusmutanten mit der Fähigkeit, die Abwehrmechanismen des humanen Organismus zu umgehen [⁶¹Price et al. 1997]. In Abhängigkeit vom immunologischen Status sowie von genetischen Voraussetzungen des Patienten und des Virus schließt sich im Zeitraum zwischen 6 Monaten und mehreren Jahren die dritte Phase der HIV-1-Infektion an. Die Patienten entwickeln AIDS, indem sich bei den Betroffenen für die HIV-1-Infektion typische opportunistische Infektionen und schwer behandelbare Tumorerkrankungen ausbilden wie zum Beispiel *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie [⁶²Huang et al. 2009], verschiedene Lymphome [⁶³Beral et al. 1991], Kaposi-Sarkom [⁶⁴Weiss 1987], Tuberkulose [⁶⁵Rastogi et al. 1992] und Toxoplasma-Enzephalitis [⁶⁶Luft et al. 1988]. Charakterisiert ist der Eintritt in die dritte Phase der HIV-1-Erkrankung durch das Absinken der CD4-T-Zellen unter 200 Zellen/ μ l [⁶⁷Crowe et al. 1991, ⁶⁸Miller et al. 1999].

Trotz aller Fortschritte ist eine Eradikation von HIV-1 durch die Behandlung mit antiviralen Substanzen bislang nicht möglich. Ebenso bleibt die Entwicklung eines protektiven Impfstoffes ein schwer realisierbares Ziel. HIV-1 integriert in der Primärphase in das humane

Genom. In diesem Latenzstadium kann es in den ruhenden Zellen selbst unter antiviraler Therapie jahrelang persistieren [⁶⁹Chun et al. 2005]. Das Immunsystem ist nicht in der Lage, diese latent infizierten Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Durch externe Einflüsse können diese Zellen stimuliert und zur Produktion neuer infektiöser Viren aktiviert werden. Angriffsziele der antiviralen Therapie sind die verschiedenen Phasen der HIV-Replikation (Fusion, Viruseintritt, reverse Transkription, Integration) und die dafür essentiellen viralen Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease) [⁷⁰Dau et al. 2009]. Unabhängig von der Therapiestrategie kommt es aufgrund der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase (Mutationsrate $3,4 \times 10^{-5}$ /bp/Replikationszyklus) [⁷¹Mansky et al. 1995] und der Rekombinationsmöglichkeiten des Virus im Verlauf der Replikation zur Entstehung viraler Resistenzen [⁷²Chen et al. 2004, ⁷³Kiertiburanakul et al. 2009]. Insbesondere Monotherapien sind durch die schnelle Ausbildung von Mutanten wenig effizient [⁷⁴Wei et al. 2002, ⁷⁵Delaugerre et al. 2009]. Durch die Kombination mehrerer Therapeutika können die HIV-RNA-Titer im Plasma langfristig gesenkt werden. Diese Medikation wird als highly active antiretroviral therapy (HAART) bezeichnet. Trotz der zahlreichen Nebenwirkungen wie zum Beispiel Durchfall, Übelkeit, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Neuropathien sowie Lipodystrophie [⁷⁶Herold 2005] ist diese seit 1996 verfügbare Kombinationstherapie derzeit die einzige Option gegen das Virus, da sie in der Lage ist, die AIDS-assoziierte Morbidität und Mortalität signifikant zu senken [⁷⁷Carr et al. 1998, ⁷⁸Paella et al. 1998, ⁷⁹Race et al. 1998, ⁸⁰Chen et al. 2007, ⁸¹Boyd et al. 2009, ⁸²Randell et al. 2009]. Andererseits steigt die Anzahl der Lebererkrankungen bzw. die Mortalitätsrate der Patienten durch die Koinfektion mit Hepatitisviren jedoch an [⁸³Ockenga et al. 1997, ⁸⁴Borgia et al. 2003, ⁸⁵Kopnacknicki et al. 2005, ⁸⁶Rockstroh et al. 2005, ⁸⁷Thomas et al. 2008]. Mittlerweile stellen Hepatitis-C-Virus(HCV)-induzierte Lebererkrankungen einen der Hauptgründe für die Sterblichkeit bei HIV-1-infizierten Patienten aus Industrienationen dar [⁸⁸Blackard et al. 2008].

1.2 GB-VIRUS C

Bereits vor 4000 Jahren gab es Hinweise auf Hepatitisepidemien. In den 1960er Jahren waren Pathogene, die diese Lebererkrankungen auslösen, Gegenstand zahlreicher Forschungen. Zum heutigen Zeitpunkt sind die Hepatitisviren A bis E bekannt. 1947 charakterisierte MacCallum zwei verschiedene Formen infektiöser Hepatitiden: eine Typ-A-Hepatitis, übertragen durch kontaminierte Nahrungsmittel und Wasser, und eine Typ-B-Hepatitis, übertragen durch Blut. In den Jahren 1963 bis 1967 isolierten die Arbeitsgruppen um Blumberg und Alter ein Antigen, das später als HBsAg bezeichnet wurde und das sie mit einer Hepatitis B in Verbindung brachten [⁸⁹Blumberg et al. 1965, ⁹⁰Alter et al. 1966]. 1970 gelang es Dane [⁹¹et al. 1970], intakte Hepatitis-B-Virus(HBV)partikel aus Blutproben zu isolieren und mit dem Elektronenmikroskop zu untersuchen. 1973/1974 war es Feinstone et al. [⁹²1973, ⁹³1974] möglich, das Hepatitis-A-Virus (HAV) näher zu charakterisieren. Damit konnte jetzt zwar ein Teil der Hepatitiden auf die Infektion mit HAV oder HBV zurückgeführt werden, die Ursache für die sogenannten NonA-nonB-Hepatitiden war jedoch weiterhin unbekannt. Auch Deinhardt et al. gelang es bereits 1967 [⁹⁴], mit dem Serum eines Patienten (Initialen G.B.) in Tamarinen (*Saguinus* – aus der Gattung der Krallenaffen) eine Hepatitis zu induzieren. Bei diesem Patienten konnte zu diesem Zeitpunkt eine fulminante NonA-nonB-Hepatitis diagnostiziert werden. Ausgehend davon, dass es sich um ein Isolat eines der humanen Hepatitisviren handelte, wurde in weiteren Experimenten auch mit Seren anderen Ursprungs jedoch deutlich, dass ein von den bekannten Hepatitisviren verschiedenes Agens vorlag. Eine Identifikation gelang zu diesem Zeitpunkt nicht [⁹⁵Deinhardt et al. 1975, ⁹⁶Tabor et al. 1979, ⁹⁷Purcell et al. 1993]. Im Jahr 1979 entdeckten Rizzetto und Gerin das allein replikationsinkompetente Hepatitis-D-Virus (HDV) in HBV-infizierten Patienten [⁹⁸Rizzetto et al. 1979] und in den 80er Jahren folgte die Beschreibungen des Hepatitis-E-Virus (HEV) [⁹⁹Balayan et al. 1983]. Doch erst mit der Entdeckung des HCV 1989 konnte einem Großteil der NonA-nonB-Hepatitiden eine Ursache zugeordnet werden [¹⁰⁰Choo et al. 1989].

Die Entdeckung der Viren und deren Übertragungswege ermöglichte die Entwicklung effektiver Nachweismöglichkeiten in Blutproben, um eine Ansteckung der Empfänger zu verhindern. Zeitgleich stand die Entwicklung von Impfstoffen im Mittelpunkt. So wurden 1996 und 1980 Impfungen gegen HAV und HBV etabliert. Die Entwicklung eines potenten Impfstoffs für HCV gelang bislang nicht. Trotz aller Bemühungen, die zur Identifizierung der drei hauptsächlich hepatitisinduzierenden Viren führten, konnten immer noch nicht alle akuten oder chronischen Hepatitiden auf eine Ursache zurückgeführt werden. Daher beschäftigte sich die Forschung weiterhin mit der Suche nach neuen Hepatitisviren. Im Rahmen dessen wurde auch auf Proben von Deinhardt et al. zurückgegriffen, um das dort enthaltene infektiöse Agens zu identifizieren. Auf dieser Basis und anhand der Experimente, die bereits in den 1970er Jahren durchgeführt wurden, gelang in den 1990er Jahren die Isolation des damals erfolgreich für Tamarinenexperimente genutzten Hepatitisserregers zeitgleich durch zwei Forschergruppen. 1995 isolierte die Arbeitsgruppe um Simons aus Tamarinen nach der Infektion mit dem GB-Agens (benannt mit den Initialen des Spenders

aus den 70er Jahren) die Genome zweier unbekannter Viren (GB-Virus A: GBV-A, GB Virus B: GBV-B) [101 Simons et al. 1995]. Aufgrund von Sequenzanalysen konnte eine Homologie zum HCV-Genom nachgewiesen werden, weshalb sie der Familie der *Flaviviridae* zugeordnet wurden. Allerdings war in Menschen weder GBV-A noch GBV-B nachweisbar. Basierend auf der Helikaseregion der Flaviviren wurden degenerierte Primer entwickelt, mit deren Hilfe es gelang, in HBV-/HCV-negativen humanen Blutspendern virusähnliche Nukleotidsequenzen zu identifizieren. Diese wiesen auf Nukleotidebene eine Identität von 59 % und auf Aminosäureebene von bis zu 73 % auf [101 Simons et al. 1995]. Sequenzanalysen ergaben, dass das neu isolierte Agens kein Subtyp des HCV darstellte, aber eng mit den beiden Viren GBV-A und GBV-B verwandt war. Es wies jedoch ausreichende Unterschiede aus, um es als neues Virus mit dem Namen GB-Virus C (GBV-C) zu klassifizieren. Die Viren GBV-A und GBV-C sind enger miteinander verwandt als mit GBV-B, das wie das HCV ein Core aufweist. Aufgrund der Gemeinsamkeiten jedoch werden die GB-Viren einer eigenen phylogenetischen Gruppe zugeordnet (Abbildung 1.3).

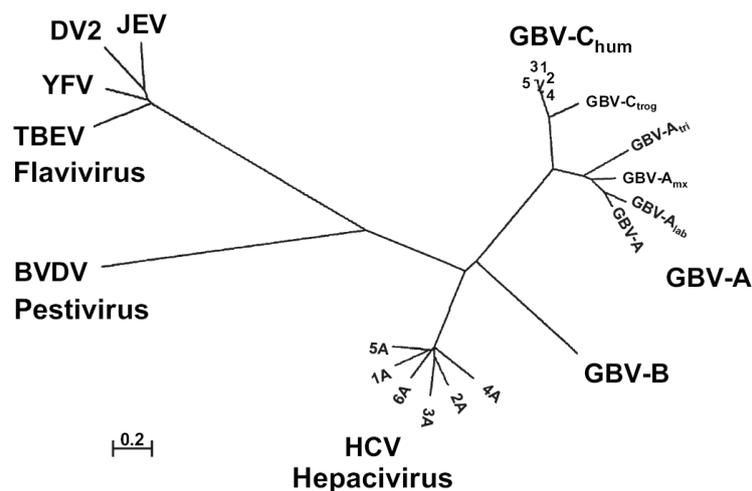


Abbildung 1.3: Phylogenetische Beziehungen verschiedener Mitglieder der *Flaviviridae*.

Die Basis bildeten Vergleiche der RNA-abhängigen RNA-Polymerasesequenz. Abgebildet sind die Genera Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus sowie die GB-Viren mit repräsentativen Isolatoren der jeweiligen Genotypen. Humanes GBV-C mit 5 Genotypen und GBV-C aus Schimpansen. Die vier GBV-A-Genotypen wurden in *Sanguinus nigrocallis* (GBV-A), *Sanguinus labiatus* (GBV-A_{lab}), *Aotus Trivirgatus* (GBV-A_{tri}), ein *callithrix hybrid* (*jacchus-penicillata* cross) (GBV-A_{mx}) identifiziert. 0,2 Distanz repräsentiert 0,2 Aminosäuresubstitutionen pro Position.

BVDV: Bovines Diarrhoevirus; DV2: Denguevirus Serotyp 2; GBV: GB-Virus; HCV: Hepatitis C Virus; JEV: Japanisches Enzephalitisvirus; TBEV: Thick-borne Enzephalitisvirus; YFV: Gelbfiebervirus [107 Mohr et al. 2009].

Zeitgleich wurde durch Linnen et al. [102 1996] ein cDNA-Klon aus einem HCV-infizierten Patienten isoliert, charakterisiert und als Hepatitis-G-Virus (HGV) bezeichnet. Sequenzvergleiche zwischen GBV-C und HGV ergaben eine Identität von 85,5 % in der Nukleotid- und 100 % in der Aminosäuresequenz, sodass beide Viren als verschiedene Isolate des gleichen Virus angesehen werden [103 Zuckermann et al. 1997]. Laut einer aktuellen Studie wird die Reklassifizierung der GB-Viren als eine eigene Untergruppe der

Flaviviren, als Pegiviren, vorgeschlagen [¹⁰⁴Stapleton et al. 2011]. Mit seiner geringen Mutationsrate [¹⁰⁵Smith et al. 2000] unterscheiden sich die bislang identifizierten sechs Genotypen lediglich in 11 % ihrer Sequenz. Im Vergleich dazu weist HCV zwischen seinen Genotypen eine Diversität von bis zu 30 % auf [¹⁰⁶Muerhoff et al. 2006, ¹⁰⁷Mohr et al. 2009]. Analog zu HCV und anderen Viren treten die GBV-C-Genotypen in geographisch unterschiedlichen Gebieten auf: Genotyp 1 dominiert in Westafrika, Genotyp 2 in Nord- und Südamerika ebenso wie in Europa, Genotyp 3 in Südostasien, Genotyp 4 in Südostasien und Japan, Genotyp 5 in Südafrika und Genotyp 6 in Indonesien [¹⁰⁸Tucker et al. 2000, ¹⁰⁹Nishiya et al. 2003, ¹⁰⁶Muerhoff et al. 2006].

1.2.1 Struktur und Genomorganisation

GBV-C weist einen sphärischen Partikelbau mit einem Durchmesser von 40 bis 60 nm auf. Eine Lipidhüllmembran, in die die Glykoproteine E1 und E2 integriert sind, umgibt die einzelsträngige positiv orientierte RNA. Das 8,9 bis 9,4 kb-lange Genom enthält einen einzelnen offenen Leserahmen und zeigt Homologien zu HCV. Die Gensequenzen werden von nichttranslatierten Regionen flankiert, wobei die 5'-NTR eine interne ribosomale Bindungsstelle (internal ribosomal entry site – IRES) enthält. Eine Cap-Struktur sowie eine Polyadenylierungssignal fehlen. Ausgehend vom Genom wird im Zuge der Replikation ein Polyprotein synthetisiert, das im weiteren Verlauf zu Einzelproteinen prozessiert wird. N-terminal finden sich die Strukturproteine E1, E2 und das Protein p5.6, an die sich die Sequenzen für die Nichtstrukturproteine (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B anschließen [¹¹⁰Leary et al. 1996, ¹⁰²Linnen et al. 1996]. In Homologie zu HCV kodieren die Proteine E1 und E2 zwei virale Proteine der Virushülle. Das Protein p5.6 bildet einen Ionenkanal. Das NS2-Protein agiert als Autoprotease und für das NS3-Protein wurden Funktionen einer Helikase mit RNA-Entwindungsaktivität sowie einer Serinprotease nachgewiesen. Für die Funktionalität der NS3-Protease ist NS4A als Kofaktor erforderlich [¹¹¹Belyaev et al. 1998]. Die Aufgabe des NS4B-Proteins im Replikationszyklus von GBV-C ist im Detail noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass es als Bestandteil der Replikase zur Ausbildung von Membranstrukturen (assoziiert mit dem ER) beiträgt. Das NS5A-Protein stellt eine interferonsensitive Komponente dar. Die für die Replikation essentielle RNA-abhängige RNA-Polymerase wird durch das NS5B-Protein repräsentiert (Abbildung 1.4) [¹¹²Simmonds et al. 2001, ¹¹³Berzsenyi et al. 2005].

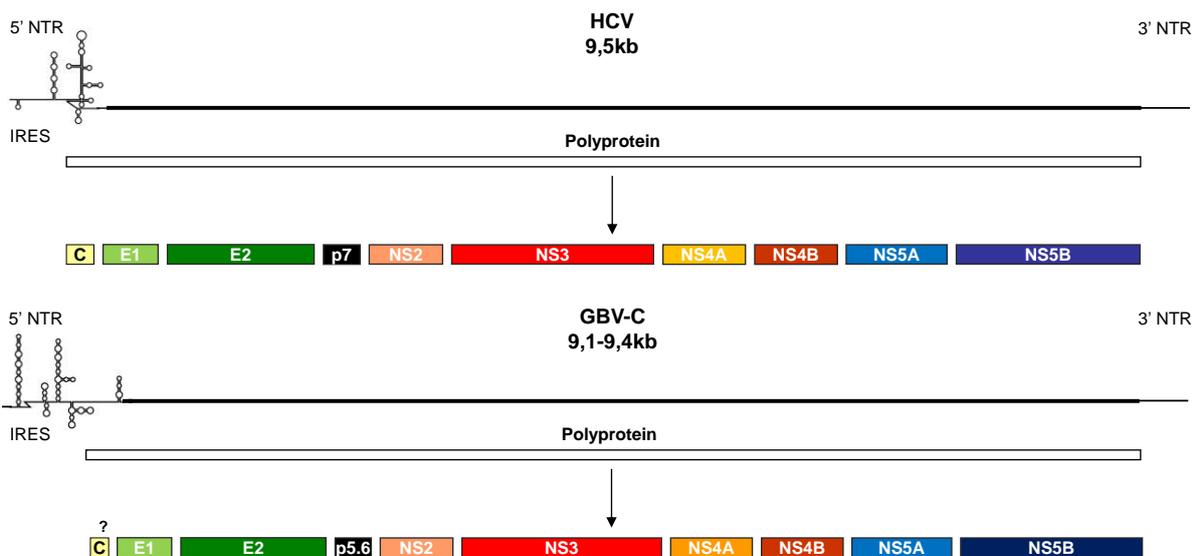


Abbildung 1.4: Genomorganisation von HCV und GBV-C im Vergleich.

[modifiziert nach ¹¹⁰Leary et al. 1996, ¹¹⁴Grassmann et al. 2005].

C: Capsid/Core-Protein; E: Membranprotein; IRES: internal ribosomal entry site; NS: Nichtstrukturprotein; NTR: nichttranslatierte Region; p: Protein.

Trotz der strukturellen und funktionellen Homologien zu HCV konnte für GBV-C bislang kein Capsid nachgewiesen werden [¹⁰²Linnen et al. 1996, ¹¹⁵Erker et al. 1996, ¹¹⁶Simons et al. 1996, ¹⁰⁷Mohr et al. 2009]. Einige Forschergruppen haben jedoch Antikörper aus GBV-C-Infizierten identifiziert, die gegen ein Protein wirken, das von einem dem Startcodon verschiedenen AUG in 5'-3'-Orientierung translatiert werden kann. Sie postulieren, dass dieses Protein in vivo exprimiert wird [¹¹⁷Xiang et al. 1998, ¹¹⁸Xiang et al. 1999, ¹¹⁹Richter 2009]. Kondo et al. [¹²⁰1998] konnten zeigen, dass ein Protein in der minussträngigen RNA, die während der Replikation als Intermediat gebildet wird, im Leserahmen des E2-Proteins kodiert sein könnte, während Pavesi et al. [¹²¹2000] einen alternativen Leserahmen in der NS5A-Region vermuten. Diese Daten weisen darauf hin, dass möglicherweise auch für GBV-C ein Capsidprotein existiert. Alternativ könnte GBV-C ein Core-ähnliches Protein der Wirtszelle oder eines koinfizierenden Virus nutzen. Darüber hinaus wäre das Fehlen eines Core-Proteins für GBV-C denkbar, da bislang der elektronenmikroskopische Nachweis fehlt.

1.2.2 Replikation

Im Gegensatz zu HCV handelt es sich bei GBV-C nicht um ein primär hepatotropes Virus [¹²²Berg et al. 1999, ¹²³Kao et al. 1999]. Erste Hinweise auf den Replikationsort ergaben sich aus Untersuchungen von Kobayashi et al. [¹²⁴1999], die eine Replikation in monozytären Zellen nachwiesen. Im selben Jahr zeigten auch Fogeda et al. [¹²⁵1999] die Replikation von GBV-C in PBMC. Xiang et al. [¹²⁶2000] konnten durch Transfektion eines Vollängen-RNA-Transkripts eines GBV-C-cDNA-Klons in CD4-positiven T-Lymphozyten eine GBV-C-Replikation induzieren. Darüber hinaus demonstrierten George et al. [¹²⁷2006], dass klinische

GBV-C-Isolate CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten-Fraktionen sowie CD19-positive B-Lymphozyten infizieren. Diese Daten sind Hinweise darauf, dass GBV-C ein panlymphotropes Virus ist. Die einzelnen Replikationsschritte im Detail zu verstehen, wird durch das Fehlen eines effizienten Zellkultursystems für GBV-C erschwert. Vermutlich erfolgt, vergleichbar mit HCV, die Bindung und Aufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose. Dabei interagiert das E2-Protein mit einem oder mehreren zellulären Rezeptoren. Hinweise, nach denen der CD81-Rezeptor, der als zellulärer Rezeptor für HCV beschrieben wurde, ebenfalls als Bindungsmolekül für GBV-C dient [¹²⁸Nattermann et al. 2003], konnten nicht bestätigt werden [¹²⁹Kaufman et al. 2007]. Infolge der Fusion der viralen und zellulären Membran wird das RNA-Genom ins Zytoplasma freigesetzt. Aufgrund der besonderen Struktur der 5'-NTR wird eine cap-unabhängige Translation ermöglicht. Nach einem Modell von Simons et al. [¹¹⁶1996] besteht die IRES des GBV-C aus Einzelstrangbereichen sowie stark konservierten Sekundärstrukturen in Form von Helices. Innerhalb der IRES ist zudem das postulierte Startcodon (AUG) der Translation lokalisiert. Es befindet sich vor der kodierenden Region für das E1-Protein und ist in vitro verantwortlich für den Start der Translation. Die Autoren gehen von folgender Funktionsweise der IRES aus: Das Ribosom bindet an einen Sequenzabschnitt vor dem eigentlichen Startcodon und scannt die RNA in 5'-3'-Richtung. Bei Erreichen des Startcodons wird dann die Translation initiiert, in deren Folge ein einzelnes Polyprotein exprimiert wird. Durch zelluläre und virale Proteasen erfolgt die co- und posttranslationale Prozession in die einzelnen viralen Proteine. Die Glykosylierung der Glykoproteine E1 und E2 wird im ER realisiert. Die Freisetzung der Strukturproteine E1, E2 und p5.6 erfolgt durch mit dem ER assoziierte zelluläre Signalpeptidasen [¹⁰²Linnen et al. 1996, ¹¹⁶Simons et al. 1996]. E1 und E2 assoziieren dann an der Zelloberfläche zu Heterodimeren. Die Spaltung der Nichtstrukturproteine erfolgt durch virale Proteasen. Die NS2-Autoprotease spaltet den Polyproteinstrang zwischen den Proteinen NS2 und NS3, wohingegen die NS3-Serinprotease die Spaltungen an den Übergängen NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A und NS5A-NS5B katalysiert. Dabei erfordert die Proteolyse am Übergang NS4B-NS5A die Aktivität des NS4A-Proteins als Kofaktor [¹¹⁰Leary et al. 1996, ¹¹¹Belyaev et al. 1998]. Die Synthese viraler genomischer RNA wird vermutlich vergleichbar zu HCV durch die Amplifikation einer Minusstrang-RNA induziert, die als Vorlage für die Synthese von Plusstrang-RNA dient. Verantwortlich hierfür ist das NS5B-Protein, das als virale RNA-abhängige RNA-Polymerase fungiert [¹³⁰Ali et al. 2002, ¹³¹Ferron et al. 2005]. Außerdem ist vermutlich die Helikase (NS3) in den GBV-C-Replikationszyklus involviert [¹³²Reed et al. 2000, ¹³³Cuceanu et al. 2001, ¹¹³Berzsenyi et al. 2005].

1.2.3 Übertragung, Prävalenz und Klinik

GBV-C wird parenteral, vertikal und sexuell übertragen [¹³⁴Feucht et al. 1996, ¹³⁵Lin et al. 1996, ¹³⁶Schmidt et al. 1996, ¹³⁷Stark et al. 1996, ¹³⁸Alter et al. 1997, ¹³⁹Kao et al. 1997, ¹⁴⁰Viazov et al. 1997, ¹⁴¹Lefrère et al. 2000, ¹⁴²Frey et al. 2002, ¹⁴³Paternoster et al. 2009]. Die Prävalenz der GBV-C-Virämie schwankt hinsichtlich der geographischen Herkunft der Studiengruppe. Sie liegt in westlichen Industrieländern bei 2 bis 12,5 % [¹⁴⁴Dille et al. 1997, ¹⁴⁵Nordbo et al. 2000, ¹⁴⁶Christensen et al. 2003], während in Afrika mehr als 10 % der gesunden Bevölkerung GBV-C-RNA aufweisen [¹⁴⁷Dawson et al. 1996, ¹⁴⁸Tucker et al. 1997, ¹⁴⁹Tanaka et al. 1998, ¹⁵⁰Tuveri et al. 2000].

GBV-C kann mehrere Jahre im Organismus persistieren [¹⁵¹Tacke et al. 1997a, ¹⁵²Feucht et al. 1997a]. Die Mehrheit der Patienten bildet jedoch innerhalb der ersten Jahre nach Infektion Antikörper gegen das E2-Protein, deren Auftreten mit der Eliminierung des Virus einhergeht. Gleichzeitiges Vorliegen einer GBV-C-Virämie und von Anti-E2-Antikörpern ist daher sehr selten [¹⁴⁴Dille et al. 1997, ¹⁵¹Tacke et al. 1997a, ¹⁵³Tillmann et al. 1998, ¹⁵⁴Williams et al. 2004]. Bei 9 bis 16 % der gesunden Probanden und bei bis zu 68 % der Patienten aus Risikogruppen können E2-Antikörper nachgewiesen werden [¹⁵⁵Tacke et al. 1997b, ⁹Heringlake et al. 1998, ¹⁵³Tillmann et al. 1998, ¹⁵⁶Feucht et al. 1999, ¹⁵⁷Tan et al. 1999, ¹⁵⁸Björkmann et al. 2001, ¹⁵⁹Kleinmann et al. 2001].

Neben der hohen Anti-E2-Antikörperprävalenz ist auch die Rate der GBV-C-Virämie aufgrund erhöhter Exposition bei Patienten mit chronischer Hepatitis, Leberzirrhose oder Leberzellkarzinom mit 10 bis 38 % hoch [¹⁶⁰Heringlake et al. 1996, ¹⁶¹Panda et al. 1996, ¹⁶²Lightfoot et al. 1997, ¹⁶³Kanda et al. 1997, ¹⁶⁴Rambusch et al. 1998, ¹⁶⁵Tagger et al. 1999, ¹⁶⁶Kapoor et al. 2000, ¹⁶⁷Jones et al. 2005, ¹⁶⁸Vogt et al. 2006, ¹⁶⁹Tassopoulos et al. 2008]. Obwohl einzelne Studien einen möglichen Zusammenhang zwischen einer fulminanten Hepatitis und einer GBV-C-Infektion beobachteten [¹⁷⁰Yoshida et al. 1995, ¹⁷¹Heringlake et al. 1996], konnten diese Studienergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden [¹⁷²Feucht et al. 1997b] oder zu geringe Fallzahlen ermöglichten nur eine eingeschränkte Auswertung [¹⁷³Inoue et al. 1999]. Gleiches gilt für Studien zu lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen [¹⁷⁴Renzo et al. 2002] und Non-Hodgkin-Lymphom [¹⁷⁵Krajden et al. 2009], wo Limitationen im Studiendesign [¹⁷⁶Stapleton et al. 2010] oder nicht nachvollziehbare Befunde [¹⁷⁷Ernst et al. 2010] eine Auswertung erschweren. Zusätzliche Studien mit größeren und sorgfältig ausgewählten Probandengruppen wären erforderlich [¹⁷⁸Krajden et al. 2010]. Da jedoch bislang kein kausaler Zusammenhang zwischen Leber- oder anderen Erkrankungen und einer GBV-C-Infektion nachgewiesen werden konnte, wird GBV-C als nichtpathogen eingestuft und es wird ihm aktuell im klinischen Alltag keine Bedeutung als Pathogen beigemessen.

1.2.3.1 GBV-C-Koinfektionen mit anderen Viren

Aufgrund gleicher Übertragungswege für GBV-C, HBV, HCV und HIV-1 ist das Auftreten von Koinfektionen zu einem hohen Prozentsatz naheliegend. HIV-1-Patienten zum Beispiel zeigen GBV-C-RNA-Prävalenzen von 15 bis 45 % [¹³⁸Alter et al. 1997, ¹⁷⁹Lau et al. 1999, ¹⁸⁰Rey et al. 1999, ¹⁸¹Puig-Basagoiti et al. 2000, ¹⁸²Rendina et al. 2001, ¹⁵⁸Björkmann et al. 2001]. Darüber hinaus steigt bei Patienten mit regelmäßigen Bluttransfusionen das Risiko für die Infektion mit durch Blut übertragenen Viren wie zum Beispiel GBV-C [¹⁷²Feucht et al. 1997b]. Auch für Transplantations- und Dialysepatienten wurden erhöhte Infektionsraten von bis zu 41 % beobachtet [¹⁵²Feucht et al. 1997a, ¹⁸³Hinrichsen et al. 2002]. Eine weitere Risikogruppe für die Infektion mit GBV-C sind intravenös Drogenabhängige mit einem erhöhten Infektionsrisiko von bis zu 35 % [¹⁸⁴Oubiña et al. 1999, ¹⁴⁶Christensen et al. 2003]. Für Hepatitispatienten liegt, wie im Abschnitt 1.2.3 beschrieben, ebenfalls ein verstärktes Risiko für GBV-C-Infektionen vor. Bei keiner der genannten Risikogruppen konnte jedoch ein negativer Einfluss von GBV-C auf den Verlauf der durch das koinfizierende Virus hervorgerufenen Erkrankung nachgewiesen werden.

Dagegen zeigten epidemiologische Untersuchungen, dass die chronische GBV-C-Koinfektion bei HIV-1-Patienten den Verlauf der HIV-1-Infektion positiv beeinflusst und mit einer signifikant erhöhten Überlebensrate assoziiert ist [⁹Heringlake et al. 1998, ¹⁸⁵Lefrere et al. 1999, ¹⁸⁶Yeo et al. 2000, ¹⁰Tillmann et al. 2001, ¹¹Xiang et al. 2001, ¹²Zhang et al. 2006, ¹⁸⁷Yirrell et al. 2007, ¹⁸⁸Moenkemeyer et al. 2008]. Im Gegensatz zu den Studien, die einen positiven Effekt für GBV-C/HIV-1-koinfizierte Patienten demonstrierten, konnte in einigen Analysen kein signifikanter Vorteil für diese Kohorte beobachtet werden [¹⁸⁹Birk et al. 2002, ¹⁹⁰Brumme et al. 2002, ¹⁹¹Björkmann et al. 2004, ¹⁹²Kaye et al. 2005]. Aufgrund dieser diskrepanten Ergebnisse führten Zhang et al. 2006 [¹²] eine Metaanalyse durch, wobei sie unter anderem den Zeitpunkt und die Dauer der GBV-C-Infektion in Bezug auf die HIV-1-Serokonversion einbezogen. Durch die Untersuchung konnten sie den positiven Effekt von GBV-C bei GBV-C/HIV-1-koinfizierten Patienten bestätigen. Entscheidend für diesen positiven Effekt ist jedoch, in welcher Phase der HIV-1-Infektion die GBV-C-Infektion nachweisbar ist. Nur bei Probanden, die auch im späteren Verlauf der HIV-1-Erkrankung GBV-C-RNA-positiv waren, konnte eine günstigere Progression beobachtet werden. Anhand der Metaanalyse lassen sich möglicherweise die diskrepanten Daten der verschiedenen klinisch-epidemiologischen Studien erklären, da Studien ohne beobachteten positiven Effekt die Dauer der GBV-C-Infektion nicht berücksichtigten. Zusammenfassend impliziert die Studie von Zhang eine virale Interferenz zwischen GBV-C und HIV-1. Dies wird durch die Beobachtung, dass in GBV-C/HIV-1-Koinfizierten die Viruslasten für GBV-C und HIV-1 eine inverse Korrelation aufweisen, untermauert [¹⁰Tillmann et al. 2001]. Die Interferenz beruht wahrscheinlich auf mehreren Mechanismen. Moenkemeyer et al. [¹⁸⁷2008] konnten nachweisen, dass durch die GBV-C-Infektion die Fas-Expression auf der Zelloberfläche vermindert und dadurch die Fas-induzierte Apoptose GBV-C/HIV-1-koinfizierter Zellen

reduziert ist. Ein anderer möglicher Interaktionsmechanismus beruht auf der Stimulation primärer Lymphozyten durch GBV-C, lösliche antivirale Faktoren wie zum Beispiel SDF-1 (stromal cell-derived factor) und RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed, and secreted) zu sezernieren. SDF-1 und RANTES sind natürliche Liganden der HIV-1-Korezeptoren CXCR-4 und CCR-5, induzieren nach Bindung deren verringerte Expression auf der Zelloberfläche und könnten dadurch den Zelleintritt von HIV-1 unterdrücken. Die GBV-C-vermittelte Induktion dieser Chemokine kann die HIV-1-Replikation *in vitro* unabhängig vom Korezeptortropismus der HIV-1-Isolate hemmen [¹²⁸Nattermann et al. 2003, ¹⁹³Xiang et al. 2004, ¹⁹⁴Jung et al. 2005]. Diese Untersuchungen geben erste Hinweise auf einen möglichen Mechanismus der GBV-C-induzierten Inhibition der HIV-1-Replikation *in vivo*.

1.3 ZIEL DER ARBEIT

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die persistente Koinfektion mit dem nichtpathogenen GBV-C mit höheren CD4-T-Zellzahlen, einer geringeren HIV-1-Viruslast und einer höheren Überlebensrate in HIV-1-Patienten assoziiert ist [⁹Heringlake et al. 1998, ¹⁰Tillmann et al. 2001, ¹¹Xiang et al. 2001, ¹²Zhang et al. 2006]. Im Gegensatz dazu waren einige andere Studien nicht in der Lage, diesen Effekt zu dokumentieren [¹⁸⁹Birk et al. 2002, ¹⁹⁰Brumme et al. 2002, ¹⁹²Kaye et al. 2005]. Darüber hinaus gibt es nur wenige Daten zur GBV-C-Infektion bei Kindern und Jugendlichen, woraus sich folgende Punkte für die vorliegende Arbeit ergeben:

1. Evaluation, ob GBV-C kausal mit dem besseren Verlauf der HIV-1-Infektion bei hämophilen Kindern und Jugendlichen assoziiert ist.
2. Sind die diskrepanten Befunde der klinischen Studien auf die Variabilität des GBV-C zurückzuführen oder liegen tatsächliche inhibitorische Mechanismen zugrunde?

Zur Frage, ob sich die bei erwachsenen HIV-1-Patienten beobachteten Befunde auch bei Kindern nachweisen lassen, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von GBV-C auf die HIV-1-Infektion bei HCV-positiven hämophilen Kindern und Jugendlichen analysiert werden. Dies ist erforderlich, da für diese Patientengruppe mit und ohne HIV-1-Infektion bislang nur wenige Daten vorliegen [¹⁹⁵Shuval et al. 2005]. Des Weiteren sollte der Effekt von GBV-C auf den natürlichen Verlauf der HCV-Infektion in dieser Kohorte sowie in einer Langzeitstudie HCV-infizierter Frauen analysiert werden.

Für die vorliegende Arbeit war der Aufbau einer GBV-C-Serumbank erforderlich, um ausreichend GBV-C-positives Material zur Verfügung zu haben. Des Weiteren sollte ein Zellkultursystem etabliert werden, das die Replikation von GBV-C und HIV-1 ermöglicht und so Untersuchungen zur viralen Interferenz beider Viren unter standardisierten Bedingungen gestattet. Im Rahmen molekularbiologischer Analysen sollten die für den inhibitorischen Effekt auf HIV-1 ursächlichen GBV-C-Proteine identifiziert und näher charakterisiert werden. Unter der Annahme, dass die Proteinexpression und damit auch die Konzentration von potentiellen HIV-1-inhibitorischen GBV-C-Proteinen von der Aktivität der IRES im N-terminalen Abschnitt des viralen Genoms abhängen und sie dadurch maßgeblich Einfluss auf die GBV-C-vermittelte HIV-1-Hemmung haben könnten, sollte abschließend auch das HIV-1-inhibitorische Potential verschiedener klinischer GBV-C-Isolate und die Translationsaktivität ihrer IRES untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit leistet damit einen Beitrag zur Aufklärung der molekularbiologischen Wechselwirkungen zwischen GBV-C und HIV-1 und kann den Ansatz für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen HIV-1 bieten.

2. METHODEN

2.1 RNA-TECHNIKEN

2.1.1 Extraktion viraler RNA

Virale RNA aus Serum und Zellkulturüberständen wurde unter Verwendung verschiedener Extraktionssysteme isoliert. Dazu wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene Systeme getestet: High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Mannheim/D), High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim/D), NucleoSpin® RNA Virus (Machery&Nagel, Düren/D), Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden/D). Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.1.2 Quantifizierung von GBV-C-RNA mittels quantitativer RT-PCR

Die GBV-C-RNA-Konzentration wurde mit dem LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe von Roche (Mannheim/D) oder dem QuantiFast Probe RT-PCR Multiplex Master Mix von Qiagen (Hilden/D) im Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim/D) unter Verwendung von Primern für die 5'-NTR (siehe Tabelle 3.1) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Lightcycler 2.0 Software (Roche Diagnostics, Mannheim/D). Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Quantifizierung von GBV-C-RNA mit dem LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe.

LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	V _{Gesamt} = 20 µl	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n _{Zyklen}
Wasser	1,8 µl	Reverse Transkription	55 °C	30 min	1
MgCl ₂	1,6 µl	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Mix1	0,4 µl	Denaturierung	94 °C	15 s	60
Mix2	4,0 µl	Annealing	56 °C	15 s	
G4-Primer (10 µM)	0,6 µl	Elongation	72 °C	30 s	
G3-Primer (10 µM)	0,6 µl	Kühlung	40 °C	1 min	1
GBV-C-Sonde (4 µM)	1,0 µl	Lightcycler			
RNA	10,0 µl				

Tabelle 2.2: Quantifizierung von GBV-C-RNA mit dem QuantiFast Probe RT-PCR Multiplex Master Mix.

QuantiFast Probe RT-PCR Multiplex Master Mix					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	$V_{\text{Gesamt}} = 20 \mu\text{l}$	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n_{Zyklen}
2x Mastermix	8,0 μl	Reverse Transkription	50 °C	20 min	1
QuantiFast RT-Mix	0,2 μl	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
G4-Primer (10 μM)	0,4 μl	Denaturierung	95 °C	15 s	60
G3-Primer (10 μM)	0,4 μl	Annealing/Elongation	60 °C	45 s	
GBV-C-Sonde (4 μM)	1,0 μl	Kühlung	40 °C	1 min	1
RNA	10,0 μl	Lightcycler			

2.1.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Unter Verwendung von random Hexamer-Primern (0,2 μg ; Fermentas, Leon-Roth/D) oder eines sequenzspezifischen Primers (10 μM reverser Primer) sowie einer Reversen Transkriptase (Omniscript, Qiagen, Hilden/D) wurden gemäß Herstellerangaben 10 μl virale RNA in copy-DNA (cDNA) in einem FlexCycler (AnalytikJena, Jena/D) umgeschrieben (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase des Omniscript-Kits.

Bei Verwendung des genspezifischen Primers gelten die in den Klammern angegebenen Volumina.

Omniscript					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	$V_{\text{Gesamt}} = 20 \mu\text{l}$	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n_{Zyklen}
Wasser	3,5 (3,0) μl	Annealing	25 °C	5 min	1
10x Puffer	2,0 μl	Reverse Transkription	37 °C	60 min	1
dNTP (je 2,5 mM)	2,0 μl	Kühlung	4 °C	∞	1
random Primer (genspezifischer reverse Primer)	0,5 (1,0) μl	FlexCycler			
1x RNase out (1:4)	1,0 μl				
Reverse Transkriptase	1,0 μl				
RNA	10,0 μl				

2.2 DNA-TECHNIKEN

2.2.1 Modifikation von DNA

2.2.1.1 Aufspaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

In Abhängigkeit von der Größe der zu erwartenden Fragmente wurden 1-5 μg DNA enzymatisch verdaut. Das Reaktionsvolumen wurde der Menge der zu schneidenden DNA angepasst: 20 μl für 0,5-2 μg DNA; 30-50 μl für 3-5 μg DNA. Gemäß Herstellerangaben und

unter Gewährleistung der enzymespezifischen Pufferbedingungen wurde der Reaktionsansatz pro 1 µg DNA mit 1 U Restriktionsenzym versetzt und für 1-4 Stunden bei der enzymespezifischen optimalen Temperatur inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Hitze (nach Herstellerangaben) oder durch Zugabe von 1/10 Volumen EDTA.

2.2.1.2 Dephosphorylierung

Um die 5'-Enden linearer DNA-Fragmente zu dephosphorylieren, wurde die DNA in Gegenwart einer alkalischen Phosphatase (1 U/1 µg Plasmid-DNA; New England Biolabs, Frankfurt a.M./D) für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl DNA-Ladepuffer/5 µl Reaktionsgemisch gestoppt und das dephosphorylierte DNA-Fragment mittels präparativer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.1.3 Generieren von 3'-Adenosin-Überhängen

Für die Generierung von 3'-Adenosin-Überhängen wurden Blunt-End-PCR-Produkte unmittelbar im Anschluss an die High-Fidelity-PCR mit 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 0,5 µl dATP (100 mM), 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 1 µl MgCl₂ (15 mM) versetzt. Die Taq-Polymerase wurde bei 95 °C für 3 Minuten aktiviert. Das Anhängen der Adenosin-Überhänge erfolgte bei 72 °C für 20 Minuten.

2.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor-DNA und zu inserierendes DNA-Fragment wurden im molekularen Verhältnis 1:3 mit dem Rapid Ligation Kit (Roche, Mannheim/D) oder mit der T4-DNA-Ligase von Fermentas (Leon-Roth/D) im entsprechenden Puffersystem nach Angaben des Herstellers angesetzt und für 1 Stunde bei 25 °C und anschließend über Nacht bei 16 °C ligiert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. In Abhängigkeit von Länge, Struktur und Basenzusammensetzung der zu amplifizierenden DNA sowie von den Primereigenschaften erfolgte die PCR-Reaktion unter Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen und PCR-Reaktionsbedingungen.

2.2.3.1 Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzelllysaten (Kolonie-PCR)

Um nach der Transformation von *E. coli* positive Klone im Hochdurchsatz zu identifizieren, wurden Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde jeder Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen, auf einer Replikplatte ausgestrichen und die Pipettenspitze anschließend in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 10 µl PCR-Mastermix

(GoTaq® Green Master Mix; Promega, Mannheim/D) gespült. Die Auswertung der PCR und die Identifikation positiver Klone erfolgten mittels Agarosegelelektrophorese. Der bereits im Mastermix enthaltene Ladepuffer ermöglichte das direkte Auftragen auf ein Agarosegel des PCR-Ansatzes im Anschluss an die PCR (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Kolonie-PCR mit GoTaq® Green Master Mix.

GoTaq® Green Master Mix					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	$V_{\text{Gesamt}} = 10 \mu\text{l}$	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n_{Zyklen}
Wasser	4,0 μl	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
2x Mastermix	5,0 μl	Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primer fwd (10 μM)	0,5 μl	Annealing	53 °C	15 s	
Primer rev (10 μM)	0,5 μl	Elongation	72 °C	1 min	
DNA	1 Kolonie	Finale Elongation	72 °C	5 min	1
		Kühlung	4 °C	∞	1
		FlexCycler			

2.2.3.2 Amplifikation von DNA

Für die Amplifikation bestimmter Genbereiche und zur Austestung der optimalen Annealingtemperatur sequenzspezifischer Primer wurde das GeneAmp®-System von Applied Biosystems (Darmstadt/D) verwendet (Tabelle 2.5). Die Elongationszeit ergab sich aus der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (3 kb/min).

Tabelle 2.5: Bedingungen für die PCR mit DNA als Template mit GeneAmp® und AmpliTaq® DNA-Polymerase.

GeneAmp® mit AmpliTaq® DNA-Polymerase					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	$V_{\text{Gesamt}} = 20 \mu\text{l}$	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n_{Zyklen}
Wasser	9,0 μl	Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
10x Reaktionspuffer	2,0 μl	Denaturierung	94 °C	30 s	45
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μl	Annealing	50-70 °C	30 s	
dNTP (je 2,5 mM)	1,5 μl	Elongation	72 °C	$20 \text{ s} / 1 \text{ kb}$	
Primer fwd (10 μM)	0,6 μl	Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Primer rev (10 μM)	0,6 μl	Kühlung	4 °C	∞	1
Taq (5 U/ μl)	0,1 μl	FlexCycler			
DNA	5,0 μl				

2.2.3.3 High-Fidelity-PCR

Für die fehlerarme Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen und Sequenzierungen wurde eine rTth-Polymerase mit Proofreading-Aktivität verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst.

Tabelle 2.6: PCR mit GeneAmp® XL PCR Kit.

GeneAmp® XL PCR Kit					
Reaktionsmix		PCR-Bedingungen			
Reagenz	$V_{\text{Gesamt}} = 40 \mu\text{l}$	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	n_{Zyklen}
Wasser	12,5 μl	Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
3,3x Reaktionspuffer	13,3 μl	Denaturierung	95 °C	30 s	45
Mg(OAc) ₂ (25 mM)	2,4 μl	Annealing	50-70 °C	30 s	
dNTP (je 2,5 mM)	2,4 μl	Elongation	68 °C	^{60 s} / _{1 kb}	
fwd Primer (10 μM)	2,0 μl	Finale Elongation	68 °C	10 min	1
rev Primer (10 μM)	2,0 μl	Kühlung	4 °C	∞	1
rTth (2 U/ μl)	0,4 μl	FlexCycler			
DNA	5,0 μl				

2.2.4 Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten und 3D-Computermodelle

Für die Sequenzanalyse von cDNA bzw. Plasmiden wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte über eine High-Fidelity-PCR amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte über die Agarosegelelektrophorese. Die Sequenzierungen wurden mit Unterstützung der CoreUnit des Interdisziplinären Zentrums für Forschung (IZKF) der Universität Leipzig oder der MWG (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg/D) durchgeführt. Für die Elongation im Rahmen der IRES-Experimente wurden verschiedene Elongationstemperaturen (40 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 68 °C) getestet. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung der klonierten Expressionskassette auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software von Chromas, Bioedit (www.bioedit.com) und CloneManager. Alle verwendeten Angaben für Genbereiche des GBV-C beziehen sich auf das Referenzisolat AF121950, um bei Daten aus verschiedenen Quellen eine einheitliche Darstellung zu gewährleisten.

Die Erstellung der 3D-Computermodelle für das E2-Protein wurde mit der Software I-TASSER vorgenommen [¹⁹⁶Zhang 2009, ¹⁹⁷Roy et al. 2010].

2.2.5 Analyse von DNA

2.2.5.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus kleinvolumigen Bakterienkulturen (Minipräparation) erfolgte mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden/D). Die in Glycerol konservierten Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C/200 rpm (C25KC Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison/NJ/USA) angezogen und die Plasmid-DNA aus 2 ml Bakteriensuspension nach Herstellerprotokoll isoliert.

Alternativ erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA nach folgendem Protokoll unter Verwendung der Lösungen I, II und III aus dem Plasmid Mini Kit von Qiagen. 2 ml der Übernachtskultur wurden bei 14.000 x g für 5 Minuten pelletiert und in 0,3 ml Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Lösung II und gründlichem Mischen wurden die Bakterien durch 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Die Präzipitation der Zelltrümmer erfolgte durch die langsame Zugabe von 0,3 ml Lösung III und die anschließende Inkubation von 5-10 Minuten auf Eis. Durch Zentrifugation der Suspension bei 14.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zelltrümmer pelletiert und der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit 0,8 ml Isopropanol versetzt. Zur optimalen Vermischung erfolgte die mehrmalige Inversion des Röhrchens, woran sich eine Inkubation auf Eis für 5-10 Minuten anschloss. Für die DNA-Präzipitation wurden die Proben im Weiteren bei 14.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligen Waschen des DNA-Pellets mit 0,5 ml 70 %igem Ethanol (14.000 x g/5 min) und einem Trockenvorgang bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten wurde die pelletierte Plasmid-DNA in 40 µl destilliertem Wasser aufgenommen, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus 50 bzw. 250 ml Übernachtskulturen (Midi- und Maxipräparation) wurden das Plasmid-Midi- bzw. -Maxipräparationskit nach Herstellerangaben verwendet (Qiagen, Hilden/D).

2.2.5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Durch Restriktionsverdau oder PCR hergestellte DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Gelkonzentration wurde dabei in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentgrößen gewählt. Dazu wurde entsprechend der erforderlichen Gelkonzentration (w/v) Agarose (Invitrogen, Groningen/D) eingewogen, mit 1x TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose aufgeköcht. Die auf 60 °C abgekühlte Agaroselösung wurde mit 300 ng Ethidiumbromid/ml (Sigma Aldrich, Deisenhofen/D) versetzt und in den Gelschlitten gefüllt. Nach Aushärtung des Gels erfolgten die Entfernung der Käme und die Überführung der Gelschlitten inklusive des Gels in die Elektrophoresekammer. Anodenseitig wurden zusätzlich 20 µg Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (10:1) gemischt, auf das Gel aufgetragen und

bei 110 V für 60 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenreferenz diente entweder ein 1 kb-DNA-Längenstandard (1-10 kb, Fermentas, Leon-Roth/D) oder ein 100 bp-DNA-Längenstandard (0,1-1 kb, Promega, Mannheim/D). Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte mit dem Alphamager™ HP und der Software Alphamager 3.0.3.0 (Alpha Innotech, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf/D).

2.2.5.3 Aufreinigung von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten

Gelelektrophoretisch aufgetrennte, ethidiumbromidgefärbte DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht illuminiert, die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel recovery Kits von Zymoclean (HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg/D) oder des QIAquick™ Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden/D) nach Angaben des Herstellers.

2.2.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

1/10 Volumen des Reaktionsansatzes wurden nach Abschluss der PCR mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Im Fall einer einzelnen Bande mit korrekter Größe wurde der restliche PCR-Ansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden/D) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Lagen mehrere Banden vor, wurde der restliche PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt, das DNA-Fragment mit der korrekten Fragmentlänge ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei Anwendungen, die eine definierte Konzentration der eingesetzten RNA bzw. DNA erforderten, wurden mit einem Photometer (Eppendorf, Hamburg/D) die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt.

2.2.7 Klonierung der IRES

Die Amplifikation der IRES-Sequenzen verschiedener klinischer GBV-C-Isolate erfolgte durch reverse Transkription und High-Fidelity-PCR. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Nach Anfügen von 3'-Adenosin-Überhängen wurden die PCR-Produkte in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor unter Verwendung des entsprechenden Expressionskits (pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® Expression Kit, Invitrogen, Groningen/D) nach Angaben des Herstellers kloniert. Nach der Transformation in *E.coli* SURE und Inkubation der Bakterienkulturen über Nacht wurden positive Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert, nachfolgend 5 ml-Übernachkulturen angeimpft und aus diesen die Plasmid-DNA extrahiert und sequenziert. Anschließend

wurden die IRES-Fragmente mittels High-Fidelity-PCR durch Primer mit der Sequenz für eine EcoRI-Schnittstelle an ihrem 5'-Ende amplifiziert, um diese Restriktionsstelle an die IRES anzufügen. Danach wurden die so generierten IRES-Fragmente unter Verwendung der EcoRI-Erkennungssequenz enzymatisch geschnitten und in den mit EcoRI geöffneten, dephosphorylierten DCV-Vektor (siehe Anhang 1.2, zur Verfügung gestellt durch Peter Karayannis und Daniel Forton, Division of Medicine, Faculty of Medicine, Imperial College London, UK) einkloniert. Durch die Einklonierung der IRES-Fragmente über die EcoRI-Schnittstelle entsteht ein offener Leserahmen, der die Expression der Fireflyluziferase über die verschiedenen GBV-C-IRES in Form einer bicistronischen RNA ermöglicht. Dazu wurde mittels Sequenzierung überprüft, ob die IRES-Sequenzen mit den Ausgangssequenzen übereinstimmten und die Insertion im gleichen Leserahmen mit dem Fireflyluziferasegen stattgefunden hatte. Dies ist Voraussetzung für den Translationsstart vom viralen ATG aus. Eine Fireflyaktivität ist dann nur zu beobachten, wenn sich das Fireflyluziferasegen mit dem Startcodon der IRES für die Translation im gleichen Leserahmen befindet. In reverser Orientierung findet keine Translation der Firefly-mRNA stattfinden. Die Expression der Renillaluziferase wird unabhängig von der GBV-C-IRES durch den eukaryotischen SV40-Promotor induziert und wurde daher für die Normalisierung der Messergebnisse verwendet (Abbildung 2.1).

Die Klonierung der IRES des Enzephalomyokarditisvirus (EMCV) erfolgte, ausgehend vom Vektor pIRESneo (Clontech, Mountain View, CA/USA), jedoch ohne Subklonierungsschritt analog zum oben beschriebenen Verfahren.

Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Jörg Baumann und Dr. Sabine Breun am Fraunhofer Institut für Immunologie und Zelltherapie Leipzig durchgeführt.

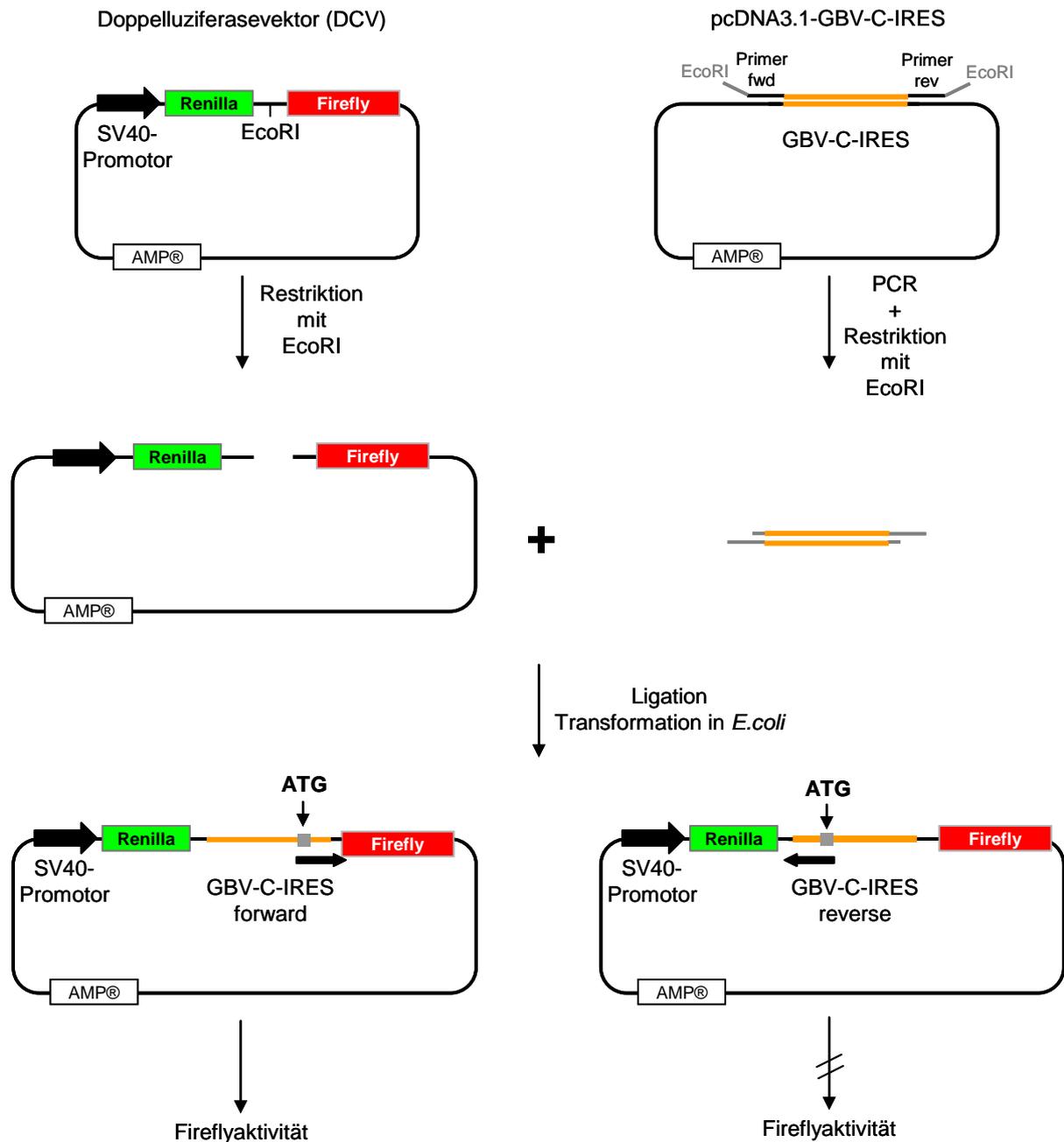


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Konstruktion der GBV-C-IRES-Expressionsplasmide. Das ATG und der Pfeil kennzeichnen den Translationsstart und die Translationsrichtung der IRES.

2.3 PROTEIN-BIOCHEMISCHE METHODEN

2.3.1 Analyse der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der transienten Proteinexpression wurden mit pEGFP transfizierte Zellen oder nichttransfizierte Zellen mit PBS/2 M EDTA aus der Zellkulturplatte gelöst, pelletiert und in PBS mit 2 % FKS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Durch die Expression des EGFP (enhanced green fluorescent protein) konnte die Quantifizierung der Proteinexpression über die Grünfluoreszenz der Zellen erfolgen (FACS Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg/D). Die

Auswertung der Analysen wurde mit der Software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg/D) durchgeführt.

2.3.2 Extraktion der löslichen Proteinfraction aus eukaryotischen Zellen

Für die Extraktion des Gesamtproteins wurde 48 Stunden nach der Transfektion das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 1 ml auf 4 °C temperiertem PBS gespült. Der in Wasser verdünnte Lysepuffer (5x passive lysis buffer, Promega, Mannheim/D) wurde in einfacher Konzentration auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde das Zelllysat vollständig in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und auf Eis 15-20 Minuten unter regelmäßigem Vortexen inkubiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden bei 14.000 x g für 3 Minuten und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde ohne Zerstörung des Zelldebris pellets in ein frisches, vorgekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und sofort für die nachfolgenden Analysemethoden verwendet.

2.3.3 Luminometrische Bestimmung der Luziferaseaktivität

Je 20 µl Proteinextrakt wurden in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte im Luminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies, Bad Wildbad/D) nach Injektion des enzymespezifischen Substrats (Renilla Luciferase Assay System und Luciferase Assay System; Promega, Mannheim/D). Je Kavität wurden 100 µl Substrat injiziert und nach einer Wartezeit von 2 Sekunden die mittlere Signalstärke für 2 Sekunden gemessen. Zur Minimierung von Messabweichungen wurden alle Proben im Doppelansatz quantifiziert.

2.3.4 Nachweis viraler Antigene und virusindzierter Antikörper mittels ELISA

Die Quantifizierung des p24-Gehalts von Zellkulturüberständen erfolgte mittels des INNOTEST™ HIV Antigen mAb ELISA (Innogenetics, Gent/B). Der ELISA wurde gemäß Herstellerangaben in Doppelansätzen durchgeführt. Im ersten Schritt wurden im S3-Labor 100 µl der Proben entsprechend Protokoll lysiert und dadurch potentiell infektiöse Viren inaktiviert. Anschließend konnte der ELISA außerhalb des S3-Labors beendet werden.

Der Nachweis von GBV-C-E2-Antikörpern in Patientenseren wurde mit Hilfe des anti-HGenv ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim/D) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels des ELISA-Readers Infinite M200 und der Software Magellan6 (Tecan, Crailsheim/D).

2.3.5 Synthese von überlappenden E2-Peptiden

Die Peptide wurden vom Biochemischen Institut Barcelona (Spanien) zur Verfügung gestellt [¹⁹⁸Herrera et al. 2010]. Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO gelöst und im entsprechenden Medium verdünnt. Die Herstellung der Peptidlösungen erfolgte unmittelbar vor Versuchsbeginn. Die nicht verwendete Peptidstocklösung wurde bei -20 °C für maximal 2 Wochen gelagert.

2.4 PROKARYOTISCHE ZELLKULTUR

2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Fünf ml LB-Medium ohne Antibiotika wurden mit einem Bakterienklon beimpft und über Nacht bei 37 °C/220 rpm (Schüttelinkubator, C25KC Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Edison/NJ/USA) kultiviert. Danach wurden 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C/220 rpm inkubiert. Regelmäßig erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei 595 nm (OD_{595nm}) am Spektrometer (Eppendorf, Hamburg/D). Nach Erreichen einer OD_{595nm} von mindestens 0,2 und maximal 0,3 wurde die Kultur heruntergekühlt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Bakterien wurden pelletiert (2.500 rpm/4 °C/10 min; Sorvall® SUPER T21; Rotor Sorvall ST-H750, ThermoScientific, Langenselbold/D), in 20 ml Tfb-I-Puffer gewaschen (3.500 rpm/4 °C/10 min), in 4 ml Tfb-II-Puffer aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurden die Bakterien im Kühlraum zu je 50 µl aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* wurde auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Ligationsansatz bzw. 100 pg Plasmid gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C im Thermoblock wurde der Ansatz sofort auf Eis abgekühlt und für weitere 2 Minuten inkubiert, bevor die Bakterien in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, in ein 10 ml-PP-Röhrchen überführt und für eine Stunde bei 37 °C/140 rpm inkubiert wurden. Abschließend wurden 100 bzw. 250 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Kommerzielle, kompetente Bakterien wurden gemäß Herstellerprotokoll transformiert.

Die Transformationseffizienz pro µg Plasmid-DNA für jede Charge selbst hergestellter chemisch kompetenter Bakterien wurde durch Transformation von 10 pg pUC19 entsprechend des obigen Protokolls und Umrechnung auf 1 µg bestimmt.

2.4.3 Langzeitlagerung und Reaktivierung von *E. coli*

Für die Langzeitlagerung von *E. coli* wurde eine Übernachtskultur im Verhältnis 1:2 mit Glycerol versetzt und bei -80 °C weggefroren. Für die Anzucht einer neuen Flüssigkultur wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze eine kleine Menge der Glycerolkultur mit 250 ml LB-Medium (mit Selektionsmarker, hier 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C kultiviert (200 rpm).

2.5 EUKARYOTISCHE ZELLKULTUR

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Regelmäßig wurden die Zellkulturen auf Mykoplasmen getestet (Venor GeM Mycoplasma PCR Detection Kit; minerva biolabs, Berlin/D). Transfektionsexperimente wurden unter S2-Bedingungen, Koinfektionsexperimente unter S3-Bedingungen durchgeführt.

Für die regelmäßige Passagierung adhärenter Zellen (HeLa, HepG2, Huh-7) wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gespült und eine ausreichende Menge der Trypsinlösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA) in die Kulturflasche gegeben. Nach einer Inkubation von 2-3 Minuten im Brutschrank (37 °C) wurden die Zellen durch Klopfen vollständig vom Boden gelöst und das Trypsin durch die Zugabe von FKS-haltigem Medium inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen sorgfältig resuspendiert, 1/10 der Zellsuspension entnommen und in ein neues Kulturgefäß überführt. Die Kultivierung von 293T-Zellen erforderte keine Trypsinierung, da sich die Zellen bereits sehr effizient durch Klopfen und Spülen mit Medium vom Boden ablösen ließen.

Suspensionszellen (PBMC, CEMx174, CEMx174_{CCR5}) wurden im entsprechenden Medium kultiviert und regelmäßig 1:10 in frisches Kulturmedium passagiert.

Um Zellen für ein Experiment auszusäen, wurden diese in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 1.000-1.200 rpm für 5 Minuten in einer Zentrifuge (Rotina 46 RS, Hettich, Tuttlingen/D) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in adäquaten Zellkulturgefäßen in der gewünschten Zelldichte eingesät.

2.5.1.1 Isolation von PBMC

PBMC wurden aus Buffy coats ohne bekannte Infektion mit GBV-C, HAV, HBV, HCV und HIV-1 oder aus frischem EDTA-Vollblut mittels Ficoll-Dichte-Zentrifugation (1,077 g/ml; LSM 1077 Lymphocyte; PAA, Pasching/A) isoliert. Dafür wurde das Blut 1:2 mit PBS verdünnt. Jeweils 25 ml Blut wurden auf 20 ml Ficoll vorsichtig aufgeschichtet. Nach Zentrifugation bei 600 x g für 20 Minuten (ohne Bremse) wurde die leukozytenhaltige Interphase vorsichtig

abgenommen, in RPMI überführt und zweimal großvolumig gewaschen (220 x g/10 min). Die Zellen wurden auf eine finale Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Komplettmedium eingestellt und im Brutschrank (37 °C) kultiviert.

2.5.1.2 Langzeitlagerung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen

Für die langfristige Lagerung eukaryotischer mykoplasmenfreier Zellen wurden Zellen aus exponentiell wachsenden Zellkulturen pelletiert, anschließend in 100 % FKS resuspendiert und für 15-20 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde mit FKS auf $3-5 \times 10^6$ Zellen/500 μ l (für PBMC $20-40 \times 10^6/500 \mu$ l) eingestellt. Die Zellsuspension wurde danach tropfenweise im Verhältnis 1:2 mit eiskaltem Einfriermedium gemischt (500 μ l Einfriermedium pro 500 μ l FKS/Zellsuspension) und in Kryoröhrchen aliquotiert. Mittels einer Einfrierhilfe (NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container, ThermoFisher Scientific, Dreieich/D) wurden die Zellen mit einer Kühlrate von 1 °C pro Stunde auf -80 °C abgekühlt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Die Vitalität der gefrorenen Zellen wurde durch eine Auftaukontrolle überprüft.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen wurden die Zellen sofort in ein Probenröhrchen mit 13 ml des vorgewärmten Kulturmediums überführt und pelletiert (1.000 rpm/5 min, Rotina 46 RS Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D). Nach nochmaligen Waschen wurden sie in frischem vorgewärmtem Medium resuspendiert, in eine adäquate Zellkulturflasche (25-cm²-Kulturflasche für adhärente Zellen; 75-cm²-Kulturflasche für Suspensionszellen) überführt und unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, um verbliebene Spuren des DMSO-haltigen Einfriermediums zu beseitigen. Zwei Wochen nach dem Auftauen wurden die Kulturen auf die Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.5.1.3 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden mittels Trypanblau gefärbt (im Verhältnis 1:2-1:10) und in einer Neubauerzählkammer die Vitalzellzahlen bestimmt. Gezählt wurden 32 Großquadrate. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{vitale Zellen in 32 Großquadraten} / 2 * \text{Verdünnungsfaktor} * 10.000$$

2.5.2 Infektions- und Inkubationsprotokolle humaner Zellen

2.5.2.1 TCID₅₀

Zur Bestimmung der tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀ = zur Infektion von 50 % der Zellkulturen benötigte Verdünnung eines Virusstocks) wurden 2×10^5 PBMC oder $7,5 \times 10^4$ CEMx174-Zellen in jede Kavität einer 96-Well-Platte eingesät. Der Virusstock wurde

aufgetaut und 10-fach Verdünnungen im entsprechenden Kulturmedium hergestellt. Pro Verdünnung wurden 12 Kavitäten mit je 100 µl der Virussuspension infiziert. Am Tag 7 nach Infektion wurde die p24-Antigen-Konzentration im Überstand der infizierten Kulturen gemessen und die TCID₅₀ gemäß der Formel von Spearman-Kärber bestimmt [¹⁹⁹Hamilton et al. 1977].

2.5.2.2 Infektion mit klinischen GBV-C-Isolaten

Für die Replikationsexperimente wurden 1×10^5 adhärenente Zellen 24 Stunden vor der Infektion ausgesät (6-Well-Platte). Medium wurde am nächsten Tag abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 4×10^6 GBV-C-Genomäquivalente in 500 µl zugegeben. Nach einer Inkubation von 6 Stunden im Brutschrank (37 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde Kompletmedium zugegeben und die Zellen über 3 Wochen kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen 1:3 passagiert. Zellfreie Überstände und Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, bei -80 °C gelagert und die GBV-C-Viruslast bestimmt.

Frisch isolierte PBMC wurden für 2 Tage mit IL-2 (10 U/ml) und PHA (10 mg/ml) stimuliert. 10×10^6 primäre Lymphozyten oder immortalisierte Zellen wurden mit GBV-C-positivem Serum (je 2×10^6 GBV-C-Genomäquivalente/ 1×10^6 Zellen) versetzt und mit dem jeweiligen Kompletmedium auf 5 ml aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 6 Stunden im Brutschrank (37 °C) wurden die Zellen mit PBS großvolumig gewaschen, in Kompletmedium resuspendiert und unter Standardbedingungen kultiviert (Primärinfektion). Regelmäßig wurden zellfreie Überstände entnommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Um die begrenzte Teilungsfähigkeit der Zellen zu berücksichtigen, wurden am Tag 37 die Zellen gezählt und in gleicher Menge frische PBMC hinzugegeben.

Des Weiteren erfolgte die Infektion frischer PBMC mit einem Teil des zellfreien Überstandes der primär infizierten Kulturen (Sekundärinfektion) sowie die Bestimmung der Viruslast der Zellkulturüberstände am Tag 8 (d8). Die Abbildung 2.2 zeigt den experimentellen Ablauf für die Primär- sowie die Sekundärinfektion von PBMC mit GBV-C.

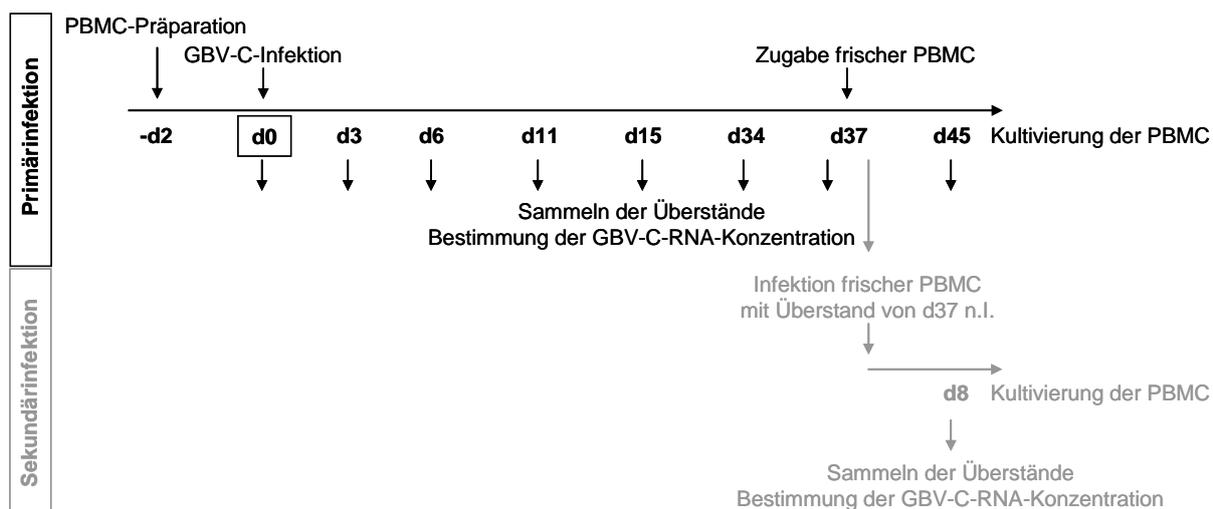


Abbildung 2.2: Experimenteller Ablauf zur Etablierung einer GBV-C-Infektion in PBMC.

2.5.2.3 Produktion von HIV-1-Stocks

Klinische und laboradaptierte HIV-1-Stämme wurden auf PBMC oder CEMx174-Zellen angezüchtet. Dazu wurden 2×10^7 Zellen in 20 ml PBMC-Komplettmedium (IL-2/PHA) oder RPMI-Komplettmedium resuspendiert und mit einer multiplicity of infection (MOI = Verhältnis aus der Anzahl der Viruspartikel in einem Ansatz, dividiert durch die Anzahl der Zielzellen) von 10 des jeweiligen HIV-1-Isolats für 4 Stunden im Brutschrank (37 °C) infiziert. Die aktive Replikation CXCR4-troper HIV-1-Stämme konnte anhand der Synzytienbildung, die Replikation CCR5-troper HIV-1-Stämme mittels der p24-Konzentration im Kulturüberstand verfolgt werden. War ein starker zytopathischer Effekt zu beobachten bzw. konnte ein hohe p24-Konzentration gemessen werden, wurde das Medium der infizierten Zellkultur gewechselt und 24 Stunden später der Überstand zellfrei abgenommen, aliquotiert, bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert und die p24-Konzentration bestimmt.

2.5.2.4 GBV-C/HIV-1-Koinfektionen

Die Infektion erfolgte im 24-Well-Plattenformat. Frisch isolierte PBMC wurden für 2 Tage mit IL-2 (10 U/ml) und PHA (10 mg/ml) inkubiert. Zelllinien wurden 24 Stunden vor der GBV-C-Infektion passagiert. 2×10^6 primäre Lymphozyten oder 2×10^5 immortalisierte Zellen wurden mit GBV-C-positivem Serum (je 2×10^6 GBV-C-Genomäquivalente/ 1×10^6 Zellen) versetzt und mit dem jeweiligen Komplettmedium auf 500 µl aufgefüllt. Die weiteren Schritte wurden wie unter 2.5.2.2 beschrieben durchgeführt. Nach 48 Stunden erfolgte die Infektion mit HIV-1. Dafür wurde der Überstand der GBV-C-infizierten Zellen abgenommen und über die Dauer der HIV-1-Infektion bei 4 °C aufbewahrt. Die Koinfektion der Zellen erfolgte für 3 Stunden in einem Volumen von 500 µl im Brutschrank (37 °C) mit HIV-1. Die HIV-1-Infektionsdosis wurde dabei mittels des p24-Antigens normalisiert (25 ng p24 für CCR5-trope und 0,5 ng p24 für CXCR4-trope HIV-1-Isolate/ 1×10^6 Zellen). Nach der HIV-1-Koinfektion wurden die Zellen

mit PBS gewaschen, im vorher abgenommenen Kulturmedium resuspendiert und für bis zu 2 Wochen kultiviert. Die Quantifizierung der Replikation von HIV-1 erfolgte anhand der p24-Konzentration im Überstand der infizierten Kulturen. Die Inhibition der HIV-1-Replikation durch GBV-C wurde in Relation zu nicht-GBV-C-infizierten Kontrollkulturen bestimmt. Parallel zum Versuchsablauf wurden die Zellen regelmäßig mikroskopisch begutachtet (Abbildung 2.3).

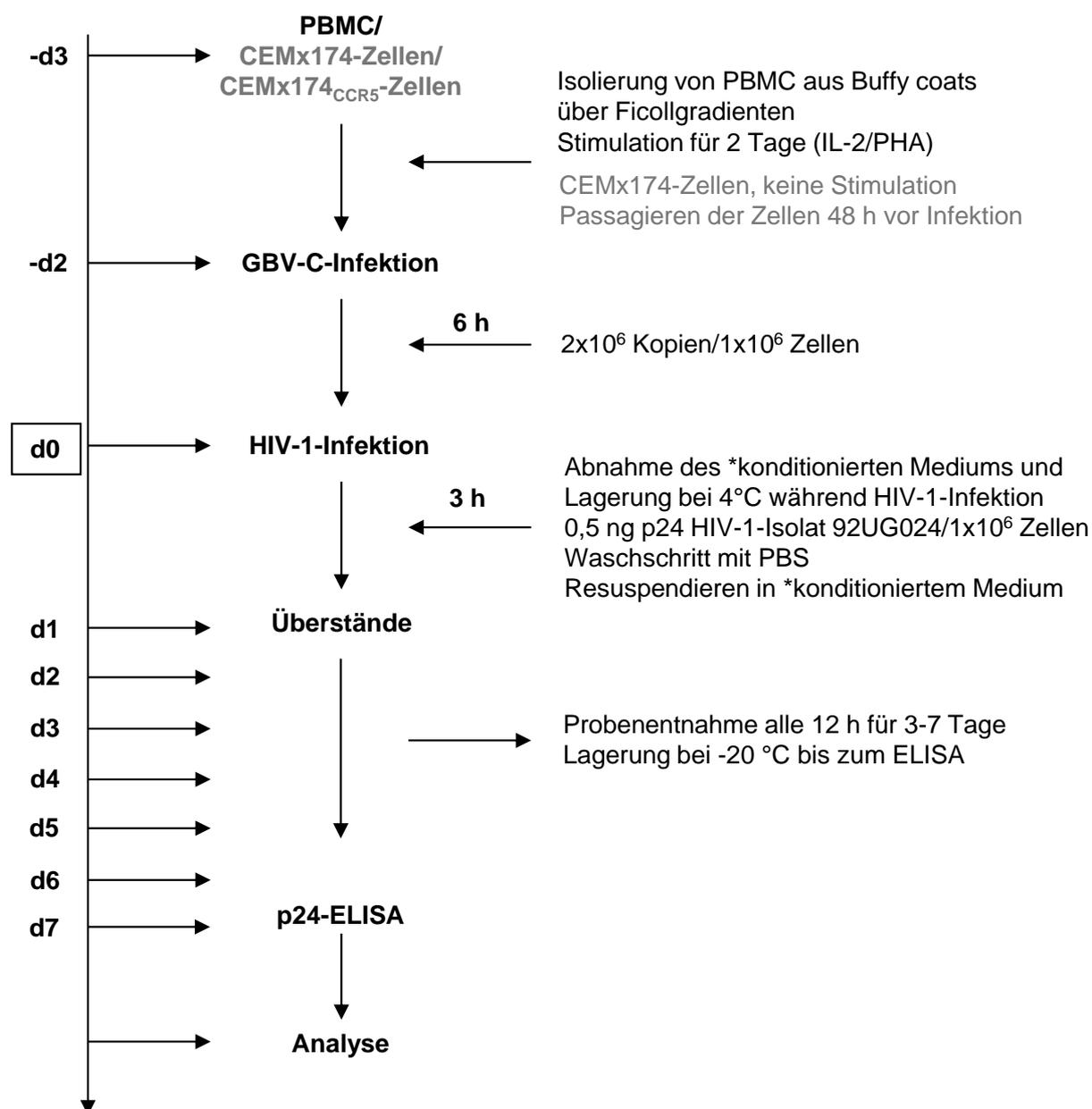


Abbildung 2.3: Durchführung der Koinfektionsexperimente.

2.5.2.5 HIV-1-Infektion GBV-C-E2-stimulierter Zellen

In Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Universität Barcelona wurden 124 synthetische 18mer Peptide mit einem Überlapp von 3 Aminosäuren, die das gesamte GBV-

C-E2-Protein des GBV-C-Isolats HGU45966 umfassen, synthetisiert. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit HIV-1-Infektionsassays etabliert und in diesen die Peptide auf ihre HIV-1-inhibitorische Eigenschaft untersucht.

Hierfür wurden pro Ansatz $7,5 \times 10^4$ CEMx174-Zellen, $500 \mu\text{M}$ des entsprechenden Peptids und $0,5 \text{ ng}/1 \times 10^6$ Zellen p24 des CXCR4-tropen HIV-1-Isolat 92UG024 (MOI 0,008) verwendet (48-Well-Platte). Zur Optimierung des Versuchsablaufs wurden verschiedene Inkubations-/Infektionsprotokolle getestet (Abbildung 2.4).

Dafür wurden entweder die Zellen (Setup 1 und 3) oder HIV-1-Viruspartikel (Setup 2 und 4) jeweils mit einem hemmenden und einem nichthemmenden E2-Peptid, dem HIV-1-inhibitorischen Peptid C34 und den entsprechenden Kontrollen (Peptidlösungsmittel, unbehandelte Zellen, HIV-1-Kontrolle) für 1,5 Stunden im Brutschrank ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) vorinkubiert. Anschließend wurden die mit Peptid vorinkubierten Viren mit den Zellen gemischt oder die mit Peptid vorinkubierten Zellen mit HIV-1 infiziert. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und für mindestens 7 Tage im Brutschrank ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) kultiviert. In Setup 3 und 4 wurde dem Kulturmedium zusätzlich frisches Peptid zugesetzt. Die Konzentration des Peptids entsprach dabei der im Experiment verwendeten Menge. Ergänzend zur Quantifizierung der p24-Konzentration im Überstand wurde die Anzahl vitaler Zellen durch Trypanblaufärbung bestimmt und der zytopathische Effekt dokumentiert (Abbildung 2.4).

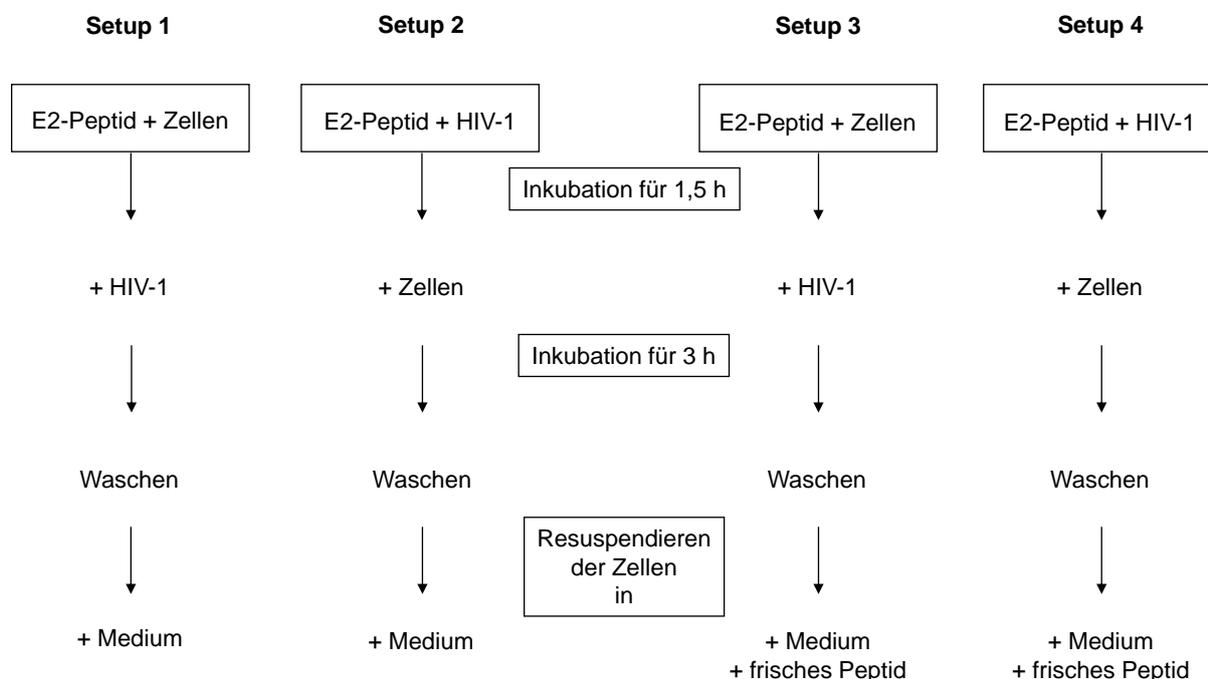


Abbildung 2.4: Test diverser Versuchsabläufe für die Untersuchung von E2-Peptiden in CEMx174-Zellen.

Aus den Ergebnissen der Vorversuche ergab sich die für die Untersuchung der 124 Peptide verwendete Versuchsdurchführung, die in Abbildung 2.5 dargestellt ist. Die Peptide wurden

in DMSO gelöst und im entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt. Zur Bestimmung der toxischen Wirkung der Peptide wurden am Tag 6 nach Infektion (n.I.) Zellen entnommen und die Vitalzellzahl bestimmt. Zudem erfolgte die Dokumentation der Synzytienbildung mittels Lichtmikroskopie. Die p24-Konzentration der Kulturüberstände wurde mit Hilfe des ELISA bestimmt.

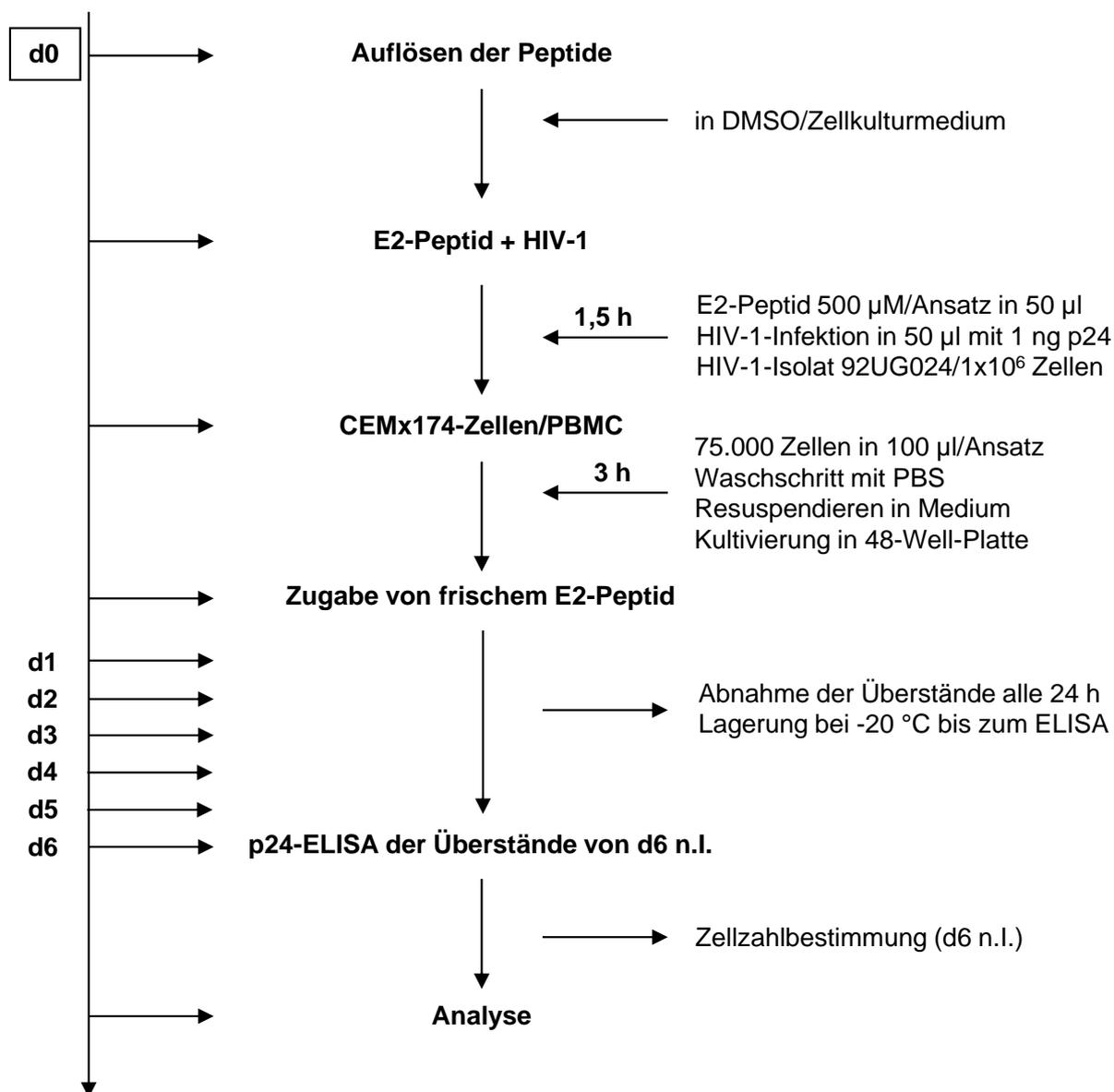


Abbildung 2.5: Darstellung des Versuchsaufbaus zum Testen von 124 E2-Peptiden.

2.5.2.6 IC₅₀

Zur Bestimmung der Peptidkonzentration, bei der die HIV-1-Replikation um die Hälfte reduziert wird (inhibitory concentration 50, IC₅₀), wurden HIV-1-Viruspartikel mit unterschiedlichen E2-Peptidkonzentrationen vorinkubiert und anschließend für die Infektion von CEMx174-Zellen verwendet. Die HIV-1-Replikation wurde mittels der p24-Antigenkonzentration im Kulturüberstand quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der Software

GraphPad Prism. Es wurden die p24-Konzentrationen in Relation zu den eingesetzten Peptidmengen graphisch abgebildet und der Graphik die Konzentration mit einer HIV-1-Inhibition von 50 % entnommen.

2.5.2.7 Dokumentation der Synzytienbildung infolge der HIV-1-Infektion

Um HIV-1-Infektionsverläufe und Synzytienbildung zu dokumentieren, wurden die entsprechenden Suspensionszellen in der Zellkulturplatte zentrifugiert (1.000 rpm/5 min; Rotina 46 RS Hettich Zentrifugen, Tuttlingen/D), zweimal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert (Inkubation 15 min). Die Kulturen wurden unter dem Lichtmikroskop (Mikroskopsystem Eclipse TE-2000, Nikon Instruments Europe, Düsseldorf/D), einer Kamera (Hamamatsu, Photonics GmbH, Herrsching am Ammersee/D) und der Analysesoftware Wasabi ausgewertet.

2.5.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Kalzium-Phosphat-Transfektion von eukaryotischen Zellen (HeLa, Huh-7, 293T) mit aufgereinigter Plasmid-DNA wurden 4×10^5 Zellen pro Kavität (6-Well-Platte) oder 1×10^5 Zellen pro Kavität (12-Well-Platte) ausgesät. Am folgenden Tag wurde 3 Stunden vor der Transfektion das Kulturmedium gewechselt (Zellrasen zu 70-80 % konfluent). Die zu transfizierende DNA wurde auf eine Konzentration von 5 µg bzw. 1,6 µg pro 20 µl eingestellt und mit 175 bzw. 58,3 µl CaCl_2 -Lösung gemischt. Anschließend wurde die DNA-Kalzium-Lösung tropfenweise mit dem gleichen Volumen an 2x Phosphatpuffer versetzt und für 11 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde anschließend gleichmäßig auf die Zellen getropft, die Bildung von DNA-Präzipitaten im Lichtmikroskop kontrolliert und die Zellen im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und 48 Stunden nach Transfektion die Analyse der Proteinexpression.

2.6 STUDIENKOLLEKTIVE

2.6.1 Leipziger Blutspenderkohorte

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Leipzig wurden Blutproben von 1535 zufällig ausgewählten Blutspendern ohne bekannte HIV-1-, HBV- oder HCV-Infektion untersucht (2006/2007). Ein Einverständnis der Probanden lag vor. Das Serum wurde durch Zentrifugation (3.000 rpm/15 min/4 °C) gewonnen und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Da angenommen wurde, dass dieses Studienkollektiv nur eine geringe GBV-C- Prävalenz aufweist, wurden für die Analyse jeweils 10 Einzelproben gemischt, als Pool extrahiert und auf das Vorhandensein von GBV-C-RNA getestet. Je Einzelprobe wurden 100 µl in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und gründlich gemischt. RNA-Extraktion und Quantifizierung der Viruslast erfolgte wie unter 2.1 beschrieben. Wurde

ein Pool positiv für GBV-C-RNA getestet, so wurden die entsprechenden Einzelproben separat extrahiert und analysiert. Für den Aufbau der GBV-C-Serumbank wurde das Plasma des GBV-C-positiven Blutspenders aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Leipziger/Erlangener-HIV-1-Kohorte

In Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Retroviren am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen und zwei Schwerpunktpraxen in Leipzig und Nürnberg wurden 324 anonymisierte, HIV-1-positive Spender unter Einhaltung des Datenschutzes auf GBV-C-Marker untersucht (2004-2008). Vollblut und Serum wurden innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet und Plasma und Serum bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aliquotiert gelagert. Da dieses Studienkollektiv ein höheres Transmissionsrisiko für blutübertragene Pathogene aufweist, wurden die Proben individuell und nicht als Pool extrahiert und analysiert.

2.6.3 Multizentrische, prospektive Kohortenstudie zum natürlichen Verlauf der Hepatitis-C-Virusinfektion Genotyp 1b (Anti-D-Studie)

Zwischen August 1978 und März 1979 wurden 2867 Frauen auf dem Gebiet der ehemaligen DDR im Rahmen der Anti-D-Rhesusprophylaxe mit 14 GBV-C/HCV-kontaminierten Chargen desselben Spenders behandelt und zum Teil mit HCV Genotyp 1b und GBV-C infiziert. In einer Langzeitstudie wurde der natürliche Infektionsverlauf der chronisch HCV-erkrankten aber auch der nicht erkrankten Patientinnen über einen Zeitraum von 30 Jahren untersucht. Im Rahmen des intensiven Monitorings der Studienteilnehmer wurde auch die GBV-C-Prävalenz in dieser Kohorte untersucht. Aus dem Serum von 306 Patientinnen (Abnahmezeitraum 2006-2009) wurde virale RNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf GBV-C-RNA getestet. Neben der Amplifikation eines RNA-Fragments aus der 5'-NTR wurde zur Verifizierung der Ergebnisse auch ein Sequenzabschnitt im Bereich des NS5A-Gens amplifiziert. Zusätzlich wurden die positiv getesteten sowie 40 zufällig ausgewählte negative Anti-D-Proben in einer weiteren PCR, die einen Sequenzabschnitt im NS3-Genbereich nachweist, getestet. Zusätzlich wurden die Patientenproben auf das Vorliegen von Anti-GBV-C-E2-Antikörpern mittels ELISA untersucht. Ergänzend zum Nachweis von GBV-C-RNA und GBV-C-spezifischen Antikörpern wurde das Auftreten einer GBV-C-Infektion in Abhängigkeit von bestimmten genetischen Prädispositionen (*IL28B*, *CCR5*-Genotyp), Grunderkrankungen und Risikofaktoren statistisch analysiert. Zudem wurden die GBV-C-Isolate im Bereich ihres Oberflächenproteins E2 durch Dr. Sergej Viazov (Universitätsklinikum Essen) sequenziert, um so Hinweise auf das Inokulum in der kontaminierten Anti-D-Charge zu erlangen.

Darüber hinaus wurde der HCV-Status zum Zeitpunkt des GBV-C-Nachweises bestimmt und der Therapiestatus dokumentiert. Hierbei handelte es sich um eine

Kombinationstherapie aus Interferon(IFN)-alpha bzw. pegyliertem IFN-alpha und Ribavirin oder einer Monotherapie mit IFN-alpha oder pegyliertem IFN-alpha. Eine Unterscheidung zwischen den tatsächlich angewandten Therapien wurde nicht getroffen. Zu fünf Patientinnen fehlten klinische Daten, sodass von diesen lediglich der GBV-C-Status bestimmt werden konnte. In den weiteren Analysen wurden sie nicht berücksichtigt. Die für die Untersuchungen erforderlichen Einverständniserklärungen der Patienten sowie ein Ethikvotum der Universität Leipzig für die Anti-D-Studie liegen vor.

2.6.4 Hemophilia Growth and Development Studie (HGDS)

Die 1989/1990 in den USA initiierte multizentrische Studie schloss 333 hämophile, HCV-infizierte und zum Teil HIV-1-infizierte Kinder und Jugendliche im Alter von 6-19 Jahren ein. Sie entsprach den Vorschriften der jeweiligen Ethikkommission. Bei Studienbeginn und nachfolgend alle 6 Monate wurden über einen Zeitraum von 7 Jahren Blutproben entnommen. Die Arbeitsgruppe von Daar [²⁰⁰et al. 2001] bestimmte aus den Blutproben unter anderem die Anzahl der CD4-T-Zellen sowie die Viruslast für HIV-1 und HCV. Die Behandlung der HIV-1-Erkrankung erfolgte vor der HAART-Ära mittels ART. Eine Behandlung der HCV-Infektion fand nicht statt [²⁰¹Soogoor et al. 2006]. Die Übertragung von HCV und/oder HIV-1 erfolgte zwischen 1982 und 1983 durch die Verabreichung von vor 1985 nicht hitzeinaktivierten Gerinnungsfaktoren [²⁰²Loveland et al. 1994, ²⁰⁰Daar et al. 2001].

Der Analyseplan wurde gemeinschaftlich durch Solveig Tenckhoff, Hans L. Tillmann (Universität Leipzig, Duke University, Durham, NC/USA), Eric Daar (Los Angeles Biomedical Research Institute at Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA/USA), Sharyne Donfield, Alice Lail und Erika Menius (Rho, Chapel Hill/USA) erstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden Serumproben auf GBV-C-RNA untersucht, die im Rahmen der halbjährlichen Blutentnahmen im Studienverlauf gewonnen und konserviert worden waren. Dabei wurden pro Patient jeweils eine noch verfügbare Blutprobe möglichst zeitnah zum Studienbeginn und eine zum Untersuchungsende ausgewählt. Bei den HIV-1-positiven Studienteilnehmern wurden 202 Proben für den ersten und 191 für den zweiten Messzeitpunkt, in der Gruppe der HIV-1-negativen Studienteilnehmer 119 Proben des ersten und 114 des zweiten Messzeitpunkts auf GBV-C-RNA getestet. Die statistische Auswertung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Sharyne Donfield, Erika Menius und Alice Lail. Abbildung 2.6 fasst den Studienablauf zusammen.

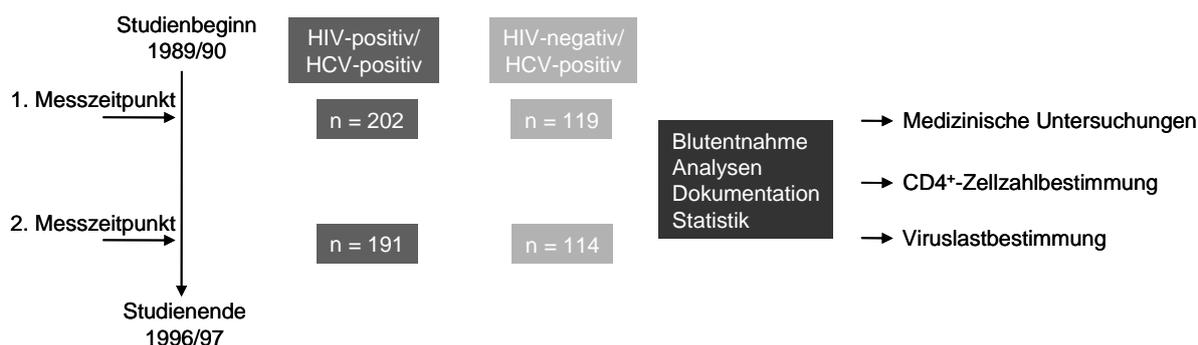


Abbildung 2.6: Studiendurchführung.

2.7 STATISTISCHE ANALYSEN

Statistische Analysen in dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Hilfe von GraphPad Prism bzw. SPSS durchgeführt. In den graphischen Darstellungen sind Mittelwerte mit dem Standardfehler abgebildet. Davon abweichende Darstellungen sind entsprechend gekennzeichnet. Häufigkeiten für Virämie bzw. Virusexposition in den Studienkohorten sind in Prozent dargestellt; ggf. sind die Konfidenzintervalle mit Odds Ratio angegeben. Zur Auswertung von Unterschieden bezüglich der Häufigkeiten für das Auftreten virusspezifischer Marker in den verschiedenen Studienkollektiven sowie für die HCV-Ausheilungsrate und antivirale Therapie in der Anti-D- und HGD-Studie wurde der Fishers-Exakt-Test verwendet. Alle anderen Analysen im Rahmen der HGD-Studie wurden durch die Kooperationsgruppe vom Rho-Institut, Los Angeles, USA vorgenommen. Für Unterschiede zwischen GBV-C-RNA-positiv und -negativ wurde der Studien-t-Test verwendet (für Alter, CD4-T-Zellzahl, Viruslasten). Für die Analyse der Zeitspanne bis zur Progression zu AIDS oder AIDS-induziertem Tod wurden Kaplan-Meier-Kurven und Cox-Regressionsmodelle mit Hazard Ratio erstellt. Die Auswertung der Viruslasten und die Berechnung statistischer Parameter für In-vitro-Versuche erfolgten unter Verwendung des Student-t-Tests bzw. des ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests.

3. MATERIAL

3.1 OLIGONUKLEOTIDE

Primer wurden von TibMolbiol (Berlin/D) oder BioTez (Berlin/D), Sonden von TibMolbiol bezogen. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Oligonukleotide zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Oligonukleotide.

Forward- und Reverse-Oligonukleotidprimer sind entsprechend der Nukleotidsequenz des jeweiligen Gens benannt. Die Positionen, an denen die Primer für den Nachweis verschiedener GBV-C-Genregionen an das GBV-C-Referenzisolat AF121950 binden, sind für jeden Primer angegeben. Die Unterstreichungen kennzeichnen die Enzymschnittstellen.

Name	Sequenz (5'-3'-Orientierung)	Bemerkung
G4_fwd _{nt148}	AATCCCGGTCAICYTGGTAGCCACT	5'-NTR Quantifizierung GBV-C-RNA
G3_rev _{nt403}	CCCCACTGGTCTYTTGYCAACTC	
GBV-C-Sonde	6FAM-AATAAGGGCCCCGACGTCAGGCTCXT--PH	
NS3_outer-rev _{nt4446}	TCYTTGATGATDGAAGTCTGTC	NS3-Genregion GBV-C-Nachweis
NS3_inner-rev _{nt4428}	TCYTTACCCCTRTAATAGGC	
NS3_fwd _{nt4286}	TATGGGCATGGHATHCCYCT	
NS5A-IFN_fwd _{nt6579}	TCDGCGWGCTGTDGCTGAGCCCTA	NS5A-Genregion GBV-C-Nachweis Sequenzierung
NS5A-IFN_rev _{nt6868}	TCRAGAATYCTCGCAGCATTCTC	
NS5A-IFN_fwd _{nt6583}	CWGCTGTDGCTGAGCCCTAYTA	
E2_rev _{nt969}	AGTGAGTTTTGGAGATGGA	E2-Genregion GBV-C-Nachweis Sequenzierung
E2_fwd _{nt2238}	CTCHGCCAGCTTCATCAGVTA	
IRES_fwd _{nt46}	CCABAAACCGACGCCTATYT	IRES-Lang
IRES_rev _{nt752}	CTGATACAGTGGCCAGCA	
IRES_rev_EcoRI _{nt46}	GCGAATTCCABAAACCGCGCCTATYT	IRES-Lang
IRES_rev_EcoRI _{nt752}	CTGATACAGTGGCCAGCAGAATTCCG	
IRES_rev-new_EcoRI _{nt627}	CGGAATTCTCGACAAGCGTGGGTGGCC	IRES-Kurz
IRESneo_fwd_EcoRI	GTAGAATTCATCTAGGGCGGCCAATTCCG	EMCV-IRES
IRESneo_rev_EcoRI	GACGAATTCCTTGTGGCAAGCTTATCATCG	
RLuc_fwd	TGATAACTGGTCCGCAGTGG	Renillaluziferase- nachweis
RLuc_rev	CCTGGGTCCGATTCATAAAC	
RLuc_fwd_sequ	TCGTTGAGCGAGTTCTCAA	Sequenzierung
FLuc_rev_sequ	ACCCCTTTTTGGAAACGA	Sequenzierung
HCV_fwd RC1	GTCTAGCCATGGCGTTAGTA	HCV-Nachweis
HCV_rev RC21	CTCCCGGGGCACTCGCAAGC	
GAPDH_fwd	GAGTCAACGGATTTGGTCTGT	Referenzgen
GAPDH_rev	TGGAAGATGGTGTATGGGATT	

RLuc: Renillaluziferase, FLuc: Fireflyluziferase, X: Base A, C, G oder T, Y: Base C oder T.

3.2 PLASMIDE

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren aufgeführt. Übersichtskarten aller Plasmide sind der Anlage zu entnehmen.

pcDNA3.1/V5-His TOPO TA (#480001, Invitrogen, Groningen/D)

pIRESneo (#6060-1, Clontech, Mountain View, CA/USA)

pEGFP-F (#6074-1, Clontech, Mountain View, CA/USA)

DCV und DCV-IRES-Vektoren

Dieser Doppelluziferasevektor (DCV) wurde von Forton et al. [2003] kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der Vektor basiert auf dem pRL-SV40 von Promega (Mannheim/D). Er enthält bereits eine Renillaluziferasegen, das unter Kontrolle des SV40-Promotors steht. Dahinter befindet sich die MCS, die unter anderem eine EcoRI-Schnittstelle aufweist. Nach der MCS folgt das Fireflyluziferasegen. Als Selektionsmarker dient ein Ampicillinresistenzgen.

In den Vektor wurde über die EcoRI-Schnittstelle die jeweiligen GBV-C-IRES bzw. die EMCV-IRES eingefügt (siehe 2.2.8).

3.3 PEPTIDE

Aminosäuresequenz des E2-Proteins (U45966)

APASVLGSRPFDYGLTWQSCSCRANGSRYTTGEKVVDRGNVTLLCDCPNGPWVWLPAFCQAIGW
GDPITHWSHGQNRWPLSCPQYVYGSVSVTCVWGSVSWFASTGGRDSKIDVWVSLVPVGSASCTIAAL
GSSDRDVTVELSEWGVPCATCILDRRPASCCTCVRDCWPETGSRVRFPHRCGAGPKLTKDLEAVPF
VNRTPFTIRGPLGNQGRGNPVRSPPLGFGSYAMTKIRDSLHLVKCPTPAIEPPTGTFGFFPGVPLNN
CLLLGTEVSEALGGAGLTGGFYEPLVRRRSELMGRRNPVCPGFAWLSSGRPDGFIHVQGHLEQVDA
GNFIPPPRWLLLDVFLVLLYLMKLAEARLVPLLLLLWWWVNLAVLGLPAVDAVA

Tabelle 3.2: Sequenzen der 124 18mer E2-Peptide [198Herrera et al. 2010].

E2 Peptid GBV-C	Sequenz	E2 Peptid GBV-C	Sequenz
P1	APASVLGSRPFDYGLTWQ	P63	LTKDLEAVPFVNRTPFT
P2	SVLGSRPFDYGLTWQSCS	P64	DLEAVPFVNRTPFTIRG
P3	GSRPFDYGLTWQSCSRA	P65	AVPFVNRTPFTIRGPLG
P4	PFDYGLTWQSCSCRANGS	P66	FVNRTPFTIRGPLGNQG
P5	YGLTWQSCSCRANGSRYT	P67	RTPFTIRGPLGNQGRGN
P6	TWQSCSCRANGSRYTGE	P68	PFTIRGPLGNQGRGNPVR
P7	SCSCRANGSRYTTGEKVV	P69	IRGPLGNQGRGNPVRSP
P8	CRANGSRYTTGEKVWDRG	P70	PLGNQGRGNPVRSPGFG
P9	NGSRYTTGEKVWDRGNVT	P71	NQGRGNPVRSPGFGSYA
P10	RYTTGEKVWDRGNVTLLC	P72	RGNPVRSPGFGSYAMTK
P11	TGEKVWDRGNVTLLCDCP	P73	PVRSPGFGSYAMTKIRD

E2 Peptid GBV-C	Sequenz	E2 Peptid GBV-C	Sequenz
P12	KVWDRGNVTLCCDCPNNGP	P74	SPLGFSGYAMTKIRDLSLH
P13	DRGNVTLCCDCPNGPVWV	P75	GFGSYAMTKIRDLSLHLVK
P14	NVTLCCDCPNGPVWVWLP	P76	SYAMTKIRDLSLHLVKCPT
P15	LLCCDCPNGPVWVWLPFCQ	P77	MTKIRDLSLHLVKCPTPAI
P16	DCPNGPVWVWLPFCQAIG	P78	IRDLSLHLVKCPTPAIEPP
P17	NGPVWVWLPFCQAIGWGD	P79	SLHLVKCPTPAIEPPTGT
P18	WVWLPFCQAIGWGDPIIT	P80	LVKCPTPAIEPPTGTGFGF
P19	LPAFCQAIGWGDPIITHWS	P81	CPTPAIEPPTGTGFFFPG
P20	FCQAIGWGDPIITHWSHGQ	P82	PAIEPPTGTGFFFPGVPP
P21	AIGWGDPIITHWSHGQNRW	P83	EPPTGTGFFFPGVPLNN
P22	WGDPIITHWSHGQNRWPLS	P84	TGTGFFFPGVPLNNCLL
P23	PITHWSHGQNRWPLSACPQ	P85	FGFFFPGVPLNNCLLLGT
P24	HWSHGQNRWPLSACPQYVY	P86	FGVPPLNNCLLLGTEVS
P25	HGQNRWPLSACPQYVYGSV	P87	VPPLNNCLLLGTEVSEAL
P26	NRWPLSACPQYVYGSVSVT	P88	LNCLLLGTEVSEALGGA
P27	PLSACPQYVYGSVSVTCVW	P89	CLLLGTEVSEALGGAGLT
P28	CPQYVYGSVSVTCVWGSV	P90	LGTEVSEALGGAGLTGGF
P29	YVYGSVSVTCVWGSVSWF	P91	EVSEALGGAGLTGGFYEP
P30	GSVSVTCVWGSVSWFAST	P92	EALGGAGLTGGFYEPVLR
P31	SVTCVWGSVSWFASTGGR	P93	GGAGLTGGFYEPVLRRRS
P32	CVWGSVSWFASTGGRDSK	P94	GLTGGFYEPVLRRRSELM
P33	GSVSWFASTGGRDSKIDV	P95	GGFYEPVLRRRSELMGRR
P34	SWFASTGGRDSKIDVWVSL	P96	YEPVLRRRSELMGRRNPV
P35	ASTGGRDSKIDVWVSLVPV	P97	LVRRRSELMGRRNPVCPG
P36	GGRDSKIDVWVSLVPVGS	P98	RRSELMGRRNPVCPGFAW
P37	DSKIDVWVSLVPVGSASCT	P99	ELMGRRNPVCPGFAWLSS
P38	IDVWVSLVPVGSASCTIAA	P100	GRRNPVCPGFAWLSSGRP
P39	WVSLVPVGSASCTIAALGS	P101	NPVCPGFAWLSSGRPDPGF
P40	VPVGSASCTIAALGSSDR	P102	CPGFAWLSSGRPDPGFIVH
P41	GSASCTIAALGSSDRDRTV	P103	FAWLSSGRPDPGFIVHQGH
P42	SCTIAALGSSDRDRTVVEL	P104	LSSGRPDPGFIVHQGHLQE
P43	IAALGSSDRDRTVVELSEW	P105	GRDPGFIVHQGHLQEVDA
P44	LGSSDRDRTVVELSEWVGP	P106	DGFIVHQGHLQEVDAAGNF
P45	SDRDRTVVELSEWVPCAT	P107	IHQGHLQEVDAAGNFIPP
P46	DTVVELSEWVPCATCIL	P108	QGHQEVDAAGNFIPPRW
P47	VELSEWVPCATCILDRR	P109	LQEVDAAGNFIPPRWLLL
P48	SEWVPCATCILDRRPAS	P100	VDAGNFIPPRWLLDFV
P49	GVPCATCILDRRPASCCT	P111	GNFIPPRWLLDFVFLV
P50	CATCILDRRPASCCTCVR	P112	IPPRWLLDFVFLVLLYL
P51	CILDRRPASCCTCVRDCW	P113	PRWLLDFVFLVLLYLMKL
P52	DRRPASCCTCVRDCWPET	P114	LLDFVFLVLLYLMKLAEA
P53	PASCCTCVRDCWPETGSV	P115	DFVFLVLLYLMKLAEARLV
P54	CGTCVRDCWPETGSVRF	P116	FVLLYLMKLAEARLVPLI
P55	CVRDCWPETGSVRFPFHR	P117	LYLMKLAEARLVPLILLL
P56	DCWPETGSVRFPFHRCGA	P118	MKLAEARLVPLILLLLWV
P57	PETGSVRFPFHRCGAGPK	P119	AEARLVPLILLLLWVWN
P58	GSVRFPFHRCGAGPKLTK	P120	RLVPLILLLLWVWNQLA
P59	RFPFHRCGAGPKLTKDLE	P121	PLILLLLWVWNQLAVLG
P60	FHRCGAGPKLTKDLEAVP	P122	LLLLWVWNQLAVLGLPA
P61	CGAGPKLTKDLEAVPFVN	P123	LWWWVWNQLAVLGLPAVDA
P62	GPKLTKDLEAVPFVNRTT	P124	WVNQLAVLGLPAVDAAVA

C34: WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL American Peptide Company
(308187, Sunnyvale, CA/USA)

3.4 ENZYME UND KITS

Kit/Enzym	Hersteller
GeneAmp® XL PCR Kit	Applied Biosystems, Darmstadt/D
GeneAmp® / AmpliTaq® DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt/D
GoTaq® Green Master Mix	Promega, Mannheim/D
QuantiFast® Multiplex RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden/D
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D
High Pure Viral RNA Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Roche Diagnostics, Mannheim/D
INNOTEST™ HIVAntigen mAb	Innogenetics, Gent/B
LightCycler® RNA Amplification Kit HybProbe	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Renilla Luciferase Assay System	Promega, Mannheim/D
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim/D
Venor GeM Mycoplasma PCR Detection Kit	minerva biolabs, Berlin/D
NucleoSpin® RNA Virus	Machery&Nagel, Düren/D
NucleoSpin Plasmid QuickPure	Macherei-Nagel, Düren/D
Phusion High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs, Frankfurt a.M./D
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Leon-Roth/D
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden/D
pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® Expression Kit	Invitrogen, Groningen/D
RNaseOut™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Groningen/D
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep	Invitrogen, Groningen/D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden/D
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden/D
QIAmp Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden/D
TOPO TA Cloning Kit with One Shot TOP10 <i>E. coli</i>	Invitrogen, Groningen/D
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching/A
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	HiSS Diagnostics GmbH, Freiburg/D

Alle Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (Leon-Roth/D), die alkalische Phosphatase sowie die T4-DNA-Ligase von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M./D) bezogen.

3.5 VERBRAUCHSMATERIAL

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Anbieter
Cellstar® TC-Flask, Filter cap; 25 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Flask, Filter cap; 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Flask, Filter cap; 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Plate; 6 well	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Plate; 12 well	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Plate; 24 well	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® TC-Plate; 96 well round bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Zellkultur Testplatte 96F	TPP, Trasadingen/CH
Zellkulturplatte; 96 well, white	Nunc, Wiesbaden/D
Zellschaber	TPP, Trasadingen/CH
Combitip plus; 1,0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
Combitip plus; 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg/D
Combitip plus; 5 ml	Eppendorf, Hamburg/D
Kryoröhrchen; 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden/D
Küvetten Uvette® 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg/D
Biosphere Filter Tip 10 µl weiß	Sarstedt, Nümbrecht/D
Biosphere Filter Tip 100 µl gelb	Sarstedt, Nümbrecht/D
Biosphere Filter Tip 1000 µl blau	Sarstedt, Nümbrecht/D
epT.I.P.S. Filter 0,1-10 µl S	Eppendorf, Hamburg/D
Filtertip Gilson Style 10 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Filtertip Gilson Style 100 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Filtertip Gilson Style 200 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Filtertip Gilson Style 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Pipettenspitze, 10 µl, Gilson, weiß	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Pipettenspitze, 200 µl, gelb	Sarstedt, Nümbrecht/D
Pipettenspitze, 1000 µl, blau	Sarstedt, Nümbrecht/D
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe/D
PP-PCR-Platte, 96 well	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
PCR Abdeckfolie	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
PCR SOFTSTRIPS 0,2 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf/D
LightCycler Kapillaren 20 µl	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Petrischalen für Bakteriologie	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig/D
Serologische Pipette, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
Serologische Pipette, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
Serologische Pipette, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
Eppendorfgefäß; Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg/D
Eppendorfgefäß; Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg/D

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Anbieter
Eppendorfgefäß; Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml PP	Sarstedt, Nümbrecht/D
Cellstar® PP-Test tubes; 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
Cellstar® PP-Test tubes; 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
14 ml PP Tube	Greiner Bio-One, Frickenhausen/D
ImpfSchlinge 10 µl blau	Sarstedt, Nümbrecht/D
Spritzenfilter, 0,2 µm	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig/D
Syringe, 20 ml	Becton Dickenson, Heidelberg/D

3.6 CHEMIKALIEN

Chemikalie	Hersteller/Anbieter
Agar	Carl Roth, Karlsruhe/D
Agarose	Serva, Heidelberg/D
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe/D
Bromphenolblau	Riedel-de Haen, Hannover/D
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA, Pasching/A
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe/D
dNTP-Solution (premixed jedes 2,5 mM)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf/D
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
Ethanol	J.T.Baker, Deventer/NL
Ethidumbromid 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin/D
GeneRuler 1 kb DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Roth/D
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Roth/D
Glucose	Serva, Heidelberg/D
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin/D
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe/D
Hefeextrakt	Carl-Roth, Karlsruhe/D
Interleukin 2	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Isopropanol	J.T.Baker, Deventer/NL
LSM 1077 Lymphocyte	PAA, Pasching/A
Natriumchlorid	Fluka, Buchs/CH
Natriumpyruvat Pyruvic acid Na-salt	Serva, Heidelberg/D
Magnesiumchlorid 6 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe/D
Magnesiumsulfat (dried)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe/D
MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
Panserin 401	PAN Biotech, Aidenbach/D

Chemikalie	Hersteller/Anbieter
Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim/D
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching/A
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe/D
Phytohaemagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
RNaseOUT™ rRibonuclease Inhibitor	Invitrogen, Groningen/D
RPMI 1640	PAA, Pasching/A
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Serva, Heidelberg/D
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D
Schwefelsäure 95-97 %	Riedel-De Haen AG, Hannover/D
TRIS Sigma 7-9	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/D

3.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

Folgende in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen standen nicht als Standardlösungen zur Verfügung:

Ampicillin:

1 g Ampicillin in 10 ml Aqua iniectionabilia lösen, sterilfiltrieren (0,22 µm), zu je 500 µl aliquotieren, bei -20 °C lagern. Konzentration: 100 mg/ml.

DNA-Probenpuffer:

4 g Sucrose, 400 µl 0,5 mM EDTA-Lösung pH 8,0, 500 µl 10 % SDS, 0,005 g Bromphenolblau auf 10 ml Aqua dest.

Kalzium-Phosphat-Transfektionslösungen:

Das Transfektionskit wurde vom Virus-Host-Interaction Laboratory, Fraunhofer Institut - Zelltherapie und Immunologie zur Verfügung gestellt.

LB-Agar:

5 g Peptone, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 7,5 g Agar mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, autoklavieren (20 min, 121 °C), im Wasserbad (55 °C) auf weniger als 60 °C abkühlen lassen, mit Antibiotikum versetzen und luftblasenfreie Platten gießen.

Lösung I:

15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, sterilfiltrieren (0,22 µm) und bei 4 °C lagern.

Lösung II:

0,2 N NaOH, 1 % SDS, sterilfiltrieren (0,22 µm).

Lösung III:

3 M K-Acetat, pH 5,5, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

Luria-Bertani-(LB)Medium:

5 g Pepton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und autoklavieren (20 min, 121 °C).

10x MOPS Puffer:

50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 200 mM MOPS, pH 7,0 einstellen.

Natriumpyruvatlösung (50mM):

0,275 g Natriumpyruvat in 50 ml Aqua dest. lösen und über 0,22 µm Spritzenfilter sterilfiltrieren. Bei 4 °C lagern.

1x PBS:

4,775 g PBS mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und autoklavieren.

10x TBE:

108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 (7,3 g EDTA/200 ml Aqua dest./pH mit ca. 2,4 g NaOH-Plätzchen auf 8,0 einstellen) mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.

Tfbl-Puffer:

1,48 g (30 mM) Kalumazetat, 0,05 g (100 mM) RbCl, 0,74 g (25 mM) CaCl₂*2H₂O, 5,0 g (50 mM) McCl₂*4H₂O in 300 ml Aqua dest. lösen mit 10 % Essigsäure auf pH 5,8 einstellen, 75 ml 99 % Glycerin zugegeben mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und sterilfiltrieren (0,22 µm).

TfbII-Puffer:

0,21 g (25 mM) MOPS, 1,10 g (75 mM) CaCl₂*2H₂O, 0,12 g (25 mM) RbCl in 50 ml A. dest. lösen auf pH 6,5 einstellen, 15 ml 99 % Glycerin zugeben, auf 100 ml Aqua dest. auffüllen und sterilfiltrieren (0,22 µm).

SOB-Medium:

10 g Peptone, 2,5 g Hefeextrakt, 0,25 g NaCl auf 500 ml Aqua dest. auffüllen, autoklavieren (20 min, 121 °C), abkühlen lassen. 5 ml steriles MgCl₂ (1 M) und 5 ml steriles MgSO₄ (1 M) zugeben.

SOC-Medium:

1 ml 20 % sterile Glucoselösung (alternativ 0,5 ml 2 M Glucoselösung) mit sterilem SOB-Medium auf 50 ml auffüllen.

3.8 BAKTERIENSTÄMME (*E. COLI*)

DH5alpha	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻ (Invitrogen, Groningen/D).
HB101	F ⁻ thi-1 hsdS20 (r _B ⁻ , m _B ⁻) supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 (Str ^R) xyl-5 mtl-1 (Promega, Mannheim/D).
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15] hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) (Promega, Mannheim/D).
Stbl2	F ⁻ mcrA Δ (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 Δ (lac-proAB) λ ⁻ (Invitrogen, Groningen/D).
SURE	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC: Tn5 uvrC e14- Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15 Tn10] (Agilent, Waldbronn/D).
TOP10	F ⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 mcrA Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galJ galK rpsL (Str ^R) endA1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) nupG (Invitrogen, Groningen/D).
XL1-Blue	lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)] recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 (Agilent, Waldbronn/D).
XL-Gold	TetR Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z_M15 Tn10 (TetR) Amy CamR] (Agilent, Waldbronn/D).

3.9 VIRUSSTÄMME**HIV-1-Isolate**

Die HIV-1-Isolate wurden aus dem Subtyppanel des National Institute of Health (NIH) bezogen. Verwendet wurden in dieser Arbeit das X4-trope Isolat 92UG024 (Subtyp D3) sowie das R5-trope Isolat 92UG026 (Subtyp B).

GBV-C-Isolate

Es wurden klinische GBV-C-Isolate verwendet. Dazu wurde Serum von GBV-C-positiven Freiwilligen gewonnen, in Aliquots portioniert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.10 HUMANE ZELLINIEN

Tabelle 3.3: Verwendete humane Zelllinien mit ihrem Ursprung und dem entsprechenden Kultivierungsmedium.

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierungsmedium
293T	Embryonales Nierenzellkarzinom	DMEM
CEMx174	Hybrid aus T-Lymphoidzelllinie CEM und B-Lymphoblastzelllinie 721.174	RPMI 1640
CEMx174 _{CCR5}	CEMx174-Derivat, Expression des humanen CCR5-Rezeptors	RPMI 1640
HeLa	Zervikales Epithelialkarzinom	DMEM
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	RPMI 1640
Huh-7	Hepatozelluläres Karzinom	DMEM

Komplettmedien beinhalteten, soweit nicht anders bezeichnet, 10 % hitzeinaktiviertes FKS sowie 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml).

PBMC wurden in Komplettmedium aus 60 % Panserin und 40 % RPMI kultiviert. Zur Stimulation der Zellteilung wurden dem Medium IL-2 (10 U/ml) und PHA (10 µg/ml) zugesetzt.

4. ERGEBNISSE

4.1 VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN ZUR EXTRAKTION VIRALER RNA

Für das RNA-Virus GBV-C gibt es wenige Daten über die Viruslast in vivo bzw. in vitro. Daher war es erforderlich, zusätzlich zu einer sensitiven PCR, eine Extraktionsmethode zu wählen, die den Verlust an RNA während der Präparation minimiert. Darüber hinaus ist zum Nachweis selbst geringer Mengen Virus eine schnelle Isolation von RNA aus Zellkulturüberständen, Zellen oder Patientenmaterial ohne Kontamination mit RNasen, DNA oder Fremd-RNA erforderlich. Dazu eignen sich säulenbasierte Extraktionssysteme.

Die Quantifizierung basierte auf der Bestimmung des sogenannten Schwellenwerts (C_t – threshold) im Vergleich zu einem Standard (absolute Quantifizierung) und zu Bezugsproben (relative Quantifizierung). Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde mit den drei untersuchten Systemen jeweils Material aus den gleichen drei Proben aufgearbeitet. Die mit dem System von Roche Diagnostics (High Pure Viral RNA Acid Kit) extrahierten Proben wurden als Referenz verwendet und die Systeme von Qiagen (Viral RNA Mini Kit) und Machery&Nagel (NucleoSpin® RNA Virus) mit diesen verglichen. Zusätzlich zur absoluten Quantifizierung erfolgte ein Vergleich der Effizienz der jeweiligen RNA-Extraktion für jede Probe der Systeme von Qiagen und Machery&Nagel im Vergleich zum Roche-System.

Die detektierten Viruskonzentrationen zeigten, dass die Menge an nachweisbarer RNA zwischen den Systemen und auch untereinander schwankte. Dabei war die grundsätzliche Konzentrationsverteilung zwischen den Proben in der Reihenfolge RNA Probe 2 > RNA Probe 3 > RNA Probe 1 bei allen drei Anbietern gleich. Bezüglich der Ausbeute der einzelnen Systeme stellte sich folgende Reihenfolge dar: Qiagen > Machery&Nagel > Roche. Als Grundlage für die Berechnung der Sensitivität der RNA-Extraktion für die drei Systeme diente die Effizienz dieser PCR. Eine Zu- bzw. Abnahme der RNA-Menge erfolgte pro 3,27 Zyklen um Faktor 10 [²⁰⁴Kaiser 2005]. Basierend darauf ergab sich für die Systeme von Qiagen und Machery&Nagel eine besonders hohe Steigerung der Effizienz vor allem im Bereich niedrigerer RNA-Konzentrationen gegenüber dem System von Roche. Dabei schnitt Qiagen (bis Faktor 11) besser ab als Machery&Nagel (maximal Faktor 6,4). Abbildung 4.1 stellt die Auswertung der Lightcycler-basierten PCR graphisch dar.

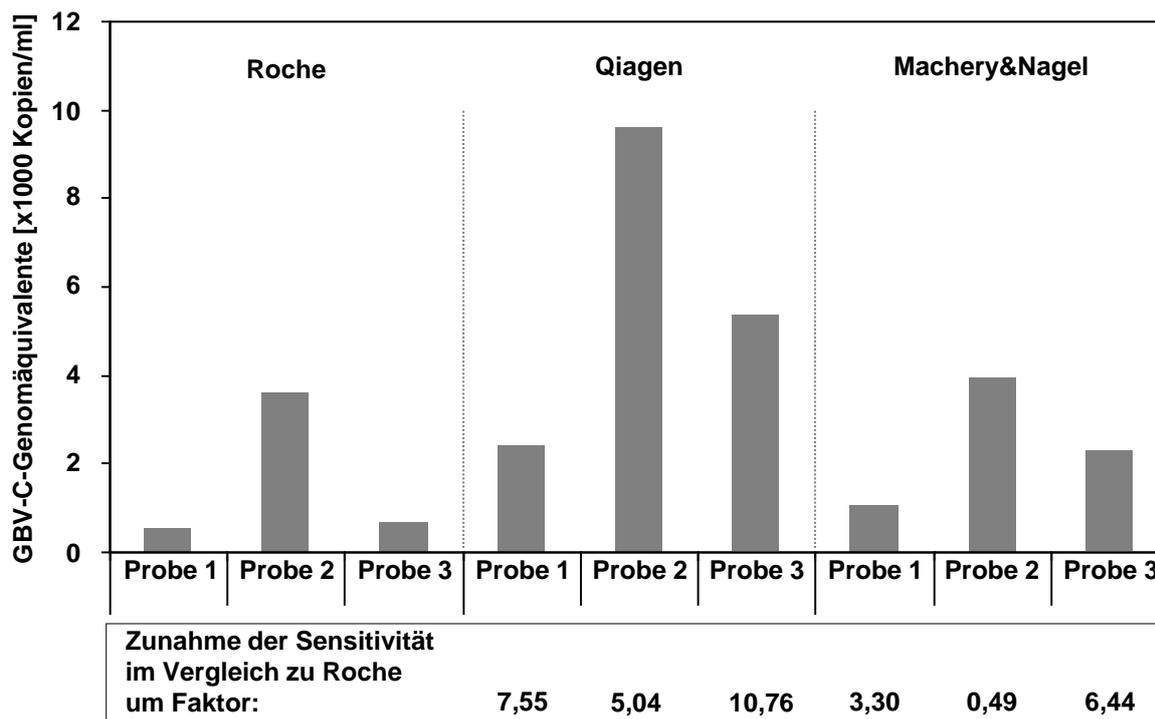


Abbildung 4.1: Vergleich der Effizienz der viralen RNA-Extraktion mit verschiedenen kommerziellen Systemen.

Dargestellt sind die Viruslast der jeweiligen Probe sowie die Steigerung der Sensitivität der Extraktion im Vergleich zur mit dem Roche-System extrahierten entsprechenden Probe.

Auf Grundlage der deutlich effizienteren RNA-Isolation für GBV-C-RNA mit dem System von Qiagen wurde im Folgenden virale RNA mit dem Viral RNA Mini Kit extrahiert.

4.2 GBV-C IM KLINISCHEN KONTEXT

Obwohl die Übertragung des GBV-C unter anderem über Blutprodukte erfolgt, wird anders als bei HCV und HIV-1 aufgrund seiner nichtpathogenen Eigenschaften das Vorliegen einer GBV-C-Virämie bei Blutspendern nicht routinemäßig getestet. Daher fehlen Bezugsquellen für GBV-C-positives Serum bzw. Plasma, das für experimentelle Arbeiten verwendet werden kann. Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war es deshalb, freiwillige Blutspender auf GBV-C zu untersuchen und eine GBV-C-Serumbank zu etablieren. Weiterhin sollten verschiedene Probandengruppen auf ihre GBV-C-Prävalenz im Zusammenhang mit anderen viralen Infektionen untersucht werden.

4.2.1 GBV-C-Prävalenz in verschiedenen Studiengruppen mit unterschiedlichem Transmissionsrisiko zu blutübertragenen Viren

Es wurden vier Probandengruppen mit insgesamt 2470 Proben auf eine GBV-C-Virämie durch Quantifizierung der viralen RNA untersucht. In der Gesamtprobandengruppe lag eine GBV-C-Prävalenz von 9,6 % vor. Im Einzelnen ergaben sich für die vier Kohorten die im Folgenden beschriebenen Prävalenzen.

Gruppe 1 (Kontrollgruppe):

Die Proben der Kontrollgruppe mit 1535 freiwilligen Blutspendern des Leipziger Instituts für Transfusionsmedizin wiesen eine Prävalenz für eine GBV-C-Virämie von 2,7 % (95 % Konfidenzintervall [CI]: 1,92-3,56 %) auf.

Gruppe 2 (adulte HIV-1-Patienten):

In der zweiten Gruppe wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Reil (Institut für Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg) 324 HIV-1-Patienten aus Erlangen (236 Patienten) und Leipzig (88 Patienten) untersucht. Die Gruppe der erwachsenen HIV-1-Patienten zeigte eine GBV-C-Prävalenz von 34,6 % (95 % CI: 29,39-39,75 %), wobei die Prävalenz in den Patienten des Raumes Erlangen mit 38,6 % (95 % CI: 33,35-43,77 %) signifikant höher lag ($p = 0,0177$) als bei den Patienten aus Leipzig (23,9 %, 95 % CI: 16,39-31,33 %).

Gruppe 3 (HGDS):

Die Studie umfasste Proben von 333 hämophilen, HCV-positiven Kindern und Jugendlichen, wovon 202 zusätzlich mit HIV-1 infiziert waren. In der HGDS-Kohorte konnte insgesamt bei 25,2 % (95 % CI: 20,37-30,13 %) der Kinder und Jugendlichen GBV-C nachgewiesen werden. Dabei waren 24,6 % (95 % CI: 18,5-30,72 %) der HIV-1-Infizierten und 26,3 % (95 % CI: 18,24-34,4 %) der HIV-1-negativen Probanden positiv für GBV-C-RNA ($p = 0,7858$).

Gruppe 4 (Anti-D-Studie):

Die Gruppe der Anti-D-Studie umfasste 306 Patientinnen. Die GBV-C-Prävalenz war mit 3,3 % (95 % CI: 1,28-5,26 %) der der Kontrollgruppe vergleichbar ($p = 0,5729$).

Mit einem p-Wert von $< 0,0001$ war die Prävalenz für eine GBV-C-Virämie in den Hochrisikokollektiven der hämophilen Kinder (HGDS) und der adulten HIV-1-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe der Blutspender signifikant erhöht. Die Prävalenzen der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: GBV-C-Prävalenzen in den verschiedenen Studiengruppen.

Studiengruppe	Anzahl der Probanden	GBV-C ⁻ / HIV-1 ⁻ % (n)	GBV-C ⁺ / HIV-1 ⁻ % (n)	GBV-C ⁻ / HIV-1 ⁺ % (n)	GBV-C ⁺ / HIV-1 ⁺ % (n)
Blutspender	1535	97,3 (1493)	2,7 (42)	-	-
Adulte HIV-1-Patienten	324	-	-	65,4 (212)	34,6 (112)
Erlangen	236	-	-	61,4 (145)	38,6 (91)
Leipzig	88	-	-	76,1 (67)	23,9 (21)
HGDS (2. Messzeitpunkt)	305	73,7 (84)	26,3 (30)	75,4 (144)	24,6 (47)
Anti-D-Studie	301	96,7 (291)	3,3 (10)	-	-

Zusätzlich wurde der Unterschied zwischen den GBV-C-Viruslasten der verschiedenen Gruppen untersucht. Es zeigte sich, dass die Verteilung innerhalb der Gruppen stark variierte (2,7-8,53 log₁₀ Kopien/ml). In Abbildung 4.2 sind diese als Punktwolken graphisch dargestellt.

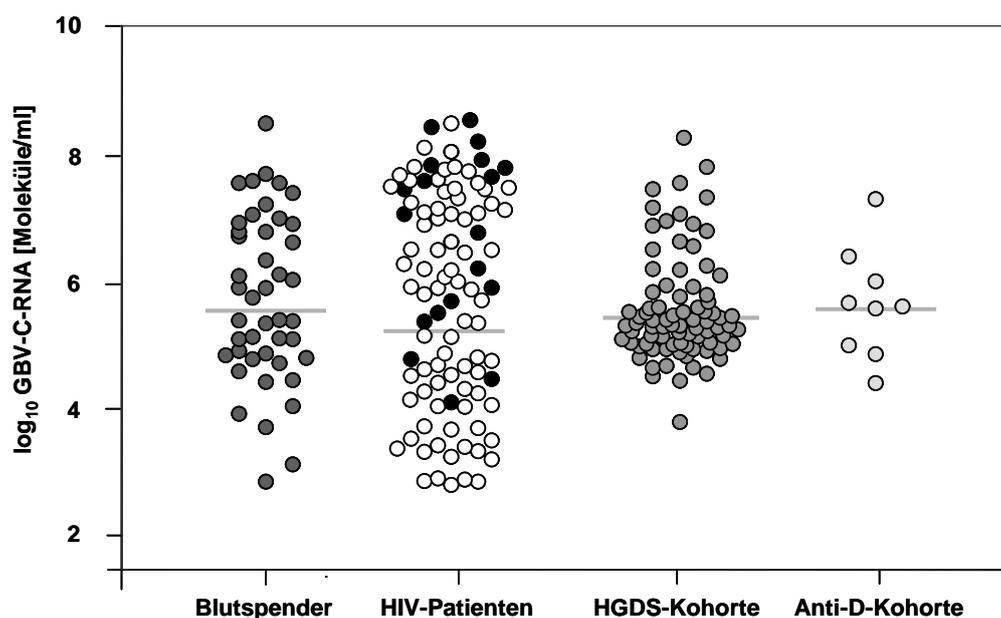


Abbildung 4.2: Vergleich der GBV-C-Viruslasten in den untersuchten Studiengruppen.

Die graue Linie gibt den Median an. Jeder Kreis kennzeichnet eine GBV-C-positive Probe.

HIV-1-Patienten: ○ Erlangen; ● Leipzig.

Die Mittelwerte (Standardabweichungen) für die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen lag nicht vor.

Tabelle 4.2: GBV-C-Viruslasten der untersuchten Studiengruppen im Vergleich zur Kontrolle.

Studiengruppe	Mittelwert (\pm SA) [log ₁₀ Kopien/ml]	p-Wert
Blutspender	5,72 (\pm 1,32)	-
HIV-1-Patienten	5,78 (\pm 1,68)	0,827
HGDS	5,55 (\pm 0,84)	0,432
Anti-D	5,63 (\pm 0,87)	0,801

SA: Standardabweichung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz in den untersuchten Studiengruppen stark variierte (2,7 % bis 38,6 %). Obwohl in der Anti-D- und der HGD-Studie die Proben insgesamt geringere Schwankungen bezüglich der GBV-C-Viruslast aufwiesen, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kohorten zu beobachten.

4.2.2 Einfluss der GBV-C-Infektion auf die Progression von HIV-1 und/oder HCV

4.2.2.1 Einfluss von GBV-C in anti-HCV-positiven hämophilen Kindern mit HIV-1 oder ohne HIV-1-Koinfektion (HGDS-Kohorte)

Hauptziel der Analyse dieser Studie war es, festzustellen, ob GBV-C in diesem Patientenkollektiv einen Einfluss auf den Verlauf der HIV-1-Infektion hat. Zusätzlich wurde der Einfluss von GBV-C auf den HCV-Krankheitsverlauf untersucht. Dazu wurden, wie beschrieben, zwei Proben für jeden Probanden ausgewählt (vgl. Abbildung 2.6, Kapitel 2.6.4). Tabelle 4.3 fasst die Statistik der untersuchten Parameter zu Beginn der Studie zusammen.

Tabelle 4.3: Statistische Auswertung der untersuchten Parameter zu Beginn der Studie für HIV-1-infizierte und HIV-1-negative Probanden (erster Messzeitpunkt).

Variable zu Studienbeginn	Statistik	HIV-1-positiv	HIV-1-negativ	p-Wert
Anzahl	n	202	119	
Alter [Jahre]	MW (\pm SA)	13,9 (\pm 3,3)	11,2 (\pm 3,2)	< 0,001
Dauer der HIV-1-Infektion [Jahre]	MW (\pm SA)	7,4 (\pm 1,3)	n.i.	-
CD4-T-Zellen [Zellen/ μ l]	MW (\pm SA)	382 (\pm 320)	957 (\pm 377)	-
log ₁₀ HIV-1-Viruslast [Kopien/ml]	MW (\pm SA)	3,4 (\pm 0,8)	negativ	-
HIV-1-Therapie	n (%)	94 (46,5)	n.i.	-
log ₁₀ HCV-Viruslast [Kopien/ml]	MW (\pm SA)	6,3 (\pm 1,2)	5,4 (\pm 1,2)	< 0,0001
HCV spontan ausgeheilt	n (%)	7 (3,5)	19 (16,0)	0,0002
GBV-C-Prävalenz	n (%)	2 (0,9)	0	-

MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung; n.i.: nicht indiziert

„HCV spontan ausgeheilt“ wurde definiert als HCV-RNA-negativ und anti-HCV-positiv.

Zu Studienbeginn (erster Messzeitpunkt) betrug das Alter der HIV-1-infizierten Patienten 13,9 (\pm 3,3) Jahre, das der HIV-1-negativen Patienten 11,2 (\pm 3,2) Jahre ($p < 0,001$). Die CD4-T-Zellen lagen für HIV-1-positive Patienten bei 382 (\pm 320) Zellen/ μ l. HIV-1-negative Patienten wiesen mit 957 (\pm 377) Zellen/ μ l Werte im Normbereich (400-1500 Zellen/ μ l) auf. Die HIV-1-Viruslast betrug bei HIV-1-positiven Patienten 3,4 (\pm 0,8) \log_{10} RNA-Kopien/ μ l. 46,5 % der HIV-1-positiven Probanden standen zu Beginn der Studie unter antiviraler Therapie gegen HIV-1. Im Gegensatz dazu konnte in HIV-1-negativen Probanden keine HIV-1-RNA nachgewiesen werden. Die HCV-Viruslast lag in HIV-1-infizierten Patienten signifikant höher als in HIV-1-negativen Probanden ($6,3 \pm 1,2 \log_{10}$ Kopien/ml vs. $5,4 \pm 1,2 \log_{10}$ Kopien/ml; $p < 0,0001$). Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten waren HCV-positiv. Bis zum Beginn der hier durchgeführten Analyse konnten jedoch einige Probanden HCV ausheilen. Für die HIV-1-negativen Probanden lag dabei mit 19 von 119 Patienten (16,0 %) eine deutlich höhere Quote für die Ausheilung der HCV-Infektion vor als für die HIV-1-positiven Probanden (7/202; 3,5 %, $p = 0,0002$). Zu Beginn der Studie war keiner der HIV-1-negativen Probanden positiv für GBV-C-RNA, bei 2 der HIV-1-positiven Patienten konnte jedoch eine GBV-C-Virämie nachgewiesen werden.

Im Vergleich dazu wurde zum Ende der Studie eine Zunahme der GBV-C-Prävalenz beobachtet. Siebenundvierzig der 191 HIV-1-Patienten waren zum zweiten Messzeitpunkt positiv für GBV-C-RNA (24,6 %). Basierend auf ihrem GBV-C-Status wurden die HIV-1-Infizierten gruppiert (GBV-C-negativ und GBV-C-positiv). Die HCV-Viruslast zeigte zwischen beiden Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied (GBV-C-positiv vs. GBV-C-negativ $6,2 \pm 1,5 \log_{10}$ Kopien/ml vs. $6,0 \pm 1,6 \log_{10}$ Kopien/ml; $p = 0,628$). Ebenso gab es keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der Patienten mit HIV-1-Therapie ($p = 0,552$). Sechs der GBV-C-negativen HIV-1-Patienten waren in der Lage, HCV auszuhelen, wogegen keiner der GBV-C/HIV-1-Koinfizierten zum zweiten Messzeitpunkt die HCV-Infektion eliminiert hatte ($p = 0,339$). Weiterhin zeigte die statistische Auswertung der Daten eine signifikant höhere CD4-T-Zellzahl für GBV-C-positive HIV-1-Patienten im Vergleich zu GBV-C-negativen HIV-1-Patienten (280 ± 275 Zellen/ μ l vs. 191 ± 226 Zellen/ μ l; $p = 0,043$). Gleiches war für die HIV-1-Viruslast zu beobachten (GBV-C-positiv vs. GBV-C-negativ $3,4 \pm 0,8 \log_{10}$ Kopien/ml vs. $3,8 \pm 0,9 \log_{10}$ Kopien/ml; $p = 0,009$). Beide Gruppen unterschieden sich bezüglich des Durchschnittsalters signifikant (GBV-C-positiv $19,2 \pm 4,0$ Jahre vs. GBV-C-negativ $17,7 \pm 3,1$ Jahre; $p = 0,028$). Tabelle 4.4 fasst die Daten zusammen.

Tabelle 4.4: Vergleich der GBV-C-positiven und GBV-C-negativen HIV-1-Patienten im Studienverlauf (zweiter Messzeitpunkt).

Parameter	Statistik	GBV-C-positiv	GBV-C-negativ	p-Wert
Anzahl	n (%)	47 (24,6)	144 (75,4)	-
Alter [Jahre]	MW (\pm SA)	19,2 (\pm 4,0)	17,7 (\pm 3,1)	0,028
CD4-T-Zellen [Zellen/ μ l]	MW (\pm SA)	280 (\pm 275)	191 (\pm 226)	0,043
\log_{10} HIV-1-Viruslast [Kopien/ml]	MW (\pm SA)	3,4 (\pm 0,8)	3,8 (\pm 0,9)	0,009
HIV-1-Therapie	n (%)	31 (66,0)	88 (61,1)	0,552
\log_{10} HCV-Viruslast [Kopien/ml]	MW (\pm SA)	6,2 (\pm 1,5)	6,0 (\pm 1,6)	0,628
HCV spontan ausgeheilt	n (%)	0	6 (4,2)	0,339

MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung.

„HCV spontan ausgeheilt“ wurde definiert als HCV-RNA-negativ und anti-HCV-positiv.

Die Kaplan-Meier-Analyse für GBV-C-/HIV-1-koinfizierte und HIV-1-monoinfizierte Patienten zeigt eine erhöhte Überlebensrate für die koinfizierte Gruppe (Cox-Regression mit Hazard Ratio von 0,354, $p = 0,045$). Danach war die Sterberate durch AIDS für HIV-1-monoinfizierte Patienten höher als für GBV-C/HIV-1-koinfizierten Probanden. In Abbildung 4.3 ist der Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Virämie und dem AIDS-Status abgebildet.

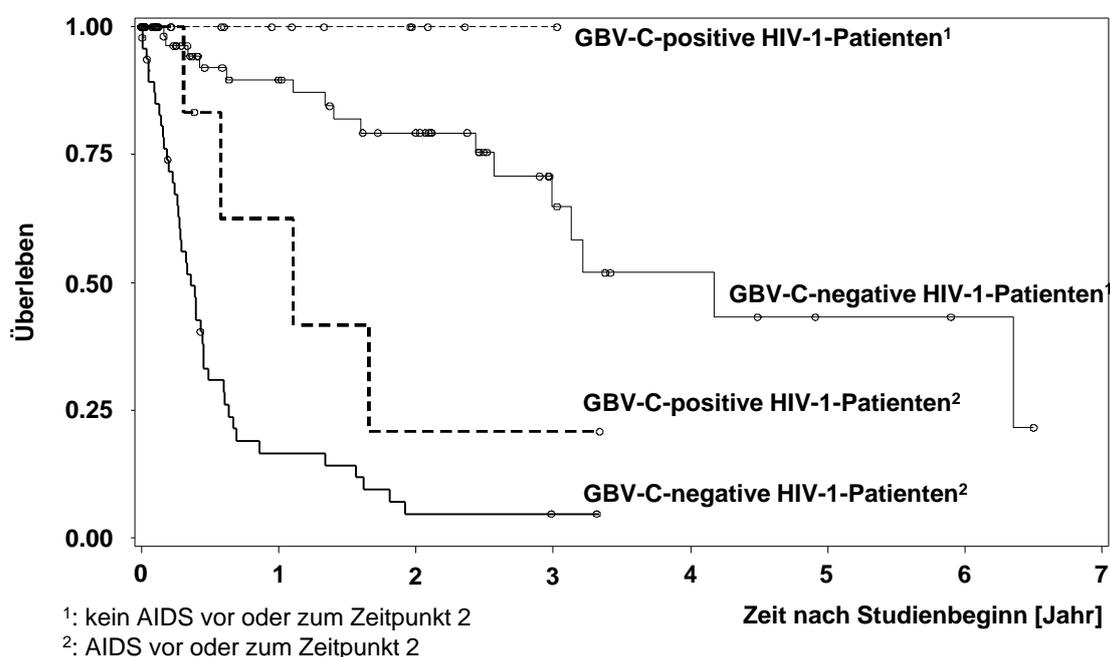


Abbildung 4.3: Kaplan-Meier-Analyse für GBV-C/HIV-1-koinfizierte und HIV-1-monoinfizierte Probanden.

Dargestellt sind die Überlebenskurven der GBV-C-positiven und GBV-C-negativen HIV-1-Patienten, gruppiert nach dem Zeitpunkt des Eintretens von AIDS. Die Kreise stellen Einzelbestimmungen der GBV-C-Infektion dar. Jeder Abstieg in der Kurve symbolisiert den Tod eines Patienten durch AIDS.

Im Vergleich der GBV-C-positiven und der GBV-C-negativen HIV-1-Patienten zeichnete sich ein positiver Effekt für die koinfizierten Probanden ab. Um zu verifizieren, ob dieser beobachtete Effekt auf die GBV-C-Infektion zurückzuführen war, wurden die Daten der HIV-

1-Patienten zum ersten Messzeitpunkt erneut analysiert. Dazu erfolgte die Einteilung der Patienten zu diesem Zeitpunkt in GBV-C-positiv und GBV-C-negativ nach dem GBV-C-Status des zweiten Messzeitpunkts, das heißt, der tatsächliche GBV-C-Status zum ersten Messzeitpunkt blieb in der erneuten Analyse unberücksichtigt.

In dieser Berechnung zeigten die später GBV-C-virämischen Probanden bereits zum ersten Messzeitpunkt signifikant höhere CD4-T-Zellzahlen (GBV-C-positiv 465 ± 284 Zellen/ μ l vs. GBV-C-negativ 377 ± 328 Zellen/ μ l; $p = 0,031$) und eine geringere HIV-1-Viruslast (GBV-C-positiv $3,2 \pm 0,8 \log_{10}$ Kopien/ml vs. GBV-C-negativ $3,5 \pm 0,8 \log_{10}$ Kopien/ml; $p = 0,030$). Die HCV-Viruslast wies keine signifikanten Unterschiede auf (GBV-C-positiv $6,1 \pm 1,1 \log_{10}$ Kopien/ml vs. GBV-C-negativ $6,4 \pm 1,2 \log_{10}$ Kopien/ml; $p = 0,209$). Damit konnte der beschriebene positive Einfluss einer GBV-C-Virämie nur indirekt nachgewiesen werden. Eine zum Zeitpunkt der ersten GBV-C-Bestimmung bestehende GBV-C-Virämie unterhalb der Nachweisgrenze kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Überraschend war, dass eine Korrelation zwischen Alter und dem Vorliegen einer GBV-C-Virämie bestand. Diese Beziehung war statistisch signifikant und galt sowohl für die HIV-1-positiven als auch für die HIV-1-negativen Probanden ($p < 0,001$).

Neben dem Einfluss von GBV-C auf den Verlauf der HIV-1-Infektion sollte ein möglicher Effekt von GBV-C auf die HCV-Erkrankung bei HIV-1-negativen Probanden untersucht werden. Im Studienverlauf konnte bei 30 der 114 HIV-1-negativen Probanden GBV-C-RNA nachgewiesen werden (26,3 %). Basierend auf dem GBV-C-Status erfolgte die Einteilung in GBV-C-positiv und GBV-C-negativ. Beide Gruppen waren hinsichtlich des Alters vergleichbar (GBV-C-positiv $17,4 \pm 3,5$ Jahre vs. GBV-C-negativ $17,1 \pm 3,2$ Jahre; $p = 0,664$). Der Unterschied der HCV-Viruslast war mit $p = 0,163$ statistisch nicht signifikant (GBV-C-RNA-positiv $6,0 \pm 1,3 \log_{10}$ Kopien/ml vs. GBV-C-negativ $5,6 \pm 1,3 \log_{10}$ Kopien/ml). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Anzahl der Patienten mit ausgeheilter HCV-Infektion zwischen der GBV-C-positiven Gruppe mit einem Probanden (3,3 %) und der GBV-C-negativen Gruppe mit 18 Probanden (21,4 %) eine statistische Signifikanz von $p = 0,023$ (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Vergleich der GBV-C⁺/HIV-1⁻ und GBV-C⁻/HIV-1⁻HCV-Patienten im Studienverlauf (zweiter Messzeitpunkt; n = 114).

Parameter	Statistik	GBV-C-positiv	GBV-C-negativ	p-Wert
Anzahl	n (%)	30 (26,3)	84 (74,7)	-
Alter [Jahre]	MW (\pm SA)	17,4 (\pm 3,5)	17,1 (\pm 3,2)	0,664
\log_{10} HCV-Viruslast [Kopien/ml]	MW (\pm SA)	6,0 (\pm 1,3)	5,6 (\pm 1,3)	0,163
HCV spontan ausgeheilt	n (%)	1 (3,3)	18 (21,4)	0,023

MW: Mittelwert; n: Anzahl; SA: Standardabweichung.

„HCV spontan ausgeheilt“ wurde definiert als HCV-RNA-negativ und anti-HCV-positiv.

Aufgrund des deutlichen Unterschieds bezüglich des HCV-Infektionsverlaufs zwischen GBV-C-virämischen und GBV-C-negativen Probanden wurden auch hier die Daten zum ersten Messzeitpunkt erneut analysiert. Wie für die HIV-1-Patienten erfolgte die Einteilung der HIV-1-negativen Probanden in die Gruppen GBV-C-positiv und GBV-C-negativ nach ihrem GBV-C-Status zum zweiten Messzeitpunkt. Dabei wiesen die später GBV-C-positiven Patienten mit $6,0 (\pm 1,1) \log_{10}$ Kopien/ml eine signifikant höhere HCV-Viruslast auf als die später immer noch GBV-C-negativen Probanden mit $5,6 (\pm 1,3) \log_{10}$ Kopien/ml ($p = 0,001$).

Zusammenfassend war für HIV-1-positive im Vergleich zu HIV-1-negativen Patienten grundsätzlich eine schlechtere Prognose, HCV auszuheilen, festzustellen ($p < 0,0001$). Ein Einfluss von GBV-C auf die HCV-Viruslast konnte dabei nicht beobachtet werden.

4.2.2.2 Einfluss von GBV-C in der multizentrischen, prospektiven Kohortenstudie zum natürlichen Verlauf der Hepatitis-C-Virusinfektion (Genotyp 1b) (Anti-D-Studie)

Da das Anti-D-Serum zusätzlich mit GBV-C kontaminiert war, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, inwieweit GBV-C über diesen langen Zeitraum persistiert und ob es Auswirkungen auf den Verlauf der HCV-Infektion hat. Zum Nachweis der GBV-C-Virämie in der Anti-D-Kohorte wurde virale RNA isoliert und die Viruslast mittels PCR untersucht. Neun der 306 untersuchten Proben waren 30 Jahre nach der Exposition GBV-C-positiv. Aufgrund dieser unerwartet niedrigen Prävalenz wurden zusätzlich zur quantitativen PCR der 5'-NTR zwei weitere Genbereiche mittels qualitativer PCR untersucht. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um auszuschließen, dass aufgrund der Sequenzdiversität von RNA-Viren möglicherweise mit nur einer PCR nicht alle Virusisolate nachgewiesen werden konnten. Die zweite PCR für die NS5A-Genregion erfolgte für alle Proben, während der NS3-Bereich für die positiven Proben und 40 randomisiert ausgewählte GBV-C-RNA-negative Proben getestet wurde. Basierend auf der Auswertung der PCR-Daten konnte gezeigt werden, dass mit der Standard-PCR für die 5'-NTR zu 99,7 % der korrekte GBV-C-Status detektiert werden konnte. Mit zwei der drei durchgeführten PCR ließen sich alle GBV-C-positiven Proben zweifelsfrei identifizieren (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Detektion von GBV-C-RNA in Serumproben der Anti-D-Kohorte.

	5'-NTR	NS3	NS4A
GBV-C-RNA⁺	9	10	10

Basierend auf den Ergebnissen aus der HGD-Studie, in der Patienten mit einer GBV-C/HCV-Koinfektion eine schlechtere Prognose für die Eliminierung von HCV aufwiesen, sollte auch für diese Kohorte eine mögliche Korrelation untersucht werden. Fünf der 306 Patientinnen (1,6 %) mussten wegen fehlender klinischer Daten von weiteren Analysen ausgeschlossen werden. 53,2 % der Probandinnen ($n = 160$) waren zum Zeitpunkt der Analyse HCV-RNA-

positiv, wohingegen 46,8 % (n = 141) die HCV-Infektion eliminieren konnten. Bei 80 der 141 Patientinnen (26,9 %) mit ausgeheilter HCV-Infektion wurde eine spontane Eradikation des HCV beobachtet. Für zwei der Probandinnen war zu keiner Zeit HCV-RNA nachweisbar. Zwei der HCV-positiven Patientinnen befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt in Behandlung; bei 57,4 % der HCV-positiven Frauen konnte nach Durchführung einer antiviralen HCV-Therapie (Therapierate 45,2 %) das HCV nicht eliminiert werden.

Neun HCV-RNA-positive Patientinnen (3,0 %) zeigten eine GBV-C-Koinfektion, wohingegen lediglich eine HCV-negative Probandin eine GBV-C-Virämie aufwies (0,3 %). GBV-C-RNA-positive HCV-Patientinnen zeigten somit eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit, HCV zu eliminieren (1/10, 10 %), als Probandinnen, die nicht GBV-C-virämisch waren (140/291, 48,1 %; $p = 0,022$). Zusätzlich wurden die Proben auf das Vorliegen von GBV-C-spezifischen Antikörpern untersucht. Bei 21,1 % (31/147) der HCV-RNA-positiven Probandinnen konnten Anti-GBV-C-E2-Antikörper nachgewiesen werden, während in der HCV-RNA-negativen Subkohorte 27,9 % der Patientinnen (39/140) Anti-GBV-C-Antikörper aufwiesen. Somit zeigten 40 der 161 HCV-positiven und 40 der 140 HCV-negativen Patientinnen Zeichen einer GBV-C-Exposition (GBV-C-RNA- oder anti-GBV-C-E2-positiv). Im Vergleich beider Gruppen, bezogen auf die GBV-C-Exposition, konnte eine statistisch signifikant höhere Ausheilungsrate der HCV-Infektion in HCV-negativen GBV-C-exponierten Patientinnen gegenüber den HCV-positiven beobachtet werden ($p = 0,0143$, 95 % CI: 0,8574-36,20, Odds Ratio: 11,32) (Abbildung 4.4).

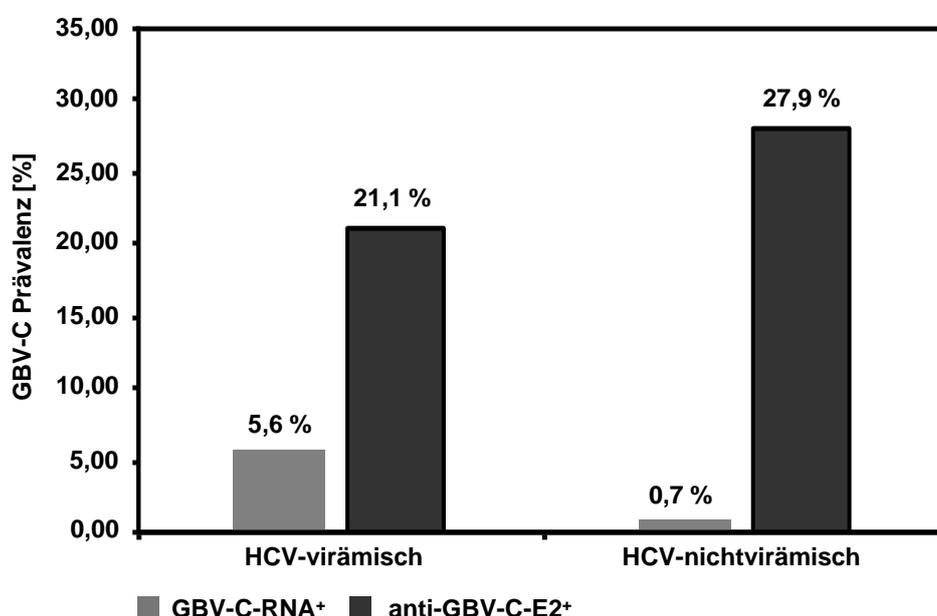


Abbildung 4.4: Bestimmung der GBV-Prävalenz für GBV-C-RNA-positive Patientinnen und Probandinnen mit Antikörpern gegen das E2-Protein von GBV-C in den beiden Gruppen „HCV-virämisch“ und „HCV-nichtvirämisch“.

4.3 ANALYSE DER VIRALEN INTERFERENZ ZWISCHEN GBV-C UND HIV-1 IN DER ZELLKULTUR

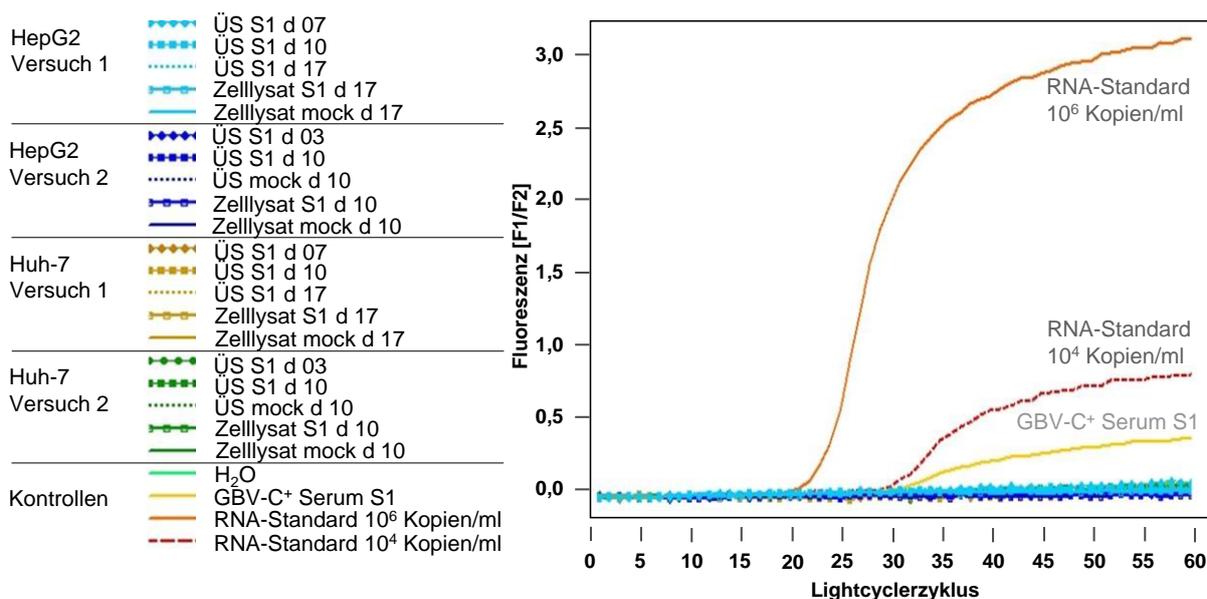
Klinische Studien können keinen direkten Beleg für einen kausalen Zusammenhang zwischen Erkrankung und den beobachteten Parametern liefern. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der in klinischen Studien beschriebene positive Effekt von GBV-C im Zusammenhang mit einer HIV-1-Infektion in Zellkulturexperimenten untersucht.

4.3.1 Etablierung einer GBV-C-Serumbank

Von den in Kapitel 4.2.1 identifizierten GBV-C-RNA-positiven Blutspendern wurden 9 Seren sowie Serum von einem GBV-C-negativen Spender (Kontrollserum) mit jeweils 250 ml und von 33 GBV-C-positiven Spendern mit ca. 3 ml Serum in die Serumbank eingebracht. Sie dienten als Ausgangsmaterial für weiterführende Experimente dieser Arbeit.

4.3.2 Replikation klinischer GBV-C Isolate in Zellkultur

Wie bei HCV ist auch für GBV-C die Etablierung eines Zellkultursystems schwierig. Seipp et al. [2051999] beschrieben die effiziente Replikation von GBV-C in adhärenenten Zellen hepatozytären Ursprungs (Zelllinien HepG2/Huh-7). Zur Etablierung eines Systems, in dem Anzucht und Gewinnung hochtitriger GBV-C-Virusstocks für die Koinfektionsexperimente möglich ist, wurden analog zur Publikation in der vorliegenden Arbeit die beiden Zelllinien HepG2 und Huh-7 mit einem klinischen GBV-C-Isolat (S1) infiziert. Zur Kontrolle für den erfolgreichen Zellaufschluss und die RNA-Präparation wurde der Nachweis eines Referenzgens mittels qualitativer PCR durchgeführt. Als solches wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ausgewählt, die im Rahmen der Glykolyse benötigt und daher permanent in jeder Zelle exprimiert wird. Abbildung 4.5 zeigt den negativen GBV-C-Nachweis in den hepatozytären Zelllinien HepG2 und Huh-7 nach Infektion mit dem GBV-C-Isolat S1 in jeweils zwei unabhängigen Experimenten.



Nachweis	HepG2			Huh-7		
	Zellysat	Überstände früh	Überstände spät	Zellysat	Überstände früh	Überstände spät
GBV-C	-	-	-	-	-	-
GAPDH	+	+	+	+	+	+

Abbildung 4.5: GBV-C-Replikation in den hepatozytären Zelllinien HepG2 und Huh-7.

Nachweis der GBV-C-RNA mittels quantitativer RT-PCR. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Infektionen pro Zelllinie. Der Nachweis von GAPDH diente als Kontrolle.

ÜS: Zellkulturüberstand; mock: Zellen ohne GBV-C; früh: Tag 03-0; spät: Tag 10-17.

Als Nachweis für die erfolgreiche RNA-Isolation und GBV-C-PCR diente das frische GBV-C-positive Serum S1, das als Kontrolle in die RNA-Isolation und die nachfolgende RT-PCR eingesetzt wurde und das in jedem Experiment nachweisbar war. Zusätzlich konnte über den Nachweis von GAPDH in allen Ansätzen mittels PCR gezeigt werden, dass sowohl der Zellaufschluss als auch die RNA-Extraktion positiv verlaufen waren. GBV-C-RNA hingegen war weder in den Zellkulturüberständen noch in den Zellysaten nachweisbar. Somit konnte eine GBV-C-Infektion in HepG2- und Huh-7-Zellen nicht bestätigt werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass im Modellsystem der Zellkultur hepatozytäre Zellen eine aktive Replikation klinischer GBV-C-Isolate unterstützen.

George et al. [²⁰⁶2003, ¹²⁷2006] und Xiang et al. [¹²⁶2000] schlagen als alternativen Ort der GBV-C-Replikation PBMC vor. Basierend auf dieser Empfehlung wurde das Zellkultursystem PBMC untersucht (siehe Abbildung 2.2), in dem zeitgleich auch eine Infektion mit HIV-1 möglich wäre. Für die Primär- und Sekundärinfektion von PBMC zur Untersuchung der Replikationsfähigkeit von GBV-C wurden die GBV-C-Isolate S31, S32, S33, S35 aus der Serumbank verwendet. Das GBV-C-negative Isolat S34 diente als Kontrolle, um mögliche unspezifische Effekte des Serums auf das Wachstum der Zellen zu berücksichtigen.

Für alle untersuchten GBV-C-Isolate war der Nachweis von GBV-C-RNA in vitro über einen Zeitraum von mindestens 34 Tagen nach Infektion möglich. Am Tag 0 war für keines der Isolate GBV-C-RNA nachweisbar; das Inokulum wurde durch den Waschschrift entfernt (unter die Nachweisgrenze). Von Tag 0 bis Tag 6 bzw. Tag 15 stieg die GBV-C-Viruslast der Kulturen an, was auf eine aktive GBV-C-Replikation hinweist. Ab der dritten Woche nach Infektion verringerten sich die Viruslasten in allen Kulturen. Eine mögliche Ursache dafür ist die Abnahme vitaler Zielzellen für die GBV-C-Replikation in der Zellkultur durch die begrenzte Teilungsfähigkeit der Lymphozyten. Daher wurden am Tag 37 nach Infektion frische PBMC in gleicher Menge zu den Primärkulturen zugegeben und weiter kultiviert. Nachfolgend stieg die Virusmenge für das GBV-C-Isolat S32 wieder an (125.726 Kopien/ml). In allen anderen Kulturen war keine GBV-C-RNA mehr nachweisbar. Die Kultur mit dem GBV-C-negativen Serum S34 blieb über den gesamten Zeitraum negativ für GBV-C (Abbildung 4.6).

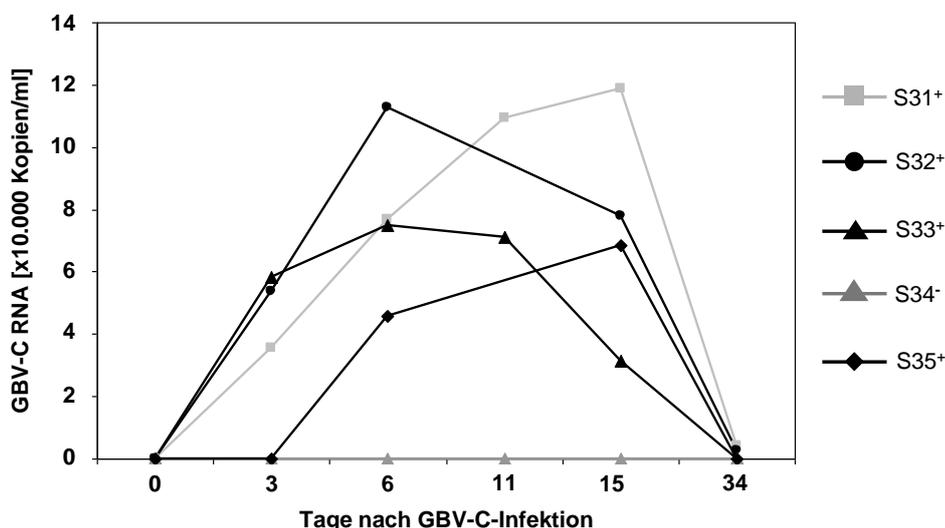


Abbildung 4.6: Replikation klinischer GBV-C-Isolate in PBMC (Primärinfektion).

+: GBV-C-positives Serum; -: GBV-C-negatives Serum.

Zusätzlich zu diesen Infektionen wurde in einem zweiten Experiment die aktive GBV-C-Replikation nachgewiesen. Für die Sekundärinfektion wurden, wie bereits erwähnt, Überstände vom Tag 37 verwendet. Für drei der vier untersuchten GBV-C-Isolate war der Nachweis von GBV-C-RNA möglich, das heißt, die GBV-C-negativen PBMC konnten mit GBV-C aus der primären Kultur infiziert werden. Die Kopienzahl der sekundären Infektion (Tag 8) war im Vergleich zur primären Infektion am Tag 6 zwar niedriger, im Vergleich zur eingesetzten Virusmenge nahm die GBV-C-RNA-Menge jedoch zu. Lediglich für das Isolat S33 konnte keine GBV-C-Replikation etabliert werden. Auffällig war, dass für die Isolate S31 und S35 nach Inkubation mit dem GBV-C-negativen Überstand der Primärinfektion am Tag 37 in der Sekundärinfektion wieder GBV-C-RNA nachgewiesen werden konnte. Eine Kontamination während der Infektion, der Kultivierung der Zellen oder der RNA-Isolation

konnte durch das Mitführen des GBV-C-negativen Serums S34 ausgeschlossen werden. Daher muss noch replikationskompetentes Virus unterhalb der Nachweisgrenze der PCR (500 Kopien/ml) im Überstand vorhanden gewesen sein (Abbildung 4.7).

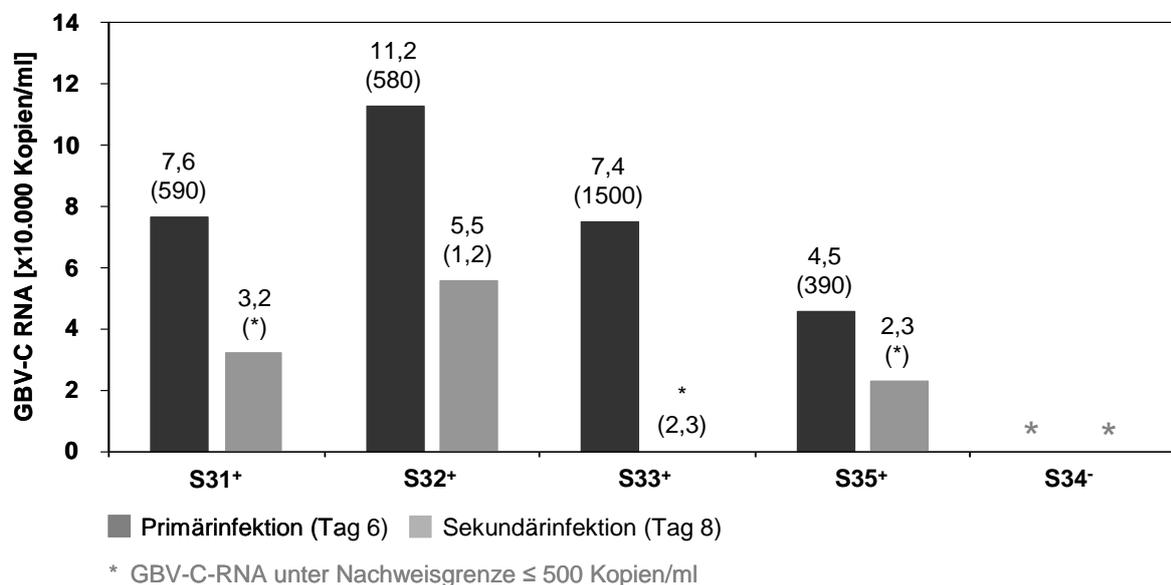


Abbildung 4.7: Nachweis der aktiven GBV-C-Replikation in PBMC (Sekundärinfektion).

Für den Nachweis einer aktiven Replikation wurde die am Tag 8 der Sekundärinfektion die GBV-C-RNA im Überstand bestimmt. Zum Vergleich sind die jeweiligen GBV-C-Viruslasten vom Tag 6 der primären Infektion abgebildet. Die für die Primär- und die Sekundärinfektion eingesetzte GBV-C-Virusmenge ist in Klammern in Kopien/ml angegeben.

Im Gegensatz zu den getesteten hepatozytären Zelllinien HepG2 und Huh-7 war in PBMC eine aktive GBV-C-Replikation für mindestens 6 Tage nachweisbar. Auch in den beiden lymphozytären Zelllinien CEMx174 und CEMx174_{CCR5} konnte eine GBV-C-Replikation beobachtet werden. Damit stand mit diesen lymphozytären Zellen ein Kultursystem zur Etablierung einer aktiven GBV-C-Replikation zur Verfügung.

4.3.3 GBV-C/HIV-1-Koinfektionen in Zellkultur

Die in Kapitel 4.3.2 als Zellkulturmodell für die aktive GBV-C-Infektion beschriebenen PBMC bieten zudem die Möglichkeit, zeitgleich eine HIV-1-Infektion zu etablieren. Die folgenden Koinfektionsexperimente wurden derart gestaltet, dass sie im Zeitrahmen der aktiven GBV-C-Replikation zwischen Tag 2 bis 11 durchgeführt werden konnten.

Aufgrund der starken Nebenwirkungen der CXCR4-Korezeptorantagonisten hat ein Großteil der Studien derzeit die Blockierung des CCR5-Corezeptor zum Ziel. Doch gerade im späten Krankheitsverlauf kommt es zum sogenannten Korezeptorswitch und die Konzentration CXCR4-troper HI-Viren nimmt drastisch zu. Im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Wechselwirkung von GBV-C-

Isolaten mit klinischen CXCR4-tropen HIV-1-Isolaten gelegt. Dementsprechend wurde als HIV-1-Isolat das CXCR4-trope Primärisolat 92UG024 verwendet.

In ersten Koinfektionsexperimenten erfolgte die Untersuchung des Verlaufs der HIV-1-Replikation unter Anwesenheit des klinischen GBV-C-Isolats S35 bzw. 1113. Abbildung 4.8 bildet den Verlauf der HIV-1-Replikation nach vorheriger Infektion mit diesen beiden GBV-C-Isolaten ab. Ebenso ist die Bildung von Synzytien (Riesenzellen infolge der CXCR4-tropen HIV-1-induzierten Zellfusion) dokumentiert.

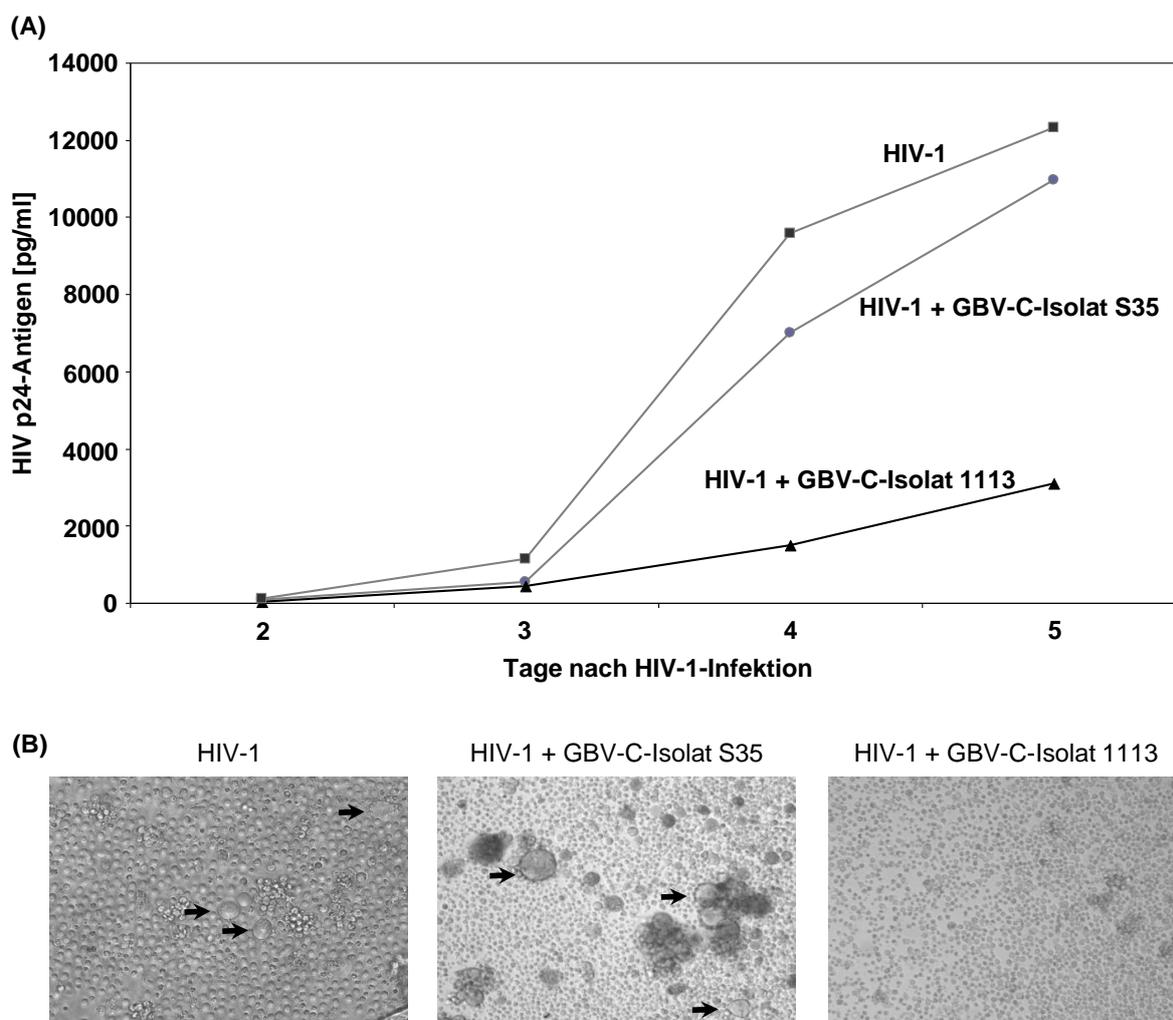


Abbildung 4.8: Verlauf der Infektion mit HIV-1 in Anwesenheit von GBV-C-Isolaten.

(A) Infektion von CEMx174-Zellen mit dem GBV-C-Isolat S35 oder 1113 und HIV-1 (HIV-1-Isolat 92UG024). (B) Nachweis von Synzytien (Pfeile) am Tag 5 nach HIV-1-Infektion (10-fache Vergrößerung).

HIV-1 replizierte in der Zellkultur bis Tag 3 nach HIV-1-Exposition langsam, zeigte dann einen raschen Anstieg der Virusmenge bis Tag 4 und stagnierte danach. Die Zellkulturen mit den beiden klinischen GBV-C-Isolaten unterschieden sich dabei deutlich bezüglich des Verlaufs der HIV-1-Replikation. Das Serum 1113 zeigte eine starke Hemmung der HIV-1-Replikation. Deutlich wurde das auch durch die beobachtete Reduktion der Synzytien in Kulturen, die mit dem GBV-C-Serum 1113 und HIV-1 inkubiert worden waren. Das GBV-C-Isolat S35 hingegen wies einen der Infektionskontrolle (Zellen nur mit HIV-1 infiziert)

vergleichbaren Verlauf der HIV-1-Replikation auf. In beiden Ansätzen konnten Synzytien beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde deshalb untersucht, ob der beobachtete Effekt auf die HIV-1-Replikation für das Isolat 1113 abhängig von der GBV-C- und der HIV-1-Viruslast ist. In Koinfektionsexperimenten mit unterschiedlichen Mengen an GBV-C und HIV-1 konnte nachgewiesen werden, dass der beobachtete Effekt des GBV-C-Isolats 1113 auf die HIV-1-Replikation dosisabhängig ist. Bei einem Inokulum von 2×10^6 GBV-C-Kopien/ml/ 1×10^6 Zellen war eine Reduktion der HIV-1-Replikation um 72 % zu beobachten. Bei Reduktion der GBV-C-Menge auf ein Drittel hingegen war keinerlei Hemmung mehr nachweisbar. Die reduzierte Virusmenge des GBV-C-Isolats 1113 führte zu einer Förderung der HIV-1-Replikation (-37 %). Gleiches galt in geringerem Maße für das GBV-C-Isolat S35 (-13 %).

Auch für eingesetzte HIV-1-Menge lag eine Dosisabhängigkeit vor. Bei der Erhöhung der p24-Menge um das Doppelte (1 ng p24 HIV-1/ 1×10^6 Zellen) sank die GBV-C-vermittelte Inhibition der HIV-1-Replikation um 46 %. Abbildung 4.9 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Hemmung in den beiden lymphozytären Zelllinien CEMx174 und CEMx174_{CCR5} war bei gleicher HIV-1-Menge und dem gleichen GBV-C-Isolat (1113) mit 72 % und 76 % vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

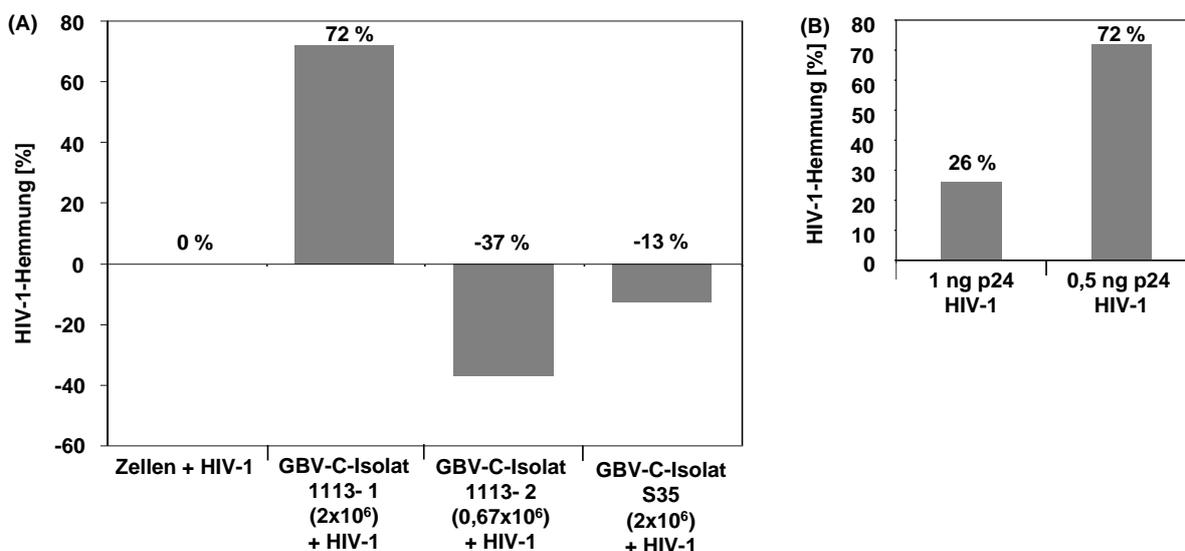


Abbildung 4.9: HIV-1-Inhibition in Abhängigkeit von (A) GBV-C-Viruslast und (B) HIV-1-Viruslast.

(A) Infektion von CEMx174-Zellen mit unterschiedlichen Mengen des GBV-C-Isolats 1113 und mit dem HIV-1-Isolat 92UG024. Zum Vergleich wurden Zellen mit dem GBV-C-Isolat S35 und HIV-1 und nur mit HIV-1 inkubiert. Die GBV-C-Kopienanzahl für die Infektion pro 1×10^6 Zellen ist jeweils in Klammern angegeben. **(B)** Inkubation von 2×10^6 Kopien/ 1×10^6 Zellen GBV-C-Isolat 1113 mit unterschiedlichen Mengen HIV-1 (0,5 ng und 1 ng p24/ 1×10^6 Zellen). Abgebildet ist die HIV-1-Hemmung am Tag 5 nach Infektion.

Der Einfluss von GBV-C auf die HIV-1-Replikation ist nach den vorliegenden Daten nicht für alle GBV-C-Isolate gleich und hängt zudem von der Viruslast des GBV-C als auch des HIV-1 ab.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden weitere 16 GBV-C-positive Seren von Blutspendern aus Leipzig untersucht. Dabei diente auch hier das GBV-C-negative Serum S34 als Kontrolle, um eventuelle serumvermittelte Effekte zu berücksichtigen. Den aus diesen Experimenten erhobenen Daten zufolge ist GBV-C in der Lage, die HIV-1-Replikation im Vergleich zur Kontrolle (nur HIV-1) signifikant zu hemmen ($p = 0,0002$). Überraschenderweise variierte das inhibitorische Potential verschiedener GBV-C-Isolate deutlich. Deshalb wurden die GBV-C-Isolate in HIV-1-inhibitorische und HIV-1-nichtinhibitorische eingeteilt. Das inhibitorische Potential der einzelnen hemmenden GBV-C-Isolate schwankte zwischen 20 und 70 % und ist gegenüber dem nichtinhibitorischen Phänotyp ($< 5\%$) statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Abbildung 4.10 fasst die untersuchten GBV-C-Isolate nach ihrem Phänotyp zusammen.

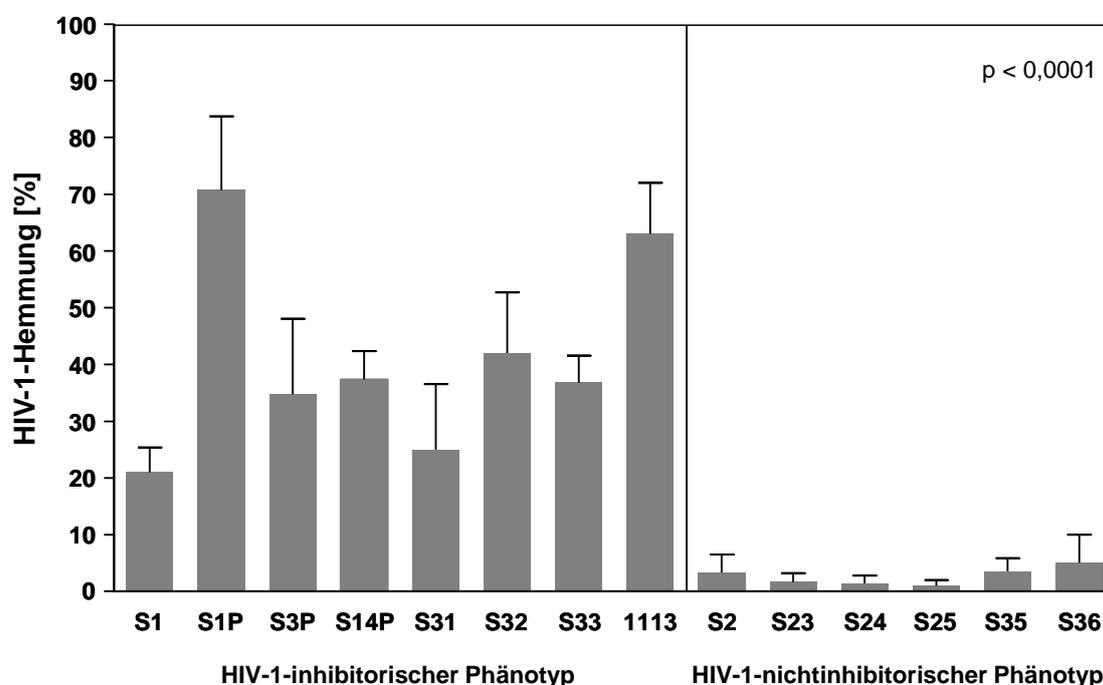


Abbildung 4.10: Inhibition der HIV-1-Replikation durch klinische GBV-C.

Die Wertung erfolgte anhand der gemessenen p24-Mengen an den Tagen 3 bis 6 nach Infektion. Zur Berechnung der inhibitorischen Fähigkeit des jeweiligen Isolats wurden die Daten anhand der Positivkontrolle (nur HIV-1, mock) kalkuliert. Dargestellt sind Daten aus 3 bis 8 unabhängigen Experimenten.

Zur Bestätigung des beobachteten Effekts wurden weitere ausgewählte Seren aus einer anderen Spenderkohorte (Erlanger Kohorte) untersucht. Diese Seren wurden parallel in einem zweiten Labor (Nationales Referenzzentrum für Retroviren, Universitätsklinikum Erlangen) analysiert. Abbildung 4.11 zeigt die Daten der Leipziger Analyse. Die Ergebnisse aus Erlangen waren vergleichbar.

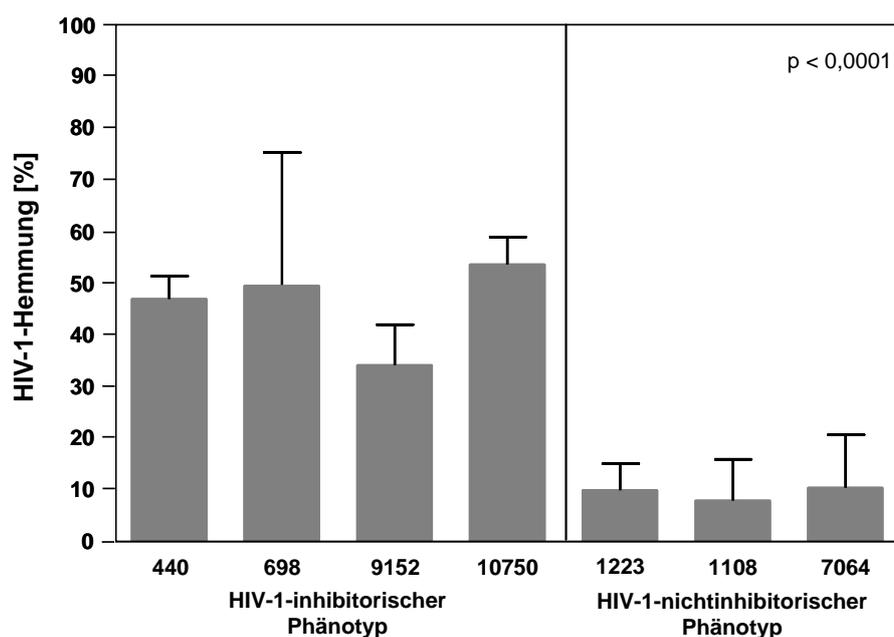


Abbildung 4.11: Bizentrische Analyse des HIV-1-inhibitorischen Phänotyps klinischer GBV-C-Isolate (Erlangerer Kohorte).

Zusammengefasst sind die p24-Mengen der Tage 3 bis 6 nach Infektion. Zur Berechnung der inhibitorischen Fähigkeit des jeweiligen Isolats wurden die Daten anhand der Positivkontrolle (nur HIV-1) kalkuliert. Dargestellt sind Daten aus 3 bis 6 unabhängigen Experimenten.

Unabhängig vom Experimentator, den Laboren und unterschiedlichen PBMC-Spendern konnten die beiden Phänotypen bestätigt werden. Statistische Analysen ergaben mit $p < 0,0001$ ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied zwischen HIV-1-inhibitorischen und HIV-1-nichtinhibitorischen Isolaten.

Auf Grundlage dieser Experimente können klinische GBV-C-Isolate nach ihrem HIV-1-inhibitorischen Potential phänotypisch charakterisiert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden mögliche Ursachen der unterschiedlichen HIV-1-Hemmung exploriert.

4.3.4 Bedeutung der Sequenzvariationen von GBV-C für die HIV-1-Replikation

In der Literatur gibt es verschiedene diskutierte GBV-C-Proteine, die für die HIV-1-Inhibition verantwortlich sein könnten. Xiang et al. [2008] zum Beispiel postulierten ein Serin an Position 158 im NS5A-Protein als Ursache für die HIV-1-inhibierende Wirkung des GBV-C. Nach Mutation dieser Aminosäure verlor das diesen Aminosäureaustausch enthaltende Peptid sein HIV-1-inhibitorisches Potenzial.

Basierend auf diesen Untersuchungen wäre eine Unterscheidung der beobachteten Phänotypen der in dieser Arbeit analysierten klinischen GBV-C-Isolate auf Nuklein-Aminosäure-Ebene denkbar. Daher wurden Sequenzanalysen für den betreffenden Bereich des NS5A-Gens (nt6579-6868) für entsprechende GBV-C-Isolate durchgeführt (Abbildung 4.12).

Im Sequenzvergleich der einzelnen Isolate auf Nuklein- und Aminosäureebene waren relativ geringe Unterschiede zu beobachten. Zwischen den Isolaten der beiden Phänotypen war kein signifikanter Unterschied erkennbar. Keines der GBV-C-Isolate wies eine Mutation des Serins an Position 158 auf. Die Sequenz zeigt im Gegenteil eine starke Konservierung zwischen den Isolaten. Lediglich die beiden Isolate 10750 und 440, die in den Zellkulturexperimenten die stärkste Hemmung der HIV-1-Replikation aufwiesen, zeigten übereinstimmende Aminosäureaustausche an den Positionen L191M und D206E. Dabei handelte es sich jedoch um keinen Austausch gegen Aminosäuren mit signifikant anderen Eigenschaften.

In der Literatur beschrieben ist ein weiteres Protein des GBV-C, das Oberflächenprotein E2, das auf die Expression HIV-1-relevanter Rezeptoren Einfluss nehmen soll [¹²⁸Nattermann et al. 2003]. Auch für das E2-Protein wurde überprüft, ob sequenzbasierte Unterschiede zwischen GBV-C-Isolaten mit HIV-1-inhibitorischen bzw. HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp bestehen. Dazu wurde das E2-Gen der verschiedenen GBV-C-Isolate sequenziert (nt969-2238). Es erfolgte die Untersuchung des gesamten E2-Genbereichs. In Abbildung 4.13 ist der Abschnitt dargestellt, in dem die sequenzbasierten Unterschiede auftraten. Die nicht abgebildeten Sequenzbereiche zeigten keine übereinstimmenden Aminosäuresubstitutionen.

Nukleinsäurevergleich:

Protein	AF121950	AF121950
440	A	L
698	G	S
1700	S	D
4080	R	D
5636	T	V
9152	V	E
10750	L	S
1902	E	M
1920	G	V
0223	P	C
0306	T	T
1007	C	C
1108	I	I
7064	D	R

Protein	AF121950	AF121950
440	G	C
698	T	A
1700	C	C
4080	T	T
5636	A	A
9152	T	T
10750	T	T
1902	A	A
1920	T	T
0223	C	C
0306	T	T
1007	C	C
1108	T	T
7064	A	A

Aminosäurevergleich:

Protein	AF121950	AF121950
440	L	L
698	G	G
1700	A	A
4080	T	T
5636	S	S
9152	I	I
10750	D	D
1902	P	P
0223	P	P
0306	H	H
1007	H	H
1108	K	K
7064	H	H

Abbildung 4.13: Sequenzanalyse des GBV-C-Proteins E2 (Aminosäure 129-215).

Gruppierung der untersuchten klinischen GBV-C-Isolate nach ihrem Phänotyp: HIV-1-inhibitorisch – grau unterlegt; HIV-1-nichtinhibitorisch – rot unterlegt. Ausgehend von der Referenzsequenz AF121950 sind übereinstimmende Nukleinsäuren mit einem Strich gekennzeichnet, während Basensubstitutionen durch die entsprechende ausgetauschte Base kennlich gemacht sind. Zusätzlich ist die Aminosäuresequenz abgebildet (rechts unten). Die gelb unterlegten Nuklein- und Aminosäuren stellen für die HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolate übereinstimmende Aminosäuresubstitutionen an Position E143K/H bzw. T204A dar.

Im E2-Sequenzvergleich wurden zahlreiche Mutationen, jedoch keine hypervariablen Regionen wie bei HCV beobachtet. Die Sequenzen aller HIV-1-hemmenden GBV-C-Isolate zeigten im Vergleich zur Referenzsequenz AF121950 keine übereinstimmenden Aminosäuresubstitutionen. Im Gegensatz dazu konnten für die Sequenzen der HIV-1-nichthemmenden GBV-C-Isolate zwei übereinstimmende Mutationen nachgewiesen werden, die zu einem Aminosäureaustausch führten. An Position 143 des E2-Proteins wurde das Glutamat gegen Lysin oder Histidin ausgetauscht (E143KH) und an Position 204 erfolgte die Substitution von Threonin durch Alanin (T204A). Dabei verloren die HIV-1-nichtinhibitorischen Isolate an Position 204 eine Phosphorylierungsstelle. Um die Lage der veränderten Aminosäuren im Protein zu ermitteln, wurden 3D-Modelle des hypothetischen E2-Proteins erstellt (I-TASSER, siehe Abbildung 4.19). In der Modellierung zeigte sich, dass das Glutamat an Position 143 an der Oberfläche des E2-Proteins exponiert ist. Die Substitution des Threonin zum Alanin führt unter anderem zu einem Ladungsshift.

4.3.5 Einfluss von E2-Peptiden auf die HIV-1-Replikation

Um das E2-Protein als mögliches HIV-1-inhibitorisches Protein zu charakterisieren und die dafür verantwortliche Proteindomäne einzugrenzen, bieten überlappende Peptide eine effiziente Möglichkeit. E2-Peptide sollten in vitro auf ihr inhibitorisches Potential das HIV-1 betreffend untersucht werden.

Nach Etablierung des Infektionsmodells wurden in Kooperation mit dem Biochemischen Institut der Universität Barcelona 124 sich überlappende 18mer-Peptide synthetisiert, die das gesamte E2-Protein umfassen. Dabei war das nachfolgende Peptid um jeweils drei Aminosäuren in Richtung des C-Terminus verschoben (Abbildung 4.14).

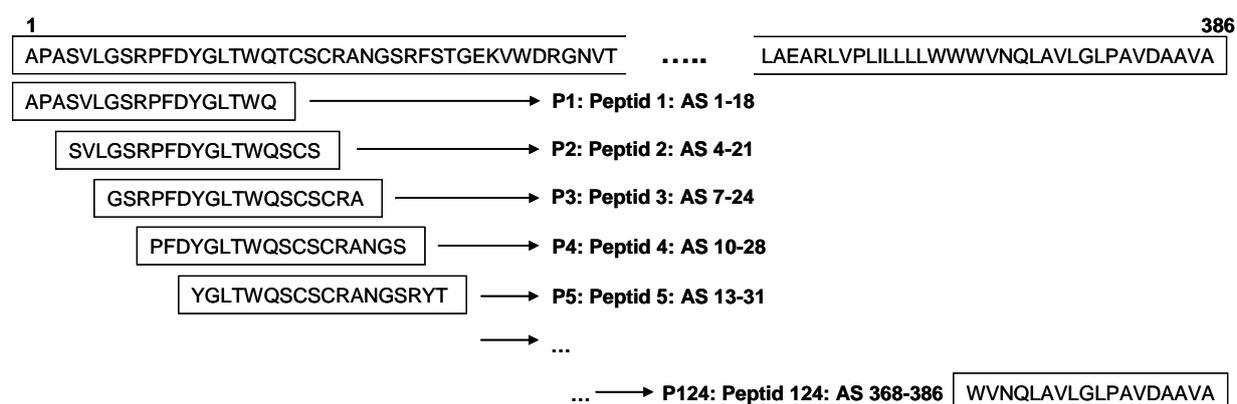


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der überlappenden 124 18mer-E2-Peptide.

Die obere Sequenz bildet die Aminosäuresequenz des E2-Proteins ab. Davon ausgehend wurden 18mer-Peptide synthetisiert, wobei die nachfolgende Sequenz im Vergleich zur vorangegangenen um 3 Aminosäuren carboxyterminal verschoben wurde. Dargestellt sind der Anfangsbereich (AS1-42) und das Ende des E2-Proteins (AS 352-386) mit den entsprechenden Peptiden.

AS: Aminosäure, P: Peptid.

4.3.5.1 Inkubation eukaryotischer Zellen mit HIV-1-Viruspartikeln und E2-abgeleiteten Peptiden

Da mehrere Mechanismen für eine HIV-1-Hemmung durch das E2-Protein denkbar sind, wurden verschiedene Versuchsabläufe getestet. Basierend auf der Hypothese, dass GBV-C an HIV-1-relevante Rezeptoren binden kann und so die HIV-1-Hemmung induziert, wurden die Zellen mit dem jeweiligen E2-Peptid vorinkubiert. Da auch denkbar wäre, dass GBV-C direkt mit HIV-1 interagiert, sollten in weiteren Versuchsansätzen die Peptide mit HIV-1 vorinkubiert werden. Die HIV-1-Infektion erfolgte analog zu den vorangegangenen Koinfektionsexperimenten mit einem CXCR4-tropen HIV-1-Isolat.

Dem Medium in Setup 3 und 4 wurde nach der HIV-1-Infektion frisches Peptid zugesetzt, um die Teilungsaktivität der verwendeten Zellen in den Versuchsaufbau einzubeziehen. Unabhängig von der Zielstruktur, an die das Peptid bindet (Zelloberflächenmoleküle oder HIV-1-Strukturen), sollte die Zugabe von frischem Peptid die aus Teilung neu hervorgehenden Zellen oder die aus der Virusreplikation entstehenden neuen Viren absättigen.

In Vorversuchen des Biochemischen Instituts wurden zwei Peptide (im Folgenden A und B), die in Fusionsassays die HIV-1-induzierte Fusion von Zellen hemmten, identifiziert [²⁰⁸Herrera et al. 2009]. Mit Hilfe dieser Peptide erfolgte die Testung der vier Setups. Als Kontrolle für den Verlauf der HIV-1-Infektion wurden die CEMx174-Zellen nur mit HIV-1 inkubiert. Als Positivkontrolle für die HIV-1-Inhibition diente der kommerzielle HIV-1-Fusionsinhibitor C34. Er zählt zu den sogenannten C-Proteinen, die für die Fusion der viralen und der zellulären Membran essentiell sind [²⁰⁹Liu et al. 2005]. DMSO, das Lösungsmittel für die Peptide, wurde als Kontrolle in der gleichen Konzentration wie in den Ansätzen mit Peptid eingesetzt, um mögliche DMSO-induzierte Effekte auszuschließen.

Zellen, die nur mit HIV-1 inkubiert wurden, zeigten den für HIV-1 typischen Infektionsverlauf. Zwischen Tag 4 und 6 nach Infektion stieg die HIV-1-Replikation steil an, um ab Tag 6 in einem Plateau zu stagnieren. Die Kontrollansätze, denen DMSO zugesetzt wurde, wiesen einen vergleichbaren Verlauf der HIV-1-Replikation auf. Damit konnte nachgewiesen werden, dass DMSO als Lösungsmittel keinen signifikanten Einfluss auf den experimentellen Aufbau hat. C34 zeigte erwartungsgemäß eine Hemmung der HIV-1-Replikation von mehr als 98 %. In den Kulturen mit C34 und HIV-1 war über den experimentellen Verlauf von 7 Tagen keine HIV-1-Replikation nachweisbar. Die Negativkontrolle aus unbehandelten Zellen blieb während des gesamten Experiments unter dem Cut-off-Wert des p24-ELISA (p24 < 30pg/ml).

Zwischen den vier Setups waren deutliche Unterschiede zu beobachten. Die Setups 1 und 3, in denen die Zellen zuerst mit dem Peptid kultiviert wurden, wiesen einen Anstieg der HIV-1-Replikation bis zum Tag 6 nach Infektion auf (im Setup 1 für das Peptid B und im Setup 3 für das Peptid A). Die Werte für das Peptid B lagen im Setup 2 ebenfalls über den Werten der Inhibitionskontrolle C34. Lediglich im Setup 4 waren die p24-Werte für beide

Peptide vergleichbar zur Kontrolle C34. Die Zugabe frischen Peptids bewirkte eine geringfügig bessere Inhibition der HIV-1-Replikation (Abbildung 4.15).

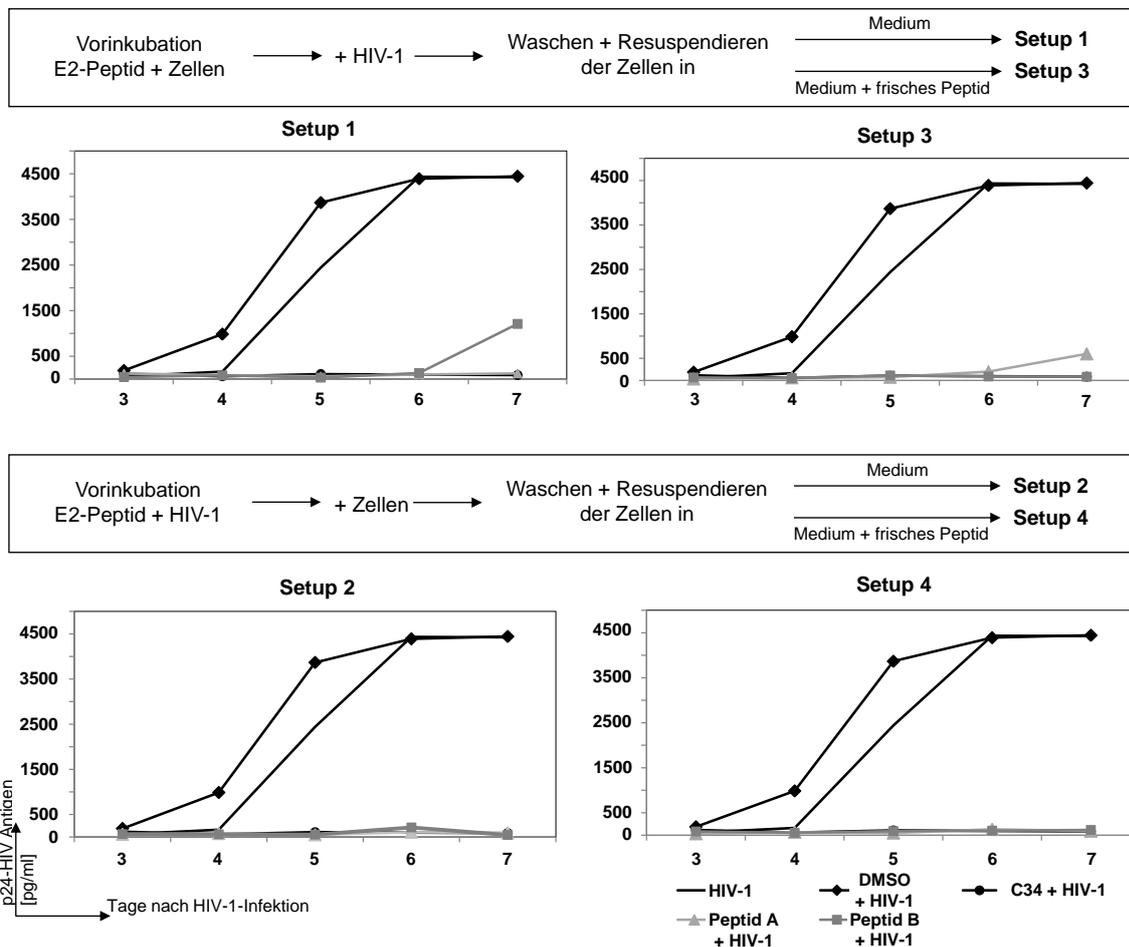


Abbildung 4.15: Verlauf der HIV-1-Infektion unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Getestet wurden zwei Peptide (A und B), die in Fusionsversuchen eine Inhibition der Synzytienbildung zeigten. Dargestellt ist die p24-Antigenkonzentration an den Tagen 3 bis 7 nach Infektion. Alle Proben wurden zeitgleich analysiert. Zur besseren Darstellung sind die Setups einzeln abgebildet. Als Referenzkurven ist in jeder Abbildung ein identischer Datensatz gezeigt. Die p24-HIV-Antigenkonzentration für die Ansätze mit den beiden Peptiden bzw. C34 zeigten zum Teil sehr geringe Werte (< 100pg/ml).

Aufgrund dieser Daten wurde für die Untersuchung der 124 Peptide das Setup 4 gewählt. Außerdem erfolgte die Probennahme für das Screening am Tag 6 nach Infektion erfolgen, um sicherzustellen, dass eine aktive HIV-1-Replikation gemessen wurde.

4.3.5.2 Untersuchung von 124 überlappenden 18mer-Peptiden des E2-Proteins

Siebenundsechzig der getesteten 124 18mer-Peptide (54,5 %) waren mit einer Konzentration von 500 μM in der Lage, HIV-1 in vitro mit mehr als 90 % zu inhibieren. Dabei war die Hemmung im N-terminalen Bereich des E2-Proteins (bis P62) konstanter und stärker als im C-terminalen Abschnitt. Das E2-Protein besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne (Ectodomäne, Aminosäure 1-339) und einer Transmembrandomäne (Aminosäure 340-386). Die Peptide (P) der Transmembrandomäne P114 bis P124 wiesen nur eine geringe bis keine Hemmung gegenüber HIV-1 auf. Die hemmenden Peptide liegen damit in den Proteindomänen, die sich auf der Oberfläche des Virus befinden.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden in weiterführenden Versuchen diese Peptide mit einer geringeren Konzentration von 250 μM getestet. Dabei zeigten die Peptide P9, P11, P15, P21, P23, P46, P89 (7/124; 5,6 %) eine HIV-1-Inhibition von mehr als 90 %. Das deutet auf eine hohe HIV-1-inhibitorische Potenz der Peptide hin. Weitere 9 Peptide (P5, P19, P20, P34, P47, P77, P93, P97, P109; 7,3 %) zeigten eine Reduktion ihres inhibitorischen Potentials auf 40 bis 72 %. Die restlichen 108 Peptide (87,1 %) wiesen keine oder nur noch eine geringe HIV-1-Hemmung (< 38 %) auf. In Abbildung 4.16 ist die beobachtete Inhibition der Peptide bei einer Konzentration von 500 μM in hellgrau und von 250 μM in dunkelgrau abgebildet. Vollständige Überlappungen der Hemmungen bei beiden Konzentrationen ein und desselben Peptids sind mit einem Sternchen versehen.

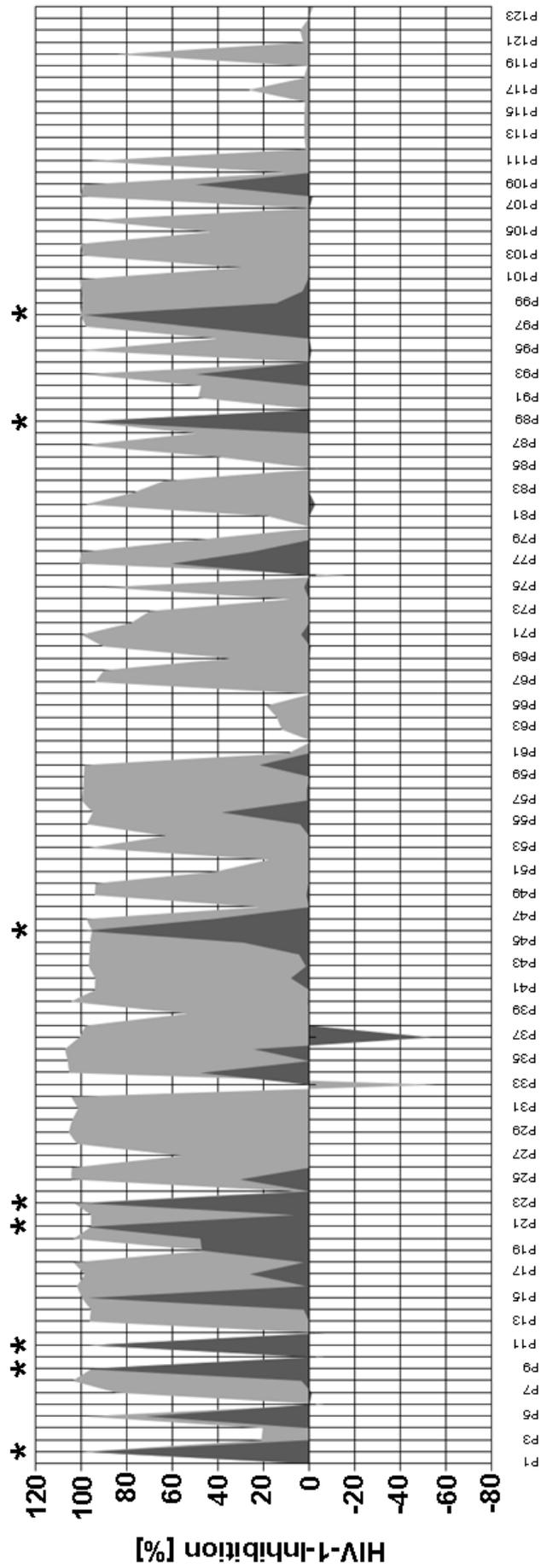


Abbildung 4.16: Untersuchung von 124 Einzelpeptiden des GBV-C-E2-Proteins in vitro.

Die Graphik bildet die prozentuale Hemmung am Tag 6 nach Infektion ab: Testkonzentration von 500 µM (hellgraue Kurve) und 250 µM (dunkelgraue Kurve). Dazu wurde die HIV-1-Replikation der Positivkontrolle 100 % gesetzt. Aus der Menge des gemessenen HIV-p24-Antigens in den Ansätzen mit den zu untersuchenden Peptiden ergibt sich die inhibitorische Fähigkeit des Peptids in %. Die Sterne kennzeichnen Bereiche, in denen die Hemmungen für 500 und 250 µM des gleichen Peptids genau überlappen (Aus Darstellungsgründen sind nur ungerade Peptide beschriftet).

Peptide, bei denen übereinstimmend in beiden Ansätzen viele Präzipitate und deutlich weniger Zellen als in den Kontrollen am Tag 6 nach Infektion nachzuweisen waren, wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Eine Präzipitatbildung deutet auf eine schlechte Löslichkeit der Peptide in physiologischen Medien hin, was eine Applikation im Kontext der Entwicklung eines neuen Therapieansatzes erschweren würde.

4.3.5.3 Charakterisierung HIV-1-inhibitorischer E2-Peptide

Von ausgewählten Peptiden, u. a. diejenigen, die auch bei 250 μM eine Inhibition von mindestens 90 % zeigten, wurden in weiteren Versuchen verschiedene Peptidkonzentrationen getestet. Die Peptide P11, P19, P20, P89 und P109 wiesen lediglich für die beiden höchsten Konzentrationen von 500 μM und 250 μM eine HIV-1-Inhibition auf. Das Peptid P2 zeigte nur bei 500 μM eine relevante HIV-1-Inhibition. Dagegen konnten die Peptide P21, P23 und P46 auch bei 100 μM HIV-1 zu mindestens 95 % hemmen. Danach nahm die inhibitorische Wirkung dieser Peptide ab. Lediglich das Peptid P46 war auch bei einer Konzentration von 75 μM in der Lage die HIV-1-Replikation fast vollständig zu unterdrücken. In Abbildung 4.17 ist die dosisabhängige Inhibition der HIV-1-Replikation durch ausgewählte E2-Peptide in CEMx174-Zellen graphisch dargestellt.

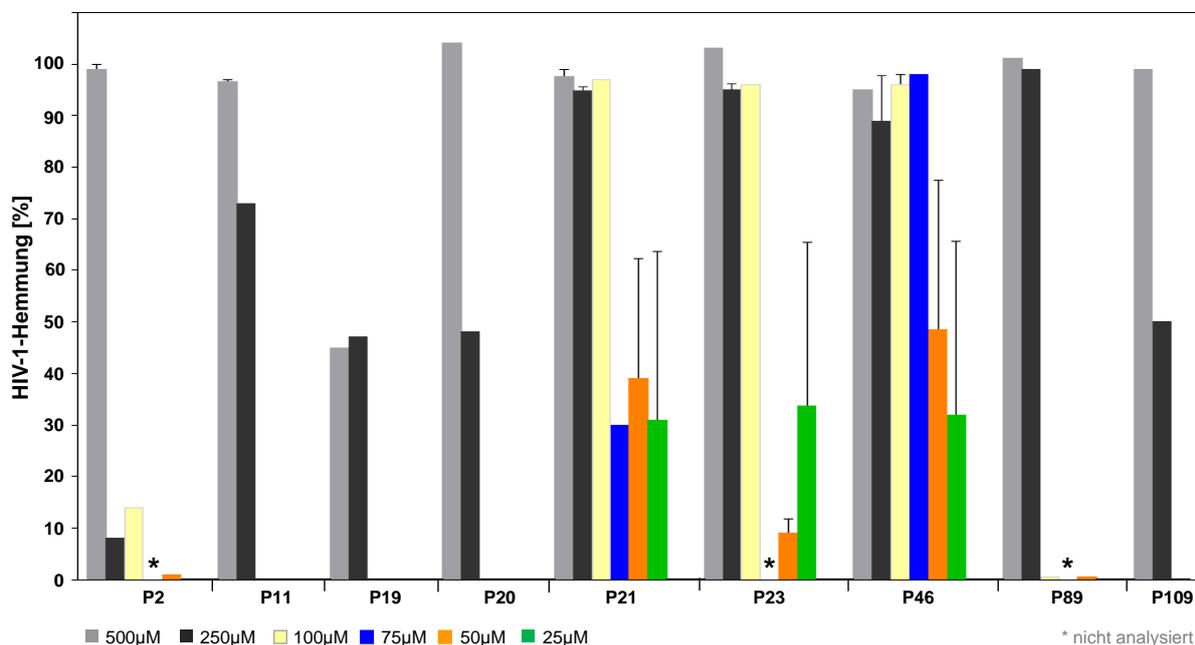


Abbildung 4.17: Konzentrationsabhängige Hemmung der HIV-1-Replikation durch E2-Einzelpeptide.

CEMx174 Zellen wurden mit dem HIV-1-Isolat 92UG024 infiziert, das mit der jeweiligen Konzentration der unterschiedlichen Peptide vorinkubiert worden war. * nicht analysiert.

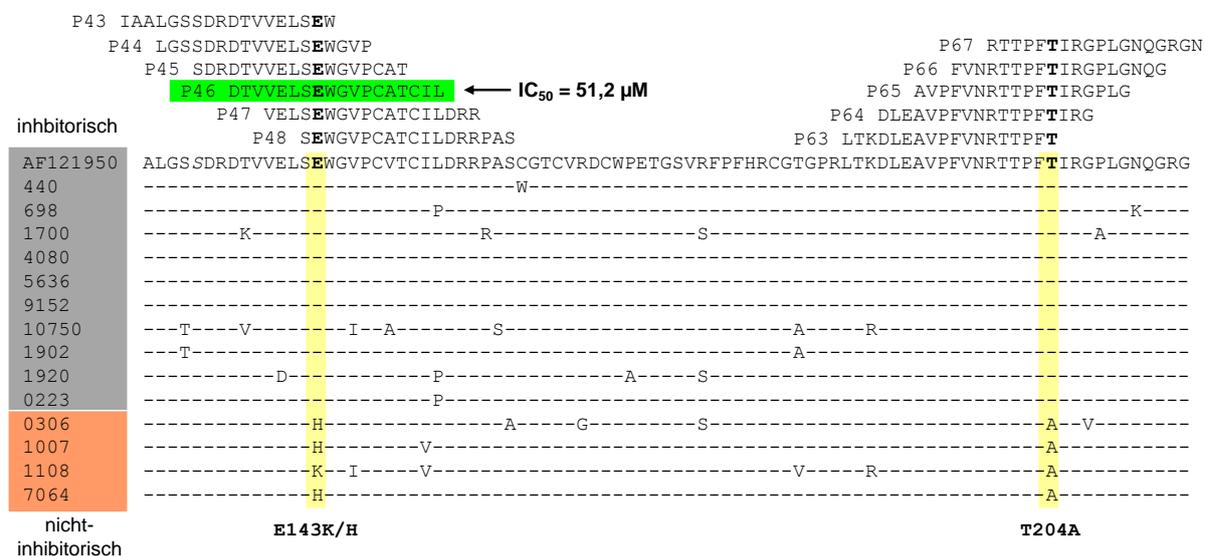
Aus den Dosis-Wirkungs-Versuchen wurde die inhibitorische Konzentration 50 bestimmt. Dabei handelt es sich um die Peptidkonzentration, bei der 50 % der HIV-1-infizierten Kulturen gehemmt werden (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: IC₅₀-Bestimmung ausgewählter 18mer-E2-Peptide in CEMx174-Zellen.Die Bestimmung der IC₅₀ erfolgte anhand der konzentrationsabhängigen HIV-1-Hemmung.

IC ₅₀ [µM]	P2	P11	P19	P20	P21	P23	P46	P89	P109
HIV-1 92UG024 CEMx174-Zellen	361,1	184,4	-	261,9	82,5	89,0	51,2	325,0	120,7

IC₅₀: Inhibitorische Konzentration 50; n.a.: nicht analysiert; -: Bestimmung nicht möglich.

Zusammenfassend charakterisieren die Daten der E2-Sequenzvergleiche und der E2-Peptidversuche einen Bereich des E2-Proteins (Aminosäure 136-153) mit dem in der vorliegenden Arbeit höchsten inhibitorischen Potential (IC₅₀ = 51,2 µM). Diese Sequenz schließt den Bereich des Aminosäureaustauschs E143K/H, der bei allen HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten beobachtet wurde, ein (Abbildung 4.18).

**Abbildung 4.18: Sequenzunterschiede im E2-Genbereich zwischen HIV-1-inhibitorischen und HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten sowie die entsprechenden 18mer-E2-Peptide.**

Inhibitorische Isolate: grau unterlegt; nichtinhibitorische Isolate: rot unterlegt Die gelben Balken zeigen zwei Aminosäureaustausche, die nur bei nichtinhibitorischen Isolaten zu beobachten waren.

Im räumlichen Modell (I-TASSER Software) für das E2-Protein wird deutlich, dass das Peptid P46 mit der Aminosäure E143, wie in Kapitel 4.4 bereits dargestellt, eine exponierte Position einnimmt (Abbildung 4.19). Die Aminosäure T204 wird in diesem Modell von anderen Aminosäuren überdeckt.

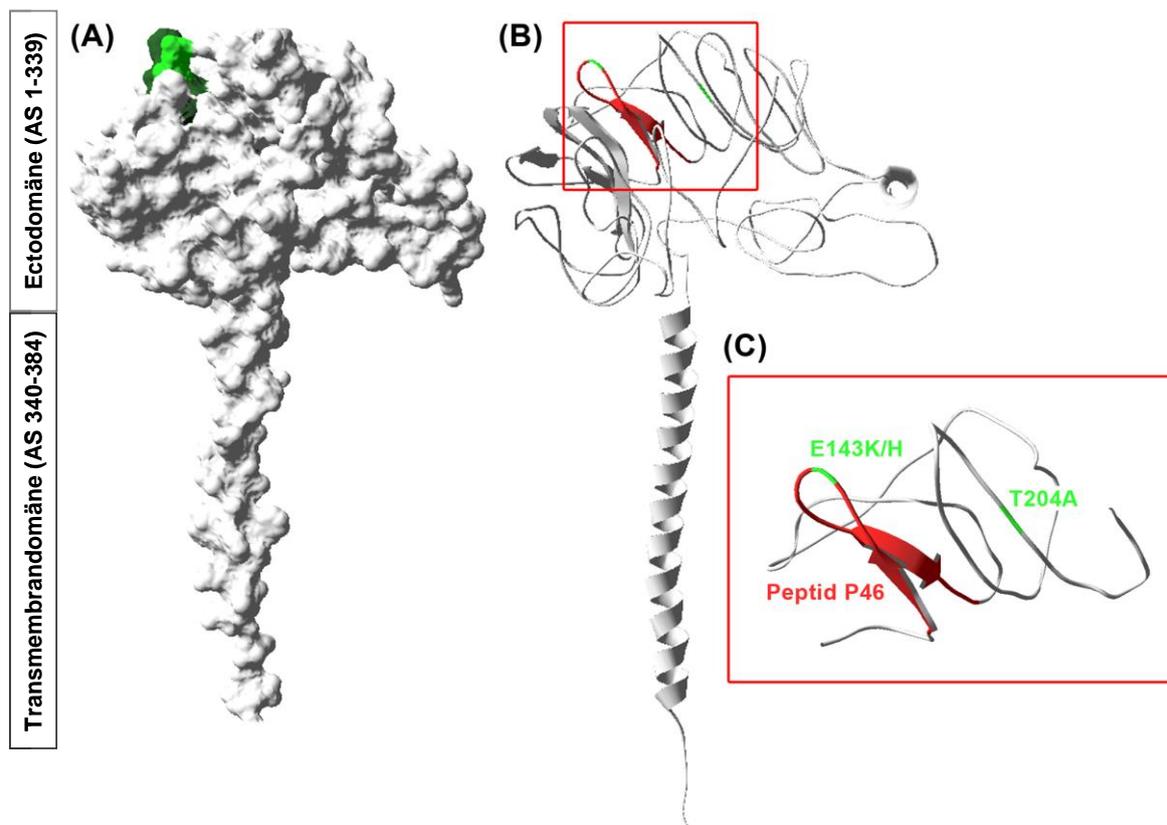
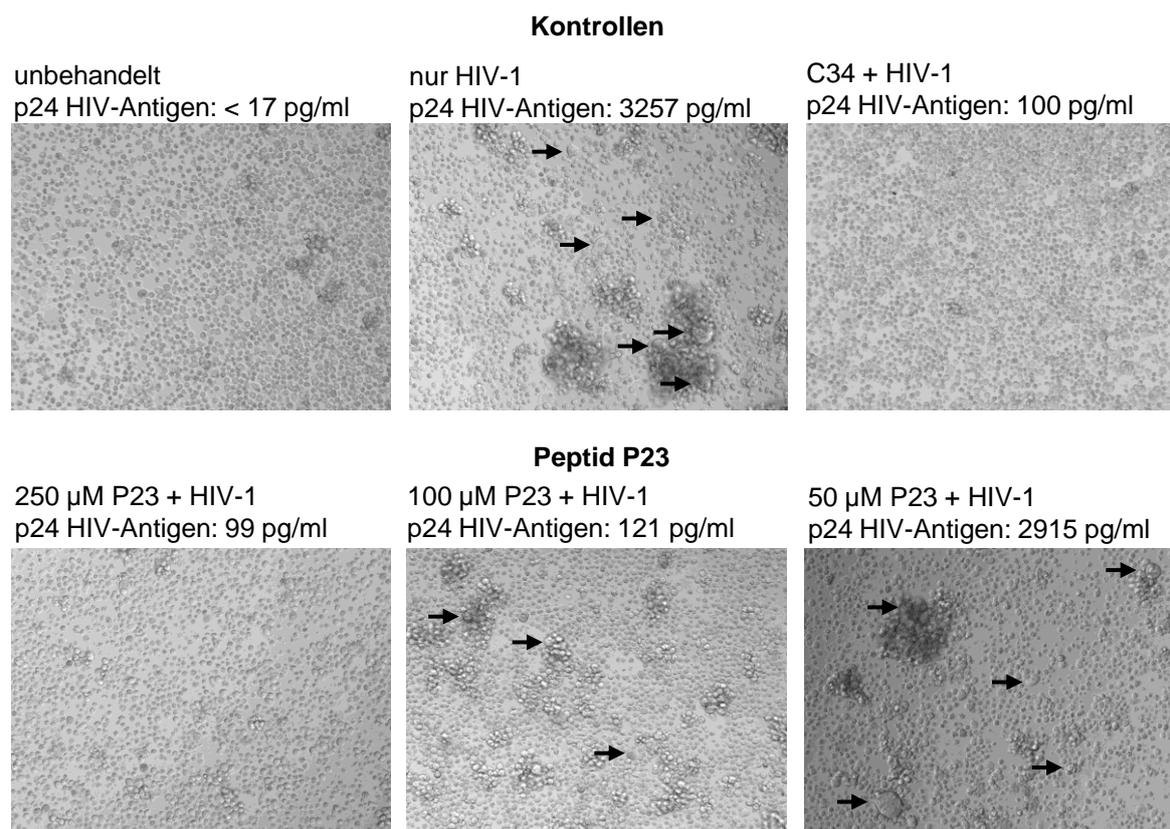


Abbildung 4.19: Räumliches Modell des GBV-C-E2-Proteins.

(A) Grün hervorgehoben sind die in HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten identifizierte Mutationen E143K/H und T204A. Im Gegensatz zum E143K/H liegt die Substitution an Position T204A in einer Vertiefung und ist von außen nicht sichtbar. (B) Sekundärstrukturen des E2-Proteins. (C) Vergrößerter Ausschnitt der Region mit den beiden Aminosäuresubstitutionen. Rot gekennzeichnet (B und C): das Peptid mit dem stärksten HIV-1-inhibitorischen Potential P46. Die Modellierung erfolgte mit Hilfe der I-TASSER-Software.

AS: Aminosäure; E: Glutamat; K: Lysin; H: Histidin; T: Threonin; A: Alanin.

Für die Versuche wurde ein CXCR4-tropes HIV-1-Isolat verwendet, das die Bildung von Synzytien induziert. Die Synzytienbildung unter Zugabe von E2-Peptiden wurde außerdem unter dem Mikroskop beobachtet. Hierbei konnte die HIV-1-hemmende Wirkung der Peptide auch auf die Synzytienbildung nachgewiesen werden. Zellen ohne HIV-1-Inokulum sowie mit C34 und HIV-1 inkubierte Zellen zeigten keine Synzytien. Zellen, die nur mit HIV-1 infiziert wurden, wiesen eine deutliche Synzytienbildung auf. Das Peptid P23 zum Beispiel war in der Lage, konzentrationsabhängig HIV-1 zu inhibieren und die Synzytienbildung zu reduzieren, wie Abbildung 4.20 zeigt. Dargestellt sind außerdem die Zellzahlen am Tag 6 nach Infektion für die jeweiligen Ansätze, um auszuschließen, dass die Abnahme der p24-Menge auf einen übermäßigen Verlust an vitalen Zellen zurückzuführen ist. Peptide mit vergleichbarer HIV-1-Inhibition zeigten adäquate Ergebnisse.



	Vitale Zellen [Zellen/Ansatz]	Tote Zellen [Zellen/Ansatz]	Gesamtzellzahl [Zellen/Ansatz]
Unbehandelt	420.000	166.667	586.667
Nur HIV-1	386.667	106.667	493.333
C34 + HIV-1	520.000	126.667	646.667
250 µM P23 + HIV-1	466.667	80.000	546.667
100 µM P23 + HIV-1	353.333	46.667	400.000
50 µM P23 + HIV-1	426.667	60.000	486.667

Abbildung 4.20: Lichtmikroskopische Beobachtungen der Synzytienbildung nach HIV-1-Infektion in Anwesenheit des E2-Peptids P23.

CEMx174-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen P23 (250 µM; 100 µM; 50 µM) und einem HIV-1-Isolat (92UG029) inkubiert und am Tag 6 nach Infektion dokumentiert (10-fache Vergrößerung). Die Pfeile markieren Synzytienbildung infolge der HIV-1-Infektion. Die Tabelle zeigt die Zellzahlen am Tag 6 nach Infektion für die jeweiligen Ansätze.

Peptide, die in der höchsten Konzentration eine Hemmung der HIV-1-Replikation zeigten, wiesen auch eine Hemmung der Synzytienbildung auf. Ausnahmen stellten dabei die Peptide P36, P37, P40 und P120 dar. In Ansätzen dieser vier Peptide konnten Synzytien beobachtet werden, die HIV-1-Replikation war gleichzeitig zu mindestens 85 % gehemmt. In Ansätzen, die mit nichthemmenden Peptiden inkubiert wurden, war eine zur Infektionskontrolle (nur HIV-1) vergleichbare Synzytienanzahl zu beobachten. Für die am stärksten hemmenden Peptide konnte grundsätzlich auch die beste Hemmung der Synzytienbildung beobachtet werden. Dabei nahm die Menge an Synzytien in Abhängigkeit von der gemessenen p24-

Konzentration zu. Eine Abnahme des inhibitorischen Potentials begünstigte die Bildung von Synzytien.

Um eine objektive Bewertung der mikroskopischen Auswertung zu gewährleisten, wurden die Beobachtungen ebenso wie die Zellzahlbestimmungen vor Durchführung des ELISA vorgenommen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente, mittels synthetischer E2-Peptide die HIV-1-Replikation zu inhibieren, zeigen, dass im E2-Protein des GBV-C Sequenzabschnitte in der Lage sind, HIV-1 zu hemmen. Dabei war die Stärke der Hemmung konzentrationsabhängig und für jedes Peptid verschieden. Außerdem ging mit der Hemmung der HIV-1-Replikation oft eine Synzytienreduktion einher.

4.3.6 Analyse der IRES-Aktivität klinischer GBV-C-Isolate

Die Synthese möglicher inhibitorischer GBV-C-Proteine unterliegt der Kontrolle der IRES. Dosis-Wirkungs-Kurven für die E2-Peptide und die dosisabhängige Hemmung der HIV-1-Replikation durch klinische GBV-C-Isolate (Kapitel 4.3) zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts. Für das dem GBV-C nächstverwandte Virus, HCV, sind unterschiedlich aktive IRES bekannt [203Forton et al. 2004]. Um zu untersuchen, ob die IRES-Aktivität ursächlich für den HIV-1-inhibitorischen Phänotyp sein könnte, wurden verschiedene GBV-C-Isolate untersucht.

4.3.6.1 Sequenzierreaktion der IRES aus klinischen GBV-C-Isolaten

Die IRES von GBV-C weist eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf, die für die Funktion der IRES entscheidend ist. Ein direkter Nachweis dieser Sekundärstruktur ist jedoch nicht möglich. Mittels hypothetischer Modelle, die auf kalorimetrischen Berechnungen und Sequenzvergleichen beruhen, kann eine Annäherung an den tatsächlichen Zustand erfolgen. Ein Modell von Simons et al. [1161996] für die IRES von GBV-C ist in Abbildung 4.21 dargestellt.

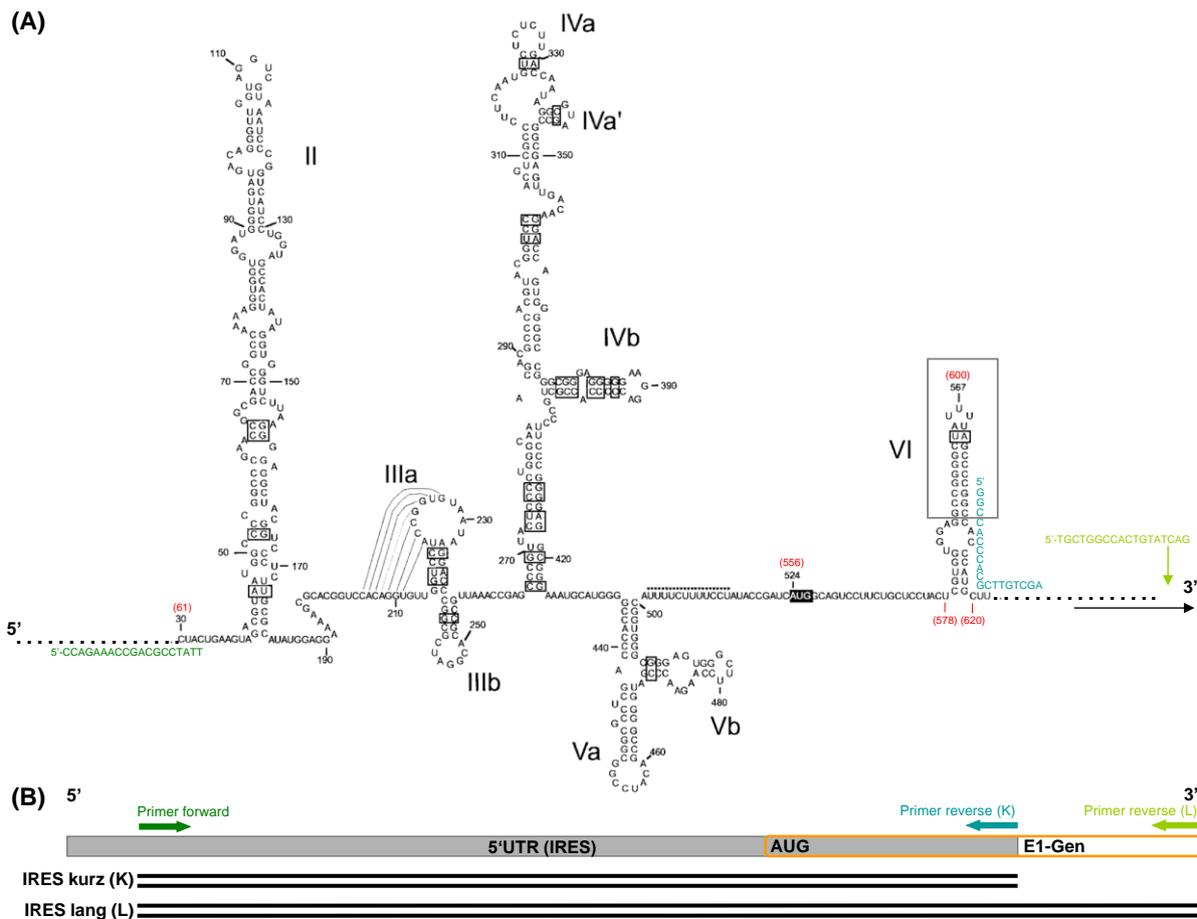


Abbildung 4.21: Modell der Sekundärstruktur der IRES aus GBV-C (5'-NTR).

Anhand der Referenzsequenz U36380 ist das hypothetische Modell der Sekundärstruktur der GBV-C-IRES dargestellt. (A) Primersequenzen mit entsprechenden Produkten sind farbig gekennzeichnet. Die römischen Zahlen bezeichnen Helices und Bereiche mit Doppelstrangbildung. Schwarz unterlegt ist der Start der Translation, farbige Sequenzen bilden die verwendeten Primer ab. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Position des Nukleotids, bezogen auf die Referenzsequenz AF121950 [verändert nach ¹¹⁶Simons et al. 1996]. (B) Schematische Darstellung der IRES und der Primer, die für die beiden PCR „IRES kurz“ und „IRES lang“ verwendet wurden. K: kurzes IRES-Fragment (nt46-627); L: langes IRES-Fragment (nt46-752).

Der Sequenzvergleich der IRES verschiedener Isolate erfolgte nach der DNA-Sequenzierung. Bei der Auswertung der IRES-Sequenzierungen zeigte sich übereinstimmend in allen Reaktionen, unabhängig vom verwendeten Primer, einen Abbruch der Sequenzierung in derselben Region zwischen Nukleotid 592 und 608 vor dem Stemloop der Helix VI (grauer Rahmen in Abbildung 4.21). Dieser Bereich zeichnet sich durch einen hohen G/C-Gehalt aus.

Um methodische Fehler wie z. B. eine suboptimale Annealing- oder eine zu geringe Elongationstemperatur als Ursache für den Abbruch der Sequenzierungsreaktion auszuschließen, wurden verschiedene Protokolle getestet. Zusätzlich erfolgte die parallele Sequenzierung in zwei unterschiedlichen Institutionen (IZKF Core-Unit DNA Technologies, Leipzig/D und MWG, Ebersberg/D). Die Veränderung der Annealingtemperatur ergab keine Verbesserung der Sequenzierungsergebnisse. Aufgrund des hohen GC-Gehalts der Helix VI wurde mit beiden Herstellerfirmen eine Erhöhung der Elongationstemperatur vereinbart. Neben der

standardmäßigen Elongationstemperatur von 50 °C (MWG) bzw. 60 °C (IZKF) wurden zusätzlich 40 °C, 55 °C, 65 °C und 68 °C getestet. Keine der Variationen der Standardreaktion ergab für die im IZKF durchgeführten Sequenzierreaktionen eine signifikant bessere Sequenz. Lediglich für 65 °C und 68 °C konnte bei MWG eine Sequenz mit einem auswertbaren Signal für den Bereich zwischen Nukleotid 592 und 608 erzielt werden; danach jedoch brach die Sequenz ab. Daher mussten die Sequenzen aus verschiedenen Reaktionen zusammengesetzt werden. Eine noch höhere Temperatur für die Sequenzierreaktion war nach Aussage der beiden Unternehmen nicht sinnvoll. Die Ergebnisse der Sequenzierreaktionen sind in Abbildung 4.22 für vier GBV-C-Isolate dargestellt.

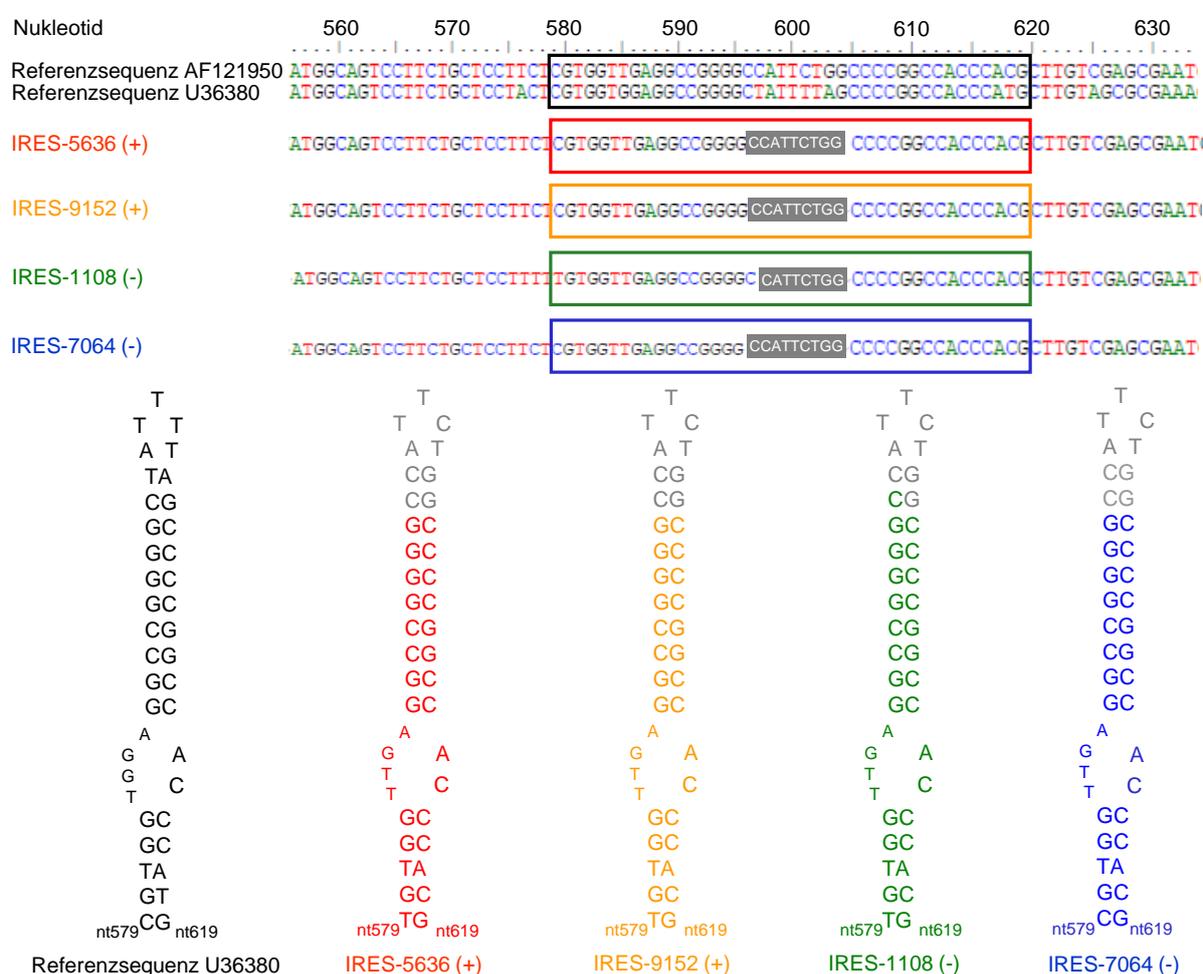


Abbildung 4.22: Vergleich der Sequenzierreaktion verschiedener GBV-C-Isolaten unter Standardbedingungen.

Der Sequenzvergleich erfolgte anhand der Referenzsequenzen AF121950 und U36380. Die Sequenzbereiche in den Kästen sind entsprechend der Farbkodierung unten als Sekundärstruktur dargestellt. Schwarz: Referenzsequenz U36380, gelb: IRES-9152, rot: IRES-5636, grün: IRES-1108, blau: IRES-7064, HIV-1-Hemmer bzw. -Nichthemmer sind mit (+) bzw. (-) gekennzeichnet. Die farbigen Kästen symbolisieren den Bereich der Helix VI aus Abbildung 4.21. Bereiche, die schwer sequenzierbar waren, sind grau unterlegt.

4.3.6.2 Klonierung ausgewählter GBV-C-IRES

Die in Tabelle 4.8 dargestellten IRES-Sequenzen verschiedener klinischer GBV-C-Isolate mit unterschiedlicher Fähigkeit zur Inhibition der HIV-1-Replikation, wurden in einen Doppelluziferasevektor (DCV) integriert.

Tabelle 4.8: Für die Klonierung verwendete IRES-Sequenzen.

Die GBV-C-Isolate sind nach ihrem in Kapitel 4.3 beobachteten HIV-1-inhibitorischen Phänotyp in vitro gruppiert. Die EMCV-IRES diente als Kontrolle.

GBV-C-Isolate mit HIV-1-inhibitorischem Phänotyp	GBV-C-Isolate mit HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp	Kontrolle
5636	0306	EMCV
9152	1108	
	1223	
	7064	

Abbildung 4.23 zeigt die beiden möglichen Endvektoren.

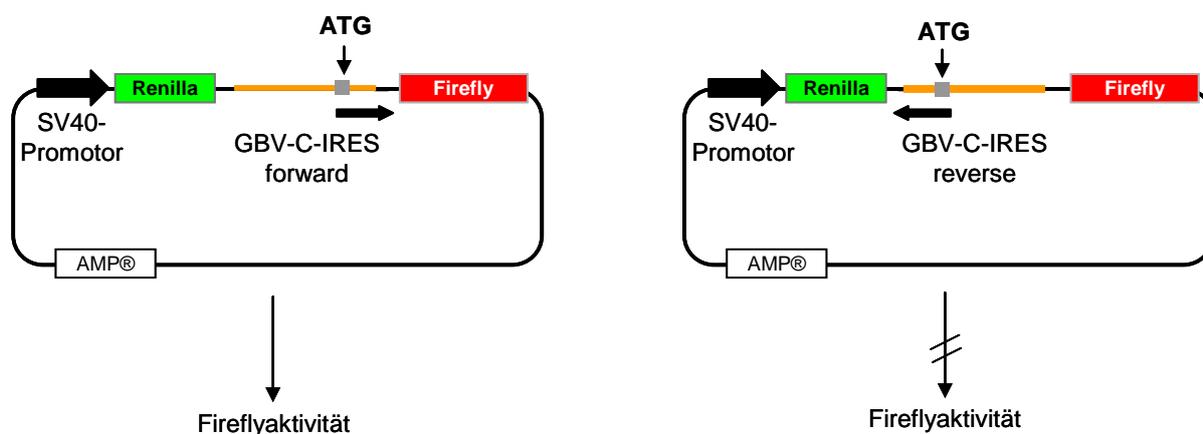


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der klonierten GBV-C-IRES-Expressionsplasmide.

Einem SV-40-Promotor nachgeschaltet ist die Renillaluziferase, der die forward oder reverse integrierte GBV-C-IRES folgt. An diese schließt sich die Fireflyluziferase an. Die IRES, in Forward-Orientierung in den Vektor kloniert, führt zur Expression der Fireflyluziferase (links), während Klone mit reverse-orientierter IRES kein Fireflyluziferasesignal zeigen sollten. Das ATG und der Pfeil kennzeichnen den Translationsstart und die Translationsrichtung der IRES. Die Plasmide mit einer EMCV-IRES sind vergleichbar aufgebaut.

Von ausgewählten Konstrukten mit forward und zu Kontrollzwecken mit reverse integrierter GBV-C-IRES wurde im Folgenden die IRES-Aktivität untersucht. Hierfür fanden zunächst IRES-Fragmente Verwendung, die die gesamte IRES bis in den kodierenden Bereich für das E1 (nt46-752 = „IRES lang“, vgl. Abbildung 4.21B) umfassten.

Die Durchführung der PCR zur Amplifikation der IRES war mit vergleichbaren Problemen verbunden wie die Sequenzierreaktion.

4.3.6.3 Aktivität der GBV-C-IRES in verschiedenen Zelllinien

Da die Expression von Proteinen von der verwendeten Zelllinie abhängen kann, wurden drei verschiedene Zelllinien auf ihre Eignung untersucht: 293T-, HeLa- und Huh-7-Zellen. 293T-Zellen (humane embryonale Nierenkarzinomzellen) stellen aufgrund ihrer guten Transfektionseffizienz ein bewährtes Zellkultursystem dar. Cao et al. [210-2009] wiesen in hepatozellulären Huh-7-Zellen die Replikation subgenomischer GBV-C-Replikons nach, weshalb sie als zweite Zelllinie gewählt wurde. Als dritter Zelltyp wurden HeLa, eine zervikale Karzinomzelllinie, verwendet. Mit Hilfe eines pEGFP-F-Plasmids wurde die Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche für jede Zelllinie durchgeführt (Abbildung 4.24).

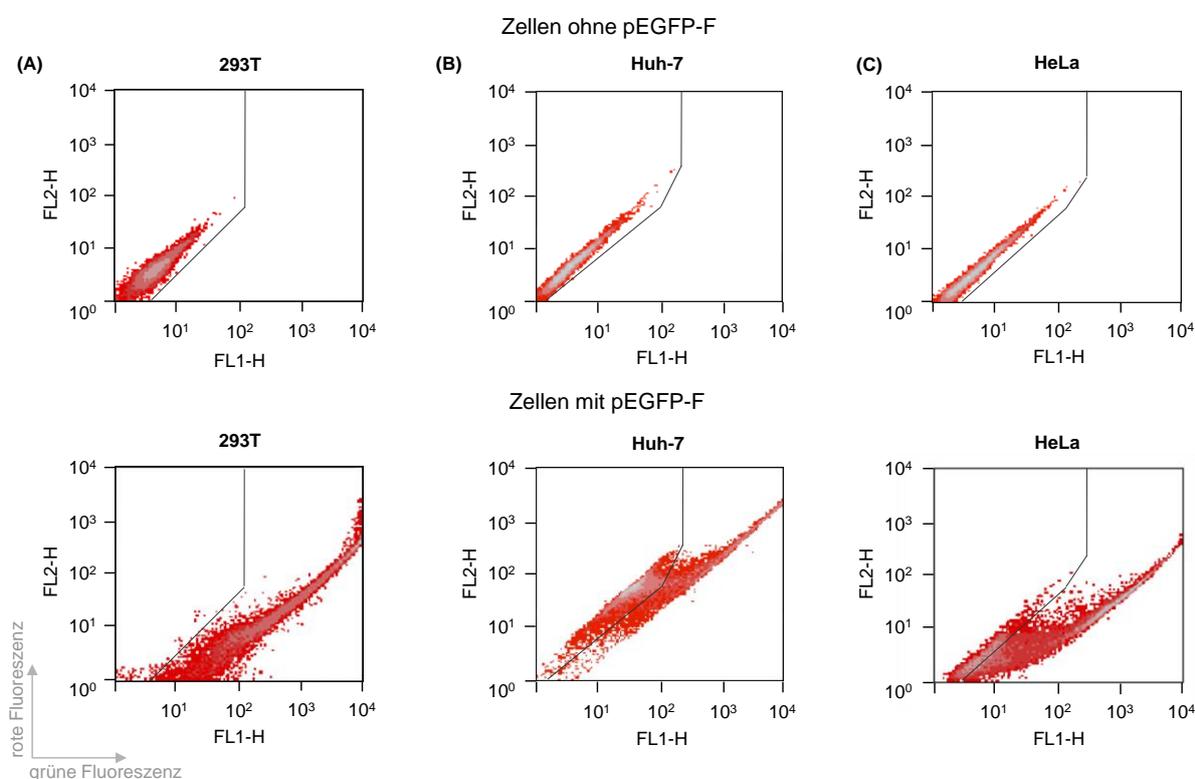


Abbildung 4.24: Vergleich der Transfektionseffizienzen verschiedener Zelllinien.

Die Bestimmung erfolgte über Transfektion von (A) 293T, (B) Huh-7 und (C) HeLa mit pEGFP und Analyse mittels Durchflusszytometrie nach 48 Stunden. Dargestellt ist die Fluoreszenz der transfizierten Zellen ohne pEGFP (oben) und die Fluoreszenz der mit pEGFP-transfizierten Zellen (unten). Die Transfektionseffizienz lag im dargestellten Einzelexperiment für 293T bei 96 %, für Huh-7 bei 38 % und für HeLa bei 64 %.

FL1: grüne Fluoreszenz; FL2-H: rote Fluoreszenz.

Die in allen Experimenten ermittelte Transfektionseffizienz unterschied sich zwischen den drei untersuchten Zelllinien. 293T-Zellen ließen sich im Mittel (Standardabweichung) mit einer Effizienz von 97 % ($\pm 1,4$) am besten transfizieren. HeLa- (68,8 % $\pm 7,7$) und Huh-7-Zellen (39,5 % $\pm 2,1$) wiesen deutlich schlechtere Werte auf.

Da sich jedoch von der Aktivität des Promotors im pEGFP-Plasmid nicht auf die IRES-gesteuerte Expression schließen ließ, wurden zusätzlich Kontrollvektoren in allen drei

Zelllinien transfiziert und auf ihre Luziferaseaktivität getestet. Es standen ein DCV ohne GBV-C-IRES sowie ein DCV mit einer GBV-C-IRES, die eine bekannte hohe Aktivität aufwies und ein DCV mit einer bekannten niedrigen Aktivität zur Verfügung [unveröffentlichte Daten Peter Karyiannis, Daniel Forton].

Analog zu den durchflusszytometrischen Analysen war die Expression der Fireflyluziferase in 293T-Zellen deutlich höher als in den anderen beiden Zelllinien. Hierbei wies die Fireflyluziferase in Huh-7-Zellen eine höhere Aktivität auf als nach der Transfektion in HeLa (Abbildung 4.25A). Die Transfektionseffizienz der Ansätze innerhalb der verschiedenen Zelllinien war vergleichbar. Auch nach Normalisierung der Fireflyluziferasesignale mit Hilfe der Renillaluziferase blieb die höhere IRES-Aktivität für 293T-Zellen erhalten (Abbildung 4.25B).

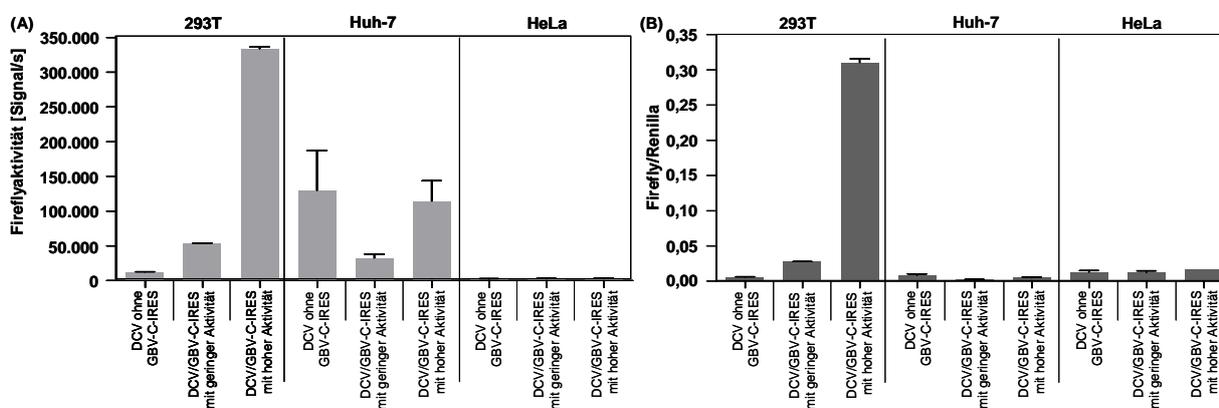


Abbildung 4.25: Vergleich der GBV-C-IRES-Aktivität in verschiedenen Zelllinien.

Dargestellt ist (A) die Fireflyaktivität für 3 verschiedene Vektoren und (B) das Verhältnis Firefly/Renilla. Getestet wurden die humanen Zelllinien 293T, Huh-7 und HeLa im Doppelansatz.

Parallel zur FACS-Analyse konnten auch für die Aktivität der IRES deutliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zelllinien mit den besten Ergebnissen für 293T-Zellen nachgewiesen werden. Die GBV-C-IRES-Aktivitäten zeigten zudem die gleichen Ausprägungen, wie sie von der Arbeitsgruppe um P. Karyiannis nachgewiesen wurden [persönliche Mitteilung]. Damit konnte bestätigt werden, dass das etablierte experimentelle System zuverlässig funktioniert und wie dargestellt eingesetzt werden kann. Basierend auf dem Vergleich der Expression der Proteine Renilla- und Fireflyluziferase sowie des EGFP in den Zelllinien 293T, HeLa und Huh-7 wurden für alle weiteren Versuche 293T-Zellen verwendet.

4.3.6.4 Einfluss der GBV-C-IRES-Aktivität auf die HIV-1-Replikation

Eingangs wurden IRES-Fragmente untersucht, die das Startcodon für die Translation (nt524) sowie die ersten Nukleotide des E1-Genbereichs beinhalten (nt46-752, vgl. Abbildung 4.21(B), versehen mit dem Zusatz L): das Isolat 5636, das in vitro die HIV-1-Replikation hemmt, und das Isolat 7064 mit einem HIV-1-nichtinhibitorischen Phänotyp (siehe Kapitel 4.3.3). Für jedes Isolat erfolgte die Untersuchung der IRES-Aktivität in mindestens drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. Darüber hinaus wurden für jedes GBV-C-Isolat mehrere Klone mit der jeweiligen IRES in Forward- und in Reverse-Orientierung getestet. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine EMCV-IRES ebenfalls in Forward- und Reverse-Orientierung im gleichen System wie die GBV-C-IRES untersucht.

Die EMCV-IRES führte in Forward-Orientierung erwartungsgemäß zu einer deutlich stärkeren Expression der Fireflyluziferase als in der Reverse-Orientierung ($p = 0,0238$). Im Fall der IRES der GBV-C-Isolate wiesen die in Forward-Orientierung klonierten IRES beider Isolate mit lediglich 6 bis 13 % geringere Aktivitäten auf als die EMCV-Kontroll-IRES. Die IRES-Aktivitäten beider Isolate unterschieden sich nicht voneinander. Im Gegensatz dazu zeigte die in Reverse-Orientierung integrierte IRES für das Isolat 7064(L) eine deutlich höhere Aktivität als die entsprechenden in Forward-Orientierung inserierten IRES-Fragmente ($p = 0,0032$). Auch für die IRES-Aktivität des Isolats 5636 war dies, wenn auch weniger ausgeprägt, mit signifikantem Unterschied zu beobachten ($p = 0,0037$).

Aufgrund der deutlich geringeren Fireflyaktivitäten im Vergleich zu den EMCV-Kontrollvektoren wurde zusätzlich eine verkürzte IRES untersucht. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass durch die kodierende C-terminal gelegene E1-Sequenz im Zuge der posttranslationalen Prozessierung des Aminosäurestrangs die Expression der Fireflyluziferase nicht gewährleistet ist. Analog zur bereits beschriebenen Klonierung (Abbildung 2.1) wurden die GBV-C-Isolate in den DCV integriert. Dazu wurden Primer verwendet, die ein PCR-Fragment von Nukleotid 46 bis 627 amplifizieren (vgl. Abb. 4.24(B), versehen mit dem Zusatz K). Auch hier erfolgte die Analyse von mehreren Klonen des gleichen Isolats.

Im Vergleich der beiden unterschiedlich langen IRES-Sequenzen (L: nt46-752 und K: nt46-627) konnte eine signifikante Steigerung der Aktivität der IRES für die „kurze“ Sequenz beobachtet werden (forward IRES(L)nt46-752 vs. forward IRES(K)nt46-627 $p = 0,0007$; reverse IRES(L)nt46-752 vs. reverse IRES(K)nt46-627 $p = 0,0091$). Gegenüber der EMCV-IRES betrug die Steigerung der Aktivität der kurzen IRES-Sequenzen jedoch lediglich maximal 6 %. Unterschiede zwischen der IRES-Aktivität des HIV-1-inhibitorischen Isolats 5636 und des HIV-1-nichtinhibitorischen Isolats 7064 waren auch mit der verkürzten IRES-Sequenz nicht nachweisbar. Analog zur Beobachtung mit der langen IRES-Sequenz lagen signifikante Unterschiede bezüglich der IRES-Aktivität der jeweiligen forward und reverse inserierten Sequenzen für beide GBV-C-Isolate vor (IRES-5636(K): $p = 0,0001$;

IRES-7064(K): $p = 0,0001$). Abbildung 4.26 fasst die Aktivitäten für die IRES beider GBV-C-Isolate mit der jeweiligen langen und kurzen Sequenz zusammen.

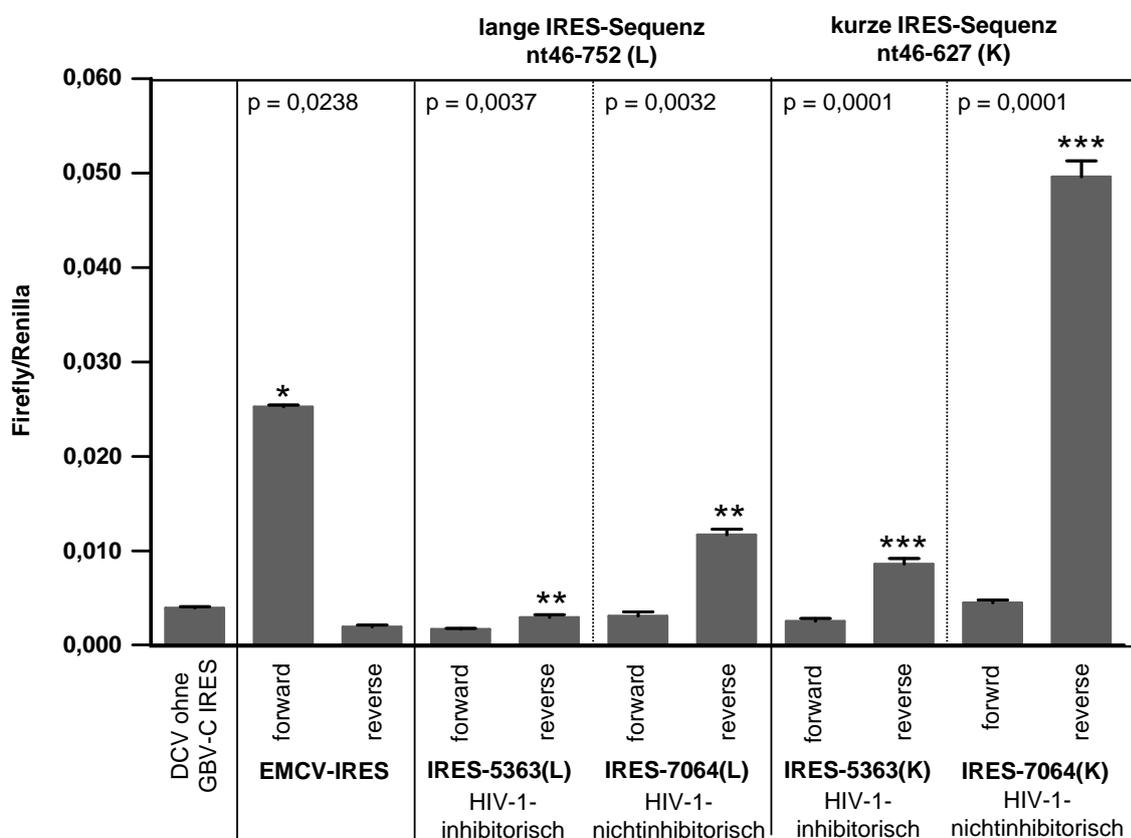


Abbildung 4.26: Vergleich der IRES-Aktivitäten von zwei klinischen GBV-C-Isolaten mit langer und kurzer Sequenz.

Gezeigt werden Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Doppelansatz mehrerer Klone des gleichen Vektors. Zum Vergleich diente ein DCV ohne GBV-C-IRES sowie eine analog zur GBV-C-IRES behandelte IRES des EMCV. * zeigen statistische signifikante Unterschiede zwischen forward und reverse integrierten Sequenzen.

(L): langes IRES-Fragment (nt46-752); (K): kurzes IRES-Fragment (nt46-627).

Zusätzlich zu den GBV-C-Isolaten 5636 und 7064 wurden die IRES mit der kurzen Sequenz von vier weiteren GBV-C-Isolaten untersucht, um die Beobachtungen zu validieren. Bei den GBV-Isolaten handelte es sich um ein Isolat mit HIV-1-inhibitorischem Phänotyp (9152) und um drei Isolate mit HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp (0306, 1108, 1223).

Die Aktivitäten der IRES zeigten zu den Isolaten 5636 und 7064 vergleichbare Ergebnisse. Inhibitorische und nichtinhibitorische Isolate in Forward-Orientierung wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Für die Konstrukte mit der jeweiligen IRES in Reverse-Orientierung waren analog zu den beiden ersten Isolaten signifikant höhere Aktivitäten nachweisbar (Abbildung 4.27).

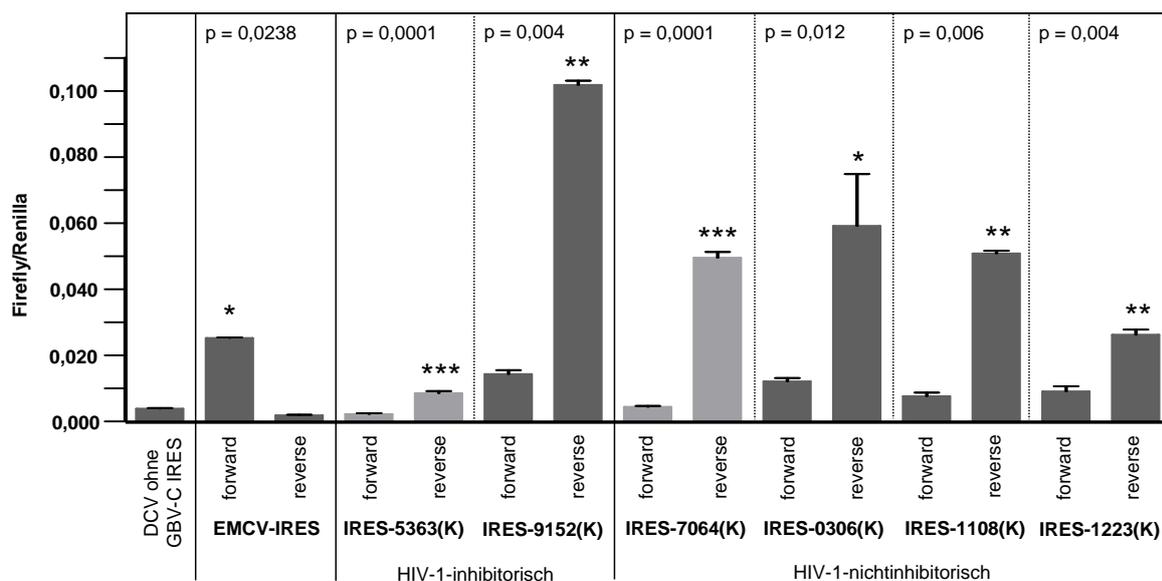


Abbildung 4.27: Vergleich der Aktivitäten der untersuchten GBV-C-IRES mit kurzer Sequenz.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Aktivität verschiedener Klone des gleichen Konstrukts aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. Die Isolate 5636 und 7064 (vgl. Abbildung 4.26) sind zur besseren Übersicht mit abgebildet (hellgraue Säuen). * statistisch signifikante Unterschiede zwischen den forward und reverse integrierten IRES des gleichen Isolats.

(K): kurzes IRES-Fragment (nt46-627).

Zusammenfassend war im Rahmen dieser Arbeit keine Korrelation hinsichtlich der IRES-Aktivität und dem HIV-1-inhibitorischen Phänotyp nachweisbar, da die untersuchten IRES-Sequenzen klinischer GBV-C-Isolate mit unterschiedlichem HIV-1-inhibitorischem Phänotyp sich in Forward-Orientierung nur unwesentlich bezüglich der Aktivität, gemessen durch die Bestimmung der Fireflyluziferaseaktivität in 293T-Zellen, unterschieden. Auffällig war jedoch die signifikant erhöhte Expression der Fireflyluziferase, wenn die IRES unabhängig von ihrem Phänotyp in Reverse-Orientierung in den Vektor kloniert wurde. Die als Kontrolle mitgeführte EMCV-IRES in Forward- und Reverse-Orientierung zeigte die erwarteten hohen Expressionen der Firefly-Luziferase bei forward orientierter IRES im Gegensatz zu einer sehr geringen Expression bei reverse orientierter IRES.

5. DISKUSSION

HIV stellt weltweit eines der größten Gesundheitsprobleme dar, und obwohl die Zahlen der Neuinfektionen in den letzten Jahren rückläufig sind, steigt die Anzahl der Menschen, die mit dem HI-Virus leben [²¹¹UNAIDS report 2009, ⁵⁰UNAIDS report 2010]. Aufgrund der Beeinträchtigung des Immunsystems durch HIV-1 spielen Koinfektionen eine prominente Rolle im Krankheitsverlauf. Vor allem Viren, welche die gleichen Übertragungswege nutzen, sind häufig mit einer HIV-1-Infektion assoziiert. Hierzu zählen die hepatitisinduzierenden Viren HBV und HCV. Die mit der Dauer der HIV-1-Infektion zunehmenden opportunistischen Infektionen, aber auch die zahlreichen anderen Koinfektionen, führen zu einer höheren HIV-1-Viruslast und einer schnelleren HIV-1-Progression [²¹²Herrero et al. 2007, ²¹³Thio et al. 2009]. Überraschenderweise konnten in chronisch mit dem Flavivirus GBV-C infizierten HIV-1-Patienten durch mehrere Autoren übereinstimmend ein Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Infektion und einem verbesserten Krankheitsverlauf für HIV-1-positive Patienten festgestellt werden [¹⁰Tillmann et al. 2001, ¹⁵⁴Williams et al. 2004, ¹²Zhang et al. 2006]. Epidemiologische Studien beweisen jedoch keinen kausalen Zusammenhang und gestatten zudem keine Aussage darüber, ob es sich bei GBV-C lediglich um einen Marker für einen bisher unbekanntem Effektor oder um eine genetisch bedingte Determinante, wie zum Beispiel die delta32-Mutation im CCR5-Rezeptor (CCR5 Δ 32), handelt, die eine Resistenz gegen CCR5-trope HIV-1-Isolate vermittelt [²¹⁴Huang et al. 1996, ²¹⁵Biti et al. 1997]. Daher sollte der positive Effekt von GBV-C auf HIV-1 durch Zellkulturexperimente untersucht werden. Die Aufklärung des Mechanismus, welcher der GBV-C-vermittelten HIV-1-Inhibition zugrunde liegt, könnte den Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen.

GBV-C lässt sich ähnlich wie HCV nur schlecht in etablierten Zelllinien anzüchten. Für die vorliegende Arbeit war deshalb der Aufbau einer GBV-C-Serumbank erforderlich, um ausreichend GBV-C-positives Material zur Verfügung zu haben. Ein weiteres Ziel war es, ein Zellkultursystem zu etablieren, das die Replikation von GBV-C und HIV-1 ermöglicht und so Untersuchungen zur viralen Interferenz beider Viren unter standardisierten Bedingungen gestattet. Im Rahmen molekularbiologischer Analysen sollten für den inhibitorischen Effekt auf HIV-1 ursächliche GBV-C-Proteine identifiziert und näher charakterisiert werden. Unter der Annahme, dass die Proteinexpression und damit auch die Konzentration von potentiellen HIV-1-inhibitorischen GBV-C-Proteinen von der Aktivität der IRES im N-terminalen Abschnitt des viralen Genoms abhängen und sie dadurch maßgeblich Einfluss auf die GBV-C-vermittelte HIV-1-Hemmung haben könnten, wurde abschließend das HIV-1-inhibitorische Potential verschiedener klinischer GBV-C-Isolate und die Translationsaktivität ihrer IRES untersucht.

5.1 EXTRAKTION VON GBV-C-RNA

Da GBV-C bislang mit keiner Erkrankung des Menschen assoziiert ist, wird heute davon ausgegangen, dass es sich um ein humanotropes, jedoch nicht humanpathogenes Virus handelt. Aufgrund dessen wird im Rahmen der Blutspende nicht routinemäßig auf GBV-C getestet, obwohl GBV-C über Blut und Blutprodukte übertragen wird. Für die in der vorliegenden Arbeit zu etablierende Serumbank GBV-C-positiver Isolate war es erforderlich, effiziente RNA-Extraktionssysteme zu identifizieren.

Da der Probenaufschluss und die Extraktion GBV-C-spezifischer RNA maßgeblich die Menge der für die quantitative RT-PCR verfügbaren RNA beeinflussen, wurden unterschiedliche RNA-Extraktionssysteme geprüft. Für die drei getesteten Kits (High Pure Viral RNA Kit, Viral RNA Mini Kit und NucleoSpin® RNA Virus Kit) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Extraktionssystemen, wobei aufgrund der höchsten erzielten RNA-Aufreinigungseffizienz im weiteren Verlauf mit dem Viral RNA Mini Kit gearbeitet wurde. Das Prinzip aller drei Aufreinigungssysteme beruht auf der Lyse der Viruspartikel und der Aufreinigung der freigesetzten viralen RNA mittels Silicamembran. Herstellerbedingte Variationen der Membranzusammensetzungen und der verwendeten Puffer können Einfluss auf die RNA-Extraktionseffizienz der einzelnen Systeme haben. Da die genauen Membran- und Pufferzusammensetzungen vom jeweiligen Hersteller jedoch nicht publiziert sind, ist eine Diskussion, inwieweit eine der Komponenten ursächlich für die unterschiedliche Effizienz der einzelnen Systeme ist, nicht möglich.

5.2 INTERFERENZ VON GBV-C MIT HCV1 UND/ODER HIV-1 IM PATIENTEN

5.2.1 GBV-C-Prävalenz in Studienkollektiven mit unterschiedlichem Transmissionsrisiko für blutübertragene Viren

5.2.1.1 GBV-C-Prävalenz in Blutspendern und Aufbau einer GBV-C-Serumbank

In westlichen Industrieländern sind durchschnittlich 2 % der Blutspender virämisch. Um für die späteren Versuche auf mindestens 20 klinische GBV-C-Isolate zurückgreifen zu können, wurden 1535 freiwillige Blutspender vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Leipzig ohne bekannte HAV-, HBV-, HCV- oder HIV-1-Infektion auf das Vorliegen von GBV-C-RNA untersucht. Die GBV-C-Prävalenz in dieser Kohorte war mit 2,7 % vergleichbar mit GBV-C-Prävalenzen in anderen Industrienationen [¹⁰¹Simons et al. 1995, ¹⁰²Linnen et al. 1996, ¹⁴⁴Dille et al. 1997, ¹⁴⁵Nordbo et al. 2000, ¹⁴⁶Christensen et al. 2003].

Mit dem in der etablierten GBV-C-Serumbank enthaltenen Seren stand für die geplanten Untersuchungen ausreichend infektiöses Material zur Verfügung. Durch die portionierte Lagerung bei -80 °C konnten die Degradation der GBV-C-Partikel und die Abnahme der

Infektiösität der Viren, die sonst durch Auftau- bzw. Einfrierzyklen reduziert wäre, minimiert werden. Somit war für diese GBV-C-Serumbank eine gleichbleibend hohe Qualität der GBV-C-Virusstocks gewährleistet.

5.2.1.2 GBV-C-Prävalenz in der HIV-1- und HGDS-Kohorte

Im Vergleich zu den nichtexponierten Blutspendern ist die GBV-C-Prävalenz in Hochrisikogruppen wie HCV- oder HIV-1-Patienten sowie intravenös drogenabhängigen Probanden signifikant erhöht. In diesen Patientenkollektiven sind bis zu 45 % der Personen mit GBV-C infiziert [¹⁶⁰Heringlake et al. 1996, ¹⁵¹Tacke et al. 1997a, ¹³⁸Alter et al. 1997, ¹⁶⁸Vogt et al. 2006, ¹⁶⁹Tassopoulos et al. 2008]. Auch Hämophilie-Patienten haben ein erhöhtes Infektionsrisiko für bestimmte Pathogene. Insbesondere die Exposition gegenüber Blut und Blutprodukten führte vor der Einführung der Hitzeinaktivierung in der Transfusionsmedizin dazu, dass die meisten der vor 1985 infizierten adulten Hämophilen neben HIV-1 zusätzlich mit HCV infiziert wurden [²¹⁶Manucci et al. 1991, ²¹⁷Morfini et al. 1994]. Auch der Nachweis von durch Blut übertragenen Viren war jeweils erst einige Jahre nach der Entdeckung von HCV bzw. HIV-1 möglich, was zusätzlich zu den hohen Infektionsraten exponierter Personen beitrug. So war für HIV-1 vier Jahre nach der Erstbeschreibung ein erster HIV-p24-ELISA verfügbar [²¹⁸Webseite des NIH, ²¹⁹Montagnier 2002]. Für HCV wurde 1992, drei Jahre nach seiner Entdeckung, ein Bluttest zugelassen. Dieses erhöhte Infektionsrisiko war auch für die juvenilen Probanden der HGD-Studie zu verzeichnen [²⁰²Loveland et al. 1994, ²⁰⁰Daar et al. 2001]. Sie bieten die seltene Möglichkeit, gleichzeitig HCV- und HIV-1-positive bzw. HCV-positive aber HIV-1-negative Probanden und den Einfluss einer gleichzeitigen GBV-C-Infektion in Abhängigkeit vom Alter der Studienteilnehmer zu analysieren.

Im Vergleich zu gesunden Blutspendern war die GBV-C-Prävalenz in den Studienkollektiven mit erhöhtem Transmissionsrisiko für blutübertragene Viren erwartungsgemäß signifikant erhöht. Die geringere GBV-C-Infektionsrate bei den hämophilen Kindern und Jugendlichen der HGDS-Kohorte im Vergleich zum Risikokollektiv der adulten HIV-1-Patienten lässt sich durch den Infektionsweg und das Alter der Studienteilnehmer erklären. Während die Infektion bei den erwachsenen GBV-C-positiven HIV-1-Patienten vermutlich überwiegend durch sexuelle Übertragung erfolgte, ist ein erhöhtes Infektionsrisiko aufgrund eines entsprechenden Risikoverhaltens bei den hämophilen Kindern eher unwahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, dass die Kinder und Jugendlichen entweder durch Blutprodukte wie zum Beispiel kontaminierte Antikoagulationsfaktoren oder infolge der Vielzahl der notwendigen medizinischen Leistungen mit dem GBV-C infiziert wurden. Obwohl die HIV-1- und HCV-Infektionen in der HGDS-Kohorte nachweislich durch die Verabreichung kontaminierter Gerinnungsfaktoren erfolgten, impliziert die geringe GBV-C-Prävalenz (0,7 %) relativ früh nach der vermeintlichen Exposition, dass die hohe GBV-C-Prävalenzrate, die am Ende der Studie beobachtet wurde,

eine andere Ursache haben muss. Hier kämen alle medizinischen Leistungen in Betracht, die eine Übertragung von Viren ermöglichen. Tatsächlich finden sich in den letzten Jahren zunehmend Hinweise darauf, dass im klinischen Umfeld unabhängig von Bluttransfusionen eine HCV-Infektion wahrscheinlicher ist als bislang angenommen. Bei Patienten mit akuter Hepatitis C aus Spanien, Italien, Frankreich und Deutschland waren als einzige Risikofaktoren für eine HCV-Infektion Operationen und andere therapeutische Maßnahmen wie zum Beispiel Notfallbehandlungen in 11 bis 67 % der Fälle zu identifizieren [²²⁰Morin et al. 2001, ²²¹Santantonio et al. 2006, ²²²Deterding et al. 2008, ²²³Martinez-Bauer et al. 2008]. Dies könnte auch für die Infektion mit GBV-C zutreffen und die hohe GBV-C-Prävalenz gegen Ende der HGD-Studie erklären.

Der Unterschied der GBV-C-Häufigkeiten zu den verschiedenen Zeitpunkten festigt die Annahme, dass die Infektionswahrscheinlichkeit und damit auch die Prävalenz mit zunehmender Häufigkeit einer Exposition steigen. Dementsprechend nahm mit steigendem Alter das Infektionsrisiko für GBV-C in der HGD-Studie zu. Diese zwischen Alter und erhöhtem GBV-C-Infektionsrisiko bestehende hochsignifikante Korrelation untermauern frühere Studien, die eine Zunahme der GBV-C-Prävalenz unabhängig von der Prädisposition des Probanden zu Transfusion oder Lebererkrankungen mit dem Alter bestätigen [¹⁵⁶Feucht et al. 1999, ²²⁴Anastassopoulou et al. 2000, ²²⁵Handa et al. 2000]. Auch die Beobachtungen in einer weiteren Studie, die eine Übertragung von GBV-C über Blutprodukte trotz Hitzeinaktivierung beschreibt, könnte eine Erklärung für die Zunahme der GBV-C-Infektionsrate im Studienverlauf liefern [²²⁶Woelfle et al. 1999].

Abschließend stellt sich die Frage, ob die sehr hohe GBV-C-Prävalenz in den beiden Kohorten und die Assoziation von GBV-C mit anderen Viren wie HCV und/oder HIV-1 auf gemeinsamen Transmissionsmechanismen beruhen oder ob GBV-C diese Viren als sogenannte Helferviren für seine Replikation und/oder Infektion nutzt. Deutlich wird eine derartige „Abhängigkeit“ im Fall des Hepatitis-D-Virus. Es kann nur in chronisch HBV-infizierten Zellen infektiöse Viruspartikel bilden und ist daher für seine Transmission und Infektion auf HBV angewiesen. Obwohl HIV-1 und HCV chronisch-latente Infektionen etablieren, ist es unwahrscheinlich, dass GBV-C und HIV-1 bzw. GBV-C und HCV in dieser Weise miteinander interagieren. GBV-C und HCV sind eng miteinander verwandt, replizieren aber in unterschiedlichen Zellen. GBV-C und HIV-1 hingegen replizieren zwar in den gleichen Zellpopulationen, sind jedoch phylogenetisch sehr weit voneinander entfernt. Eine direkte Abhängigkeit ist daher unwahrscheinlich. Die drei Viren könnten sich aber auch gegenseitig durch das von ihnen geschaffene Milieu stimulieren und die Replikationseffizienz des koinfizierenden Virus erhöhen. Insbesondere die Viruslast von GBV-C könnte durch die Koinfektion des Wirtsorganismus mit HIV-1 und/oder HCV beeinflusst werden. So beschreibt eine Studie einen inversen Zusammenhang zwischen der GBV-C- und der HIV-1-Viruslast in HIV-1-infizierten Patienten [¹⁰Tillmann et al. 2001]. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die Viruslasten GBV-C-monoinfizierter und -koinfizierter Patienten analysiert. Unabhängig vom Vorhandensein einer HCV- und/oder HIV-1-Koinfektion unterlag die GBV-

C-Viruslast starken Schwankungen und in jeder Kohorte konnten hoch- und niedrigtitrige GBV-C-Viruslasten detektiert werden. Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich nicht nachweisen, was das Ergebnis einer anderen Studiengruppe von Berg et al. [²²⁷1996] bestätigt. Lediglich in der Gruppe der HIV-1-positiven erwachsenen Patienten zeichnete sich ein leichter Trend zu höheren GBV-C-Viruslasten im Blut ab, der in der Kohorte der HIV-1-infizierten Kinder und Jugendlichen jedoch nicht beobachtet werden konnte. Ursächlich hierfür könnte die zusätzliche Infektion der Patienten mit HCV sein, dessen Einfluss auf die GBV-C-Viruslast im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen HIV-1-Infektion bislang nicht untersucht ist.

5.2.1.3 GBV-C-Prävalenz in HCV-positiven bzw. HCV-negativen Patientinnen der Anti-D-Kohorte

Die umfassende Dokumentation der infolge der Anti-D-Rhesusprophylaxe mit HCV infizierten Frauen und die Sequenzanalysen von Schreier et al. [²²⁸1996] belegen, dass der HCV-positive Spender des Anti-D-Serums auch GBV-C-positiv war, ebenso mindestens zwei der aus diesem Serum hergestellten und für die Immunisierung verwendeten Chargen. Mögliche Infektionen mit GBV-C und/oder HCV in dieser Kohorte können demnach auf eine einzige Quelle zurückgeführt werden [²²⁹Wiese et al. 2000, ²³⁰2005].

Die geringe GBV-C-Prävalenz von 3,3 % jedoch widerspricht der allgemeinen Annahme, dass alle Probandinnen in gleichem Maße mit HCV und GBV-C infiziert wurden. Tatsächlich konnten andere Studien zeigen, dass die Infektionsrate für GBV-C infolge der Verabreichung kontaminierter Blutprodukte im Vergleich zu HCV um mehr als 50 % reduziert ist [²³¹Kupfer et al. 2005]. Ursache hierfür könnten wirtsspezifische Faktoren sein, die eine Infektion mit GBV-C effizienter als für HCV behindern. Zudem beeinflussen neben der Ausgangsviruslast auch Morphologie und Physiologie eines Virus sowie Herstellungsprozess und Lagerung des Präparats die Wahrscheinlichkeit einer Infektion. Außerdem müssen auch die retrospektiven Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Schreier differenzierter betrachtet werden. Während die Autoren in Proben, die zeitnah zum Infektionszeitpunkt entnommen wurden, die HCV-Infektion bestätigen konnte, wurde keine Bestimmung des GBV-C-Status der Patientinnen durchgeführt. Zudem erfolgte die Gewinnung des Anti-D-Serums aus fünf Probanden, die mit dem Spenderserum geboostert wurden. Denkbar wäre, dass einige der Probanden bereits neutralisierende Anti-GBV-C-Antikörper aufwiesen oder diese im Anschluss an die initiale GBV-C-Infektion im Rahmen der Immunantwort rasch entwickelten. Dann wäre in der Charge, welche ein Gemisch verschiedener Seren darstellt, ein Vorliegen von sowohl GBV-C-RNA als auch Anti-GBV-C-Antikörpern denkbar. Die Anti-GBV-C-Antikörper würden infolge dessen die vorhandenen GBV-C-Viren zum Teil neutralisieren und somit eine GBV-C-Infektion in vielen Fällen verhindern. Eine Studie von Jarvis et al. [²³²1996] untermauert diese Hypothese. Demnach bleibt ungeklärt, ob und wie viele Probandinnen damals mit GBV-C infiziert wurden. Zusätzlich zu einer möglicherweise geringen GBV-C-Infektionsrate 1978/79 wären weitere mögliche Ursachen denkbar. Dabei ist davon auszugehen, dass die geringe

GBV-C-RNA-Prävalenz nicht durch falsch-negative Ergebnisse infolge einer suboptimalen PCR zustande gekommen ist. Einerseits wurde mit hoher Sensitivität die korrekte Identifikation des GBV-C-Status mit 99,7 % ermöglicht, andererseits konnten die Ergebnisse in zwei weiteren PCR für Sequenzabschnitte im kodierenden GBV-C-Genom bestätigt werden. Als antivirale Therapie erfolgte die Behandlung der HCV-Infektion mittels (pegyliertem) Interferon-alpha und ggf. Ribavirin. Diese Therapie eliminiert nachweislich auch GBV-C [²³³Orito et al. 1997, ²³⁴Schwarze-Zander et al. 2006, ²³⁵Hofer et al. 2011]. Es fand sich jedoch kein Unterschied bezüglich der GBV-C-Virämie zwischen Interferon-exponierten und unbehandelten Patientinnen ($p = 0,4111$), sodass eine Therapie mit Interferon wahrscheinlich nicht für die niedrige Rate von GBV-C-Infektionen verantwortlich ist. Darüber hinaus ist eine spontane Ausheilung der GBV-C-Infektion durch das Immunsystem denkbar, wie das auch für HCV zu beobachten ist. Dies liegt insoweit nahe, da der Zeitpunkt der Primärinfektion bereits mehr als 30 Jahre zurückliegt und bei der Mehrheit der GBV-C-Infizierten das Virus in den beiden ersten Jahren nach Infektion eliminiert wird [¹⁵¹Tacke et al. 1997a]. Klinische Studien konnten zeigen, dass insbesondere die Bildung von Antikörpern, die gegen das Oberflächenprotein E2 des GBV-C gerichtet sind, eine GBV-C-Infektion neutralisiert und vor einer Reinfektion schützt [²³⁶Prati et al. 1998, ¹⁵³Tillmann et al. 1998]. Die nachgewiesene Antikörperprävalenz in der Anti-D-Kohorte lag im Vergleich zur Literatur zwar um 5-11 % höher [¹⁵⁵Tacke et al. 1997b, ¹⁵⁸Björkmann et al. 2001], sie spiegelt dennoch ebenfalls nicht die aufgrund der angenommenen GBV-C-Exposition 1978/79 erwartete höhere Infektionsrate in dieser Kohorte wider. Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass nachweislich die anti-GBV-C-vermittelte Immunität über die Jahre abnimmt [²³⁷Stark et al. 1999]. In Langzeituntersuchungen wurde bislang eine maximale Verweildauer für GBV-C-spezifische Antikörper von mindestens 14 Jahren nachgewiesen [¹⁵¹Tacke et al. 1997a]. Da aber die für die Analysen zur Verfügung stehenden Serumproben 28 bis 31 Jahre nach Exposition datiert sind, kann die geringe GBV-C-Prävalenz die Ursache überlappender Effekte sein. Nachdem die asymptomatisch verlaufenden GBV-C-Primärinfektionen unbemerkt blieben und im Laufe der Zeit durch die HCV-Therapie und/oder durch das Immunsystem mit der Bildung neutralisierender Antikörper eliminiert wurden, kam es mit der Abnahme des Serumspiegels protektiver Antikörper zu Reinfektionen. Die im Rahmen dieser Untersuchung bestimmte GBV-C-Prävalenz würde demzufolge hauptsächlich die Infektionsrate von Personen mit geringen Risikofaktoren widerspiegeln. Gleichzeitig müssten die GBV-C-Isolate einen unterschiedlichen phylogenetischen Ursprung aufweisen. Tatsächlich belegen Sequenzanalysen diese Vermutung [²³⁸Tenckhoff et al. 2011]. Lediglich zwei der Frauen wiesen GBV-C-Isolate auf, die auf das ursprüngliche, das Anti-D-Serum kontaminierende GBV-C-Isolat zurückzuführen waren. Die übrigen acht stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus anderen Infektionsquellen.

5.2.2 GBV-C im klinischen Kontext mit HCV und/oder HIV-1

Da GBV-C häufig in Assoziation mit HCV und/oder HIV-1 nachgewiesen werden kann, wurde der Einfluss von GBV-C auf HCV und HIV-1 im Kontext dieser Koinfektionen untersucht. Es ist bekannt, dass der klinische Verlauf der HCV-Infektion bei HCV/HIV-1-koinfizierten Patienten maßgeblich durch HIV-1 beeinflusst wird. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der HGDS-Kohorte wiesen die HCV-monoinfizierten Patienten grundsätzlich geringere HCV-RNA-Level auf als die HCV/HIV-1-koinfizierten Patienten. Zudem konnte bei HIV-1-negativen Patienten eine signifikant höhere HCV-Ausheilungsrate beobachtet werden als bei HIV-1-positiven. Damit stehen diese Daten im Einklang zum Beispiel mit Untersuchungen von Soriano et al. [²³⁹2008], die ebenfalls nachweisen konnten, dass die HCV-Viruseliminierung von der HCV-Viruslast abhängt. Für die Eradikation von HCV spielt die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle [²⁴⁰Cooper et al. 1999]. Die mit der HIV-1-Infektion einhergehende Immunsuppression ist daher wahrscheinlich ein Grund für die verminderte Eliminierung von HCV in HCV/HIV-1-koinfizierten Patienten [²⁴¹Thomson et al. 2009]. Studien, die zeigen konnten, dass bei der HCV-Eradikation CD4- und CD8-positive T-Zellen beteiligt sind, unterstützen diese Beobachtung [²⁴²Ruys et al. 2008, ²⁴³Thimme et al. 2008]. Zudem belegen Untersuchungen von Falconer et al. [²⁴⁴2008], dass HIV-1-Patienten mit einer annähernd normalen zellulären Immunantwort deutlich öfter in der Lage waren, HCV spontan auszuheilen.

Neben dem Einfluss von HIV-1 sollte auch der Einfluss von GBV-C auf den HCV-Krankheitsverlauf untersucht werden. Dafür wurden die Ausheilungsraten GBV-C-positiver und GBV-C-negativer HCV-Patienten verglichen. Analog zu HIV-1 wirkte sich die GBV-C-Koinfektion nachteilig auf die HCV-Erkrankung aus. Sowohl in der Anti-D- als auch in der HGD-Studie konnte bei GBV-C-positiven Patienten im Vergleich zu GBV-C-negativen Patienten eine signifikant höhere Rate HCV-chronischer Patienten beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden durch internationale Studien bestätigt. Ein vergleichbarer Trend wurde in einer Kohorte hämophiler Patienten beschrieben, in der 26 % der GBV-C-negativen, aber nur 7,1 % der GBV-C-positiven Patienten HCV ausheilten [²⁴⁵Gerolami et al. 1997]. Ähnliche Ergebnisse dokumentierten Fabrizi et al. [²⁴⁶2002] bei HCV-infizierten Dialysepatienten. Zusätzlich werden diese Befunde durch Publikationen gestützt, die von einer stärkeren viralen Immunantwort gegen HCV in HCV-Patienten berichten, die infolge einer interferonbasierten Therapie GBV-C eradiziert hatten [²⁴⁷Jarvis et al. 1998, ²³⁴Schwarze-Zander et al. 2006].

GBV-C tritt in Risikokollektiven aber oftmals nicht nur im Kontext von Koinfektionen mit HCV oder HIV-1, sondern im Rahmen von Tripelinfektionen auch häufig gemeinsam mit HCV und HIV-1 auf, wie bei der in dieser Arbeit untersuchten HGDS-Kohorte. Auch hier lag eine höhere HCV-Heilungsrate bei GBV-C-negativen HCV/HIV-1-doppelinfizierten Patienten als bei GBV-C/HCV/HIV-1-tripelinfizierten Patienten vor. Es wäre denkbar, dass es durch die phylogenetische Ähnlichkeit und die damit verbundene Sequenzhomologie von GBV-C und

HCV zu immunologischen Kreuzreaktionen kommt, in deren Folge die Effizienz der Viruseliminierung durch das Immunsystem des Wirts nachteilig beeinflusst wird. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass einzelne HCV-Proteine die Aktivierung des Immunsystems blockieren und so eine effiziente Eliminierung des Virus inhibieren [²⁴⁸Foy et al. 2003, ²⁴⁹Sumpter et al. 2005, ²⁵⁰Gale et al. 2005]. Bedingt durch die enge Verwandtschaft von GBV-C und HCV ist eine derartige Eigenschaft ebenfalls für GBV-C-Proteine vorstellbar, wobei bisher entsprechende Studien fehlen. Letztlich könnte diese theoretische kombinatorische Beeinträchtigung des Immunsystems durch GBV-C und HCV den negativen Effekt der GBV-C-Virämie auf die HCV-Persistenz in beiden Studien erklären.

Im Gegensatz zu einer möglicherweise negativen Interaktion mit HCV hat GBV-C einen positiven Einfluss auf den Verlauf der HIV-1-Erkrankung. Mehrere epidemiologische Studien konnten zeigen, dass GBV-C mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit von HIV-1-positiven Patienten assoziiert ist [¹⁰Tillmann et al. 2001, ¹¹Xiang et al. 2001]. Allerdings beschränken sich diese Studien vornehmlich auf Erwachsene. Die Auswirkungen von GBV-C auf den Krankheitsverlauf bei HIV-1-positiven Kindern und Jugendlichen wurden bisher kaum untersucht. Die hämophilen Kinder und Jugendlichen der HGD-Studie stellen daher eine geeignete Kohorte dar, um der Frage nachzugehen, ob bei Kindern ein zu Erwachsenen vergleichbarer GBV-C-vermittelter Effekt beobachtet werden kann. Im Studienverlauf wiesen die GBV-C/HIV-1-koinfizierten Patienten vergleichbar zu adulten HIV-1-Patienten mit GBV-C-Virämie eine geringere HIV-1-Viruslast und höhere CD4-T-Zellzahlen auf als die GBV-C-negative Kontrollgruppe. Gleichzeitig war ihre Sterbewahrscheinlichkeit als Folge der HIV-1-Infektion signifikant reduziert. Unter Berücksichtigung des Immunstatus der später GBV-C-serokonvertierten Kinder zum ersten Messzeitpunkt zeigte sich jedoch im Vergleich zu den Ergebnissen des zweiten Untersuchungstermins, dass die klinischen Parameter der Probanden bereits zu diesem frühen Zeitpunkt besser waren als die der später GBV-C-negativen, HIV-1-positiven Kinder. Eine Studie bei perinatal HIV-1-infizierten Kindern kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der bei Erwachsenen nachgewiesene positive Effekt einer GBV-C-Koinfektion auf den Verlauf der HIV-1-Erkrankung bei Kindern nicht beobachtet werden kann und eine GBV-C-Virämie nicht direkt mit einer besseren Prognose bei HIV-1-positiven Kindern verknüpft ist [¹⁹⁵Shuval et al. 2005]. Inwieweit das kindliche Immunsystem oder andere altersbedingte Unterschiede für diese Beobachtung ursächlich sind, kann nicht abschließend geklärt werden. Bei der Infektion im Kindesalter treffen sowohl HIV-1 als auch GBV-C auf ein unreifes, noch nicht vollständig entwickeltes Immunsystem. Während dieser Umstand die Replikation von HIV-1 und die Depletion der CD4-positiven T-Zellen fördern kann, könnte das Fehlen bestimmter, vollständig ausdifferenzierter Immunzellen die Replikation von GBV-C und die Etablierung des HIV-1-inhibitorischen Effekts negativ beeinflussen. Damit könnte GBV-C in der untersuchten Studiengruppe vorliegen, jedoch Viruslasten unterhalb der Nachweisgrenze aufweisen.

5.3 EINFLUSS VON GBV-C AUF DIE HIV-1-REPLIKATION IN ZELLKULTUR

5.3.1 Charakterisierung klinischer GBV-C-Isolate

Experimentelle Untersuchungen virologischer Fragestellungen sind ohne geeignete Kultursysteme nicht durchführbar. Für eine Vielzahl von humanpathogenen Viren konnten immortalisierte Zelllinien etabliert werden, die eine ausreichende Virusvermehrung ermöglichen. Darüber hinaus lassen sich bestimmte Viren jedoch nicht effizient auf Zelllinien anzüchten. Alternative Replikationssysteme basieren auf isolierten Primärzellen des Gewebes, in dem die Viren *in vivo* replizieren und die so die natürlichen Bedingungen im Spenderorganismus imitieren. Allerdings ist der Zugang zu den entsprechenden Geweben schwierig und die Präparation sowie Kultivierung der Zellen mitunter diffizil.

Für HIV-1 stellt die Anzucht *in vitro* kein Problem dar, da es sowohl in einfach zu isolierenden PBMC als auch in Zelllinien lymphozytären Ursprungs repliziert. Im Gegensatz dazu existiert jedoch für GBV-C bislang kein Zellkultursystem, das eine langfristige Kultivierung mit hohen Virustitern gewährleistet. Obwohl Seipp et al. [²⁰⁵1999] die Replikation von GBV-C in den beiden hepatozytären Zelllinien Huh-7 und HepG2 postulierten, konnte diese Beobachtung in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Trotz Optimierung des publizierten Protokolls war es nicht möglich, in diesen adhärennten Zellen eine stabile GBV-C-Replikation zu etablieren. Durch eine während der RNA-Extraktion mitgeführte Kontrolle und den erfolgreichen Nachweis von GAPDH-kodierender mRNA in den RNA-Extrakten der GBV-C-exponierten Huh-7- und HepG2-Zellen konnte ein Verlust der RNA während der Extraktion sowie eine mangelnde Sensitivität der quantitativen RT-PCR als unwahrscheinlich eingestuft werden. Das Fehlen von GBV-C-RNA in den Kulturen impliziert eine abortive Infektion, sodass dieses System nicht wie geplant für die Anzucht von GBV-C und die Gewinnung hochtitriger Virusstocks eingesetzt werden konnte. Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse. Auch sie zeigten die Anzucht in hepatozytären Zellen nur für GBV-B, nicht aber für GBV-C [²⁵¹Auriscchio et al. 2005, ²⁵²Buckwold et al. 2005].

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen GBV-C und HIV-1 war im Weiteren ein Zellkultursystem erforderlich, das die gleichzeitige Replikation beider Viren im selben Ansatz gewährleistet. Studien, die die Replikation des GBV-C in lymphozytären Zellen nachwiesen [¹²⁶Xiang et al. 2000, ¹²⁷George et al. 2006], waren der Ausgangspunkt für die Entwicklung eines PBMC-Zellkultursystems. Tatsächlich konnte nach Infektion von PBMC mit klinischen GBV-C-Isolaten in allen Kulturen ein Anstieg der GBV-C-RNA beobachtet werden. Eine aktive GBV-C-Replikation wurde über einen Zeitraum von mindestens 34 Tagen nachgewiesen. Da PBMC als Primärzellen nur bedingt lebens- und teilungsfähig sind, kam es im Verlauf der Kultivierung zu einer Abnahme vitaler Primärzellen in der Kultur, die mit dem Abfall der GBV-C-Konzentration korrelierte. Dieser Verlust putativer Wirtszellen wurde durch die Zugabe frischer PBMC kompensiert. Als direkte Folge konnte ein erneuter Anstieg der GBV-C-Viruslast im Kulturüberstand beobachtet werden. Für

den eindeutigen Nachweis einer aktiven GBV-C-Infektion wurde zellfreier Überstand GBV-C-infizierter Zellen als Inokulum für die Infektion frischer, nichtinfizierter PBMC genutzt. Auch in diesen Kulturen war ein Anstieg der GBV-C-RNA messbar. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass in der Primärkultur lediglich das ursprüngliche GBV-C-Inokulum nachgewiesen wurde. Die Sekundärinfektion gelang allerdings nicht mit allen GBV-C-Isolaten. Dieser Beobachtung könnte der unterschiedliche Zelltropismus der untersuchten GBV-C-Isolate zugrunde liegen. Die Zusammensetzung der verwendeten PBMC-Kulturen variiert in Abhängigkeit vom Spender. Die Variabilität umfasst dabei unter anderem die Blutgruppe, den immunologischen Status sowie weitere genetische Merkmale. Diese Faktoren könnten für die Infektion eine Rolle spielen. Denkbar ist, dass aufgrund des heterogenen Ursprungs der für die Sekundärinfektion verwendeten PBMC einzelne GBV-C-Isolate keine Infektion etablieren konnten, da es durch die Positivselektion zu einer Anreicherung hochreplikativer Viren kommt. Diese sind möglicherweise nicht in der Lage, Zellen anderer Spender zu infizieren. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass bestimmte Virusvarianten nach Passage in lymphoblastoiden Zellen oder PBMC eine positive Selektion erfahren, weshalb es zur Expansion stärker replizierender Viren kommt [²⁵³Nakajima et al. 1996, ²⁵⁴Lerat et al. 2000]. Da nicht in allen Kulturen im Überstand, der für die Sekundärinfektion verwendet wurde, noch Virus nachweisbar war, überraschte der erneute Nachweis von GBV-C in den sekundär infizierten Zellkulturen. Die Erklärung hierfür liegt in der Nachweisgrenze der RT-PCR begründet. Sie lag in der hier verwendeten PCR bei 500 Kopien/ml. Ein negatives Ergebnis bedeutet demnach nicht, dass in der Probe keine GBV-C-RNA vorlag, sondern lediglich nur, dass sie mit dem eingesetzten System nicht erfasst werden kann. Es ist demnach davon auszugehen, dass in den Überständen der Primärkulturen S31 und S35 noch replikationskompetentes Virus in ausreichender Menge für eine Sekundärinfektion vorhanden gewesen sein muss. Eine Kontamination konnte durch das Mitführen entsprechender Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

Da PBMC natürliche Zielzellen für HIV-1 darstellen und zudem eine effiziente GBV-C-Replikation für mindestens 15 Tage ermöglichen, wurde die virale Interferenz zwischen GBV-C und HIV-1 auf frisch isolierten PBMC ausgewählter Spender untersucht. Diese Koinfektionsversuche hatten das Ziel, den in klinischen Studien beschriebenen positiven Einfluss von GBV-C auf die HIV-1-Progression unter standardisierten Zellkulturbedingungen zu reproduzieren und dadurch einen kausalen Zusammenhang zwischen GBV-C-Infektion und HIV-1-Suppression zu untermauern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Replikation eines HIV-1-Wildtypisolats durch die Koinfektion mit unterschiedlichen GBV-C-Isolaten signifikant gehemmt werden. Dabei zeigte sich eine direkte Korrelation der Inhibition zur Dosis der beiden Viren HIV-1 und GBV-C. Die Beobachtungen wurden durch das Nationale Referenzzentrum für Retroviren (NRZ, Erlangen) bestätigt.

Interessanterweise konnten nicht alle untersuchten GBV-C-Isolate einen inhibitorischen Effekt etablieren. In Abhängigkeit vom verwendeten GBV-C-Isolat schwankte die GBV-C-vermittelte HIV-1-Hemmung zwischen 1 % und 76 % und impliziert die Existenz

unterschiedlicher HIV-1-inhibitorischer Phänotypen. Neben HIV-1-inhibitorischen GBV-C-Isolaten konnten in dieser Arbeit auch GBV-C-Isolate mit HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp identifiziert werden. Diese Beobachtung ist insofern interessant, weil sie die Diskrepanz früherer klinischer Studien erklären könnte, die keine Assoziation zwischen GBV-C-Virämie und verbessertem Überleben HIV-1-positiver Probanden belegen konnten [¹⁸⁹Birk et al. 2002, ¹⁹⁰Brumme et al. 2002, ¹⁹¹Björkmann et al. 2004, ¹⁹²Kaye et al. 2005]. Da der inhibitorische Effekt HIV-1-hemmender GBV-C-Isolate sowohl auf PBMC verschiedener Spender als auch auf etablierten T-Zelllinien beobachtet wurde, spielt der Einfluss der Variabilität der Wirtszelle für die Ausprägung der viralen Interferenz möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr deuten die Daten darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von viralen Eigenschaften beeinflusst wird. Insbesondere die Dosisabhängigkeit und die Beobachtung, dass eine suboptimale Inokulationsdosis eines HIV-1-inhibitorischen GBV-C-Isolats nicht nur zum Verlust der HIV-1-Suppression, sondern sogar zu einem Überschießen der HIV-1-Replikation führt, untermauern diese Vermutung. Ein Einfluss von serumspezifischen Faktoren auf den Verlauf der HIV-1-Replikation konnte ausgeschlossen werden, da entsprechende Kontrollen im Experiment (GBV-C-negatives Serum und HIV-1) zu Kontrollen (nur HIV-1) vergleichbare Werte aufwiesen.

Ein ähnliches Phänomen wurde bei Denguevirus-Reinfektionen beobachtet. Im Verlauf der Primärinfektion mit diesem GBV-C-Verwandten werden Antikörper gebildet, die suptypspezifisch neutralisierend wirken. Kommt es zu einer Neuinfektion mit einem anderen Subtyp, binden diese Antikörper zwar an das Viruspartikel, sind jedoch nicht in der Lage, die Denguevirus-Infektion zu eliminieren. Über die Interaktion des Fc-Teils der virusgebundenen Antikörper kann der Antikörper-Virus-Komplex an den Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten binden und das Viruspartikel wird über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dadurch kann eine große Anzahl an Viren eine produktive Infektion etablieren. Das Immunsystem begünstigt durch dieses antibody enhancement das Pathogen [²⁵⁵Nielson et al. 2009]. Übertragen auf GBV-C würde das bedeuten, dass GBV-C möglicherweise an HIV-1 bindet und dadurch die Interaktion von HIV-1 mit seinen zellulären Rezeptoren verhindert. Ist die Konzentration von GBV-C zu gering, kommt es zwar zur Bindung an HIV-1, jedoch nicht zur HIV-1-Neutralisation. Es ist zudem auch denkbar, dass HIV-1-beladene GBV-C-Partikel mit dem GBV-C-spezifischen Rezeptor interagieren und dadurch HIV-1 in die Zelle gelangt, wo es replizieren kann. Durch diesen Mechanismus könnten HI-Viren expandieren, deren Replikationseffizienz unter normalen Bedingungen zu gering wäre, um eine produktive Infektion zu etablieren. Neuere Untersuchungen belegen die Interaktionen des GBV-C-Oberflächenproteins E2 mit dem für die HIV-1-Infektion essentiellen HIV-1-Glykoprotein gp41 und untermauern die Bedeutung der direkten GBV-C/HIV-1-Interaktion für den inhibitorischen Effekt [²⁰⁸Herrera et al. 2009, ¹⁰⁷Mohr et al. 2009, ¹⁹⁸Herrera et al. 2010].

Zusammenfassend weisen die In-vitro-Daten daraufhin hin, dass GBV-C kein Marker für ein robustes Immunsystem oder eine andere genetische Determinante wie zum Beispiel die

CCR5Δ32-Mutante ist, sondern die kausale Ursache für die Hemmung der HIV-1-Replikation *in vitro* und die verlangsamte HIV-1-Progression in GBV-C/HIV-1-koinfizierten Patienten *in vivo* darstellt. Der GBV-C-induzierte Effekt ist dabei nicht auf einzelne GBV-C-Isolate oder HIV-1-Isolate beschränkt. Darüber hinaus hängt der inhibitorische Effekt auch nicht vom Korezeptortropismus des betreffenden HIV-1-Isolats ab [²⁵⁶Jung 2010]. Die Entdeckung, dass sich klinische GBV-C-Isolate in ihrem Potential, die HIV-1-Replikation negativ zu beeinflussen, signifikant unterscheiden, begründet die Klassifizierung gemäß ihres Phänotyps als HIV-1-inhibitorisch oder HIV-1-nichtinhibitorisch und könnte diskrepante Ergebnisse klinischer Studien erklären. Daraus ergibt sich ein völlig neues Feld für den Ansatz innovativer Therapiestrategien. In deren Entwicklung ist es jedoch erforderlich, die Mechanismen der Hemmung durch GBV-C zu identifizieren. Mögliche Interaktionen und Mechanismen standen daher im Fokus der weiteren Arbeit.

5.3.2 Identifikation und Charakterisierung HIV-1-neutralisierender GBV-C-E2-Peptide

Die HIV-1-Replikation kann über verschiedene Interaktionsmechanismen wie z. B. Koninfektionen mit Viren wie Influenzaviren oder Masernviren beeinflusst werden [⁵Pinto et al. 2000, ²⁵⁷Grivel et al. 2001]. Neben der Hemmung des HIV-1-spezifischen Zelleintritts durch die verminderte Expression der HIV-1-Korezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle durch die Induktion von Chemokinen [¹⁹³Xiang et al. 2004, ¹⁹⁴Jung et al. 2005] gibt es erste Hinweise auf die daran beteiligten GBV-C-Proteine. Xiang et al. [²⁵⁸2006, ²⁵⁹2009] konnten zeigen, dass das NS5(A)-Protein verschiedener Viren aus der Familie der *Flaviviridae*, wie zum Beispiel GBV-C, HCV und Denguevirus, in Zellkulturversuchen die HIV-1-Replikation durch die Induktion von Chemokinen hemmt. Sie postulieren ein Serin an Position 158, das für das inhibitorische Potential des GBV-C-NS5A verantwortlich ist [²⁰⁷Xiang et al. 2008]. Um zu überprüfen, ob sich die in dieser Arbeit charakterisierten HIV-1-inhibitorischen und HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolate in diesem Serin unterscheiden, wurde die betreffende Region des NS5A-Proteins sequenziert und analysiert. Bestünde eine Korrelation zwischen dem HIV-1-inhibitorischen Effekt von GBV-C und der Sequenz des NS5A-Proteins von GBV-C, so müsste das betreffende Serin in den HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten mutiert sein. Eine derartige Substitution im NS5A-Protein der untersuchten GBV-C-Isolate konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zusammen mit den Beobachtungen, dass der NS5A-Effekt nicht GBV-C-spezifisch ist und HCV-positive HIV-1-Patienten keinen GBV-C-ähnlichen Überlebensvorteil aufweisen, ist die Relevanz des NS5A-Proteins für den Gesamteffekt von GBV-C auf HIV-1 nur als marginal einzustufen.

Für die GBV-C-induzierte HIV-1-Suppression müssen daher andere Mechanismen verantwortlich sein. Neben dem NS5A-Protein wird zurzeit das E2-Protein im Hinblick auf sein HIV-1-inhibitorisches Potential untersucht. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das Oberflächenprotein E2 von GBV-C in der Lage ist, die frühen HIV-1-Replikationsschritte

zu inhibieren [²⁶⁰Jung et al. 2007, ¹⁰⁷Mohr et al. 2009]. Da dem E2-Protein eine wichtige Rolle bei der GBV-C-Replikation zukommt und Mutationen nicht nur einen Einfluss auf die Replikationseffizienz von GBV-C, sondern auch auf den HIV-1-inhibitorischen Phänotyp klinischer GBV-C-Isolate haben können, wurde die Aminosäuresequenz verschiedener GBV-C-Isolate im Hinblick auf den zuvor bestimmten HIV-1-inhibitorischen Phänotyp analysiert. Im Gegensatz zu HCV konnten im GBV-C-E2-Protein keine hypervariablen Regionen identifiziert werden. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Autoren überein [¹¹⁵Erker et al. 1996, ¹⁵¹Tacke et al. 1997a]. Im Vergleich der Sequenzen von HIV-1-inhibitorischen und HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten fielen jedoch zwei Aminosäuresubstitutionen auf, die bei HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten auftraten: E143K/H und T204A. Diese Beobachtungen können nicht mit Unterschieden aufgrund ihres Genotyps erklärt werden. Sequenzvergleiche zeigten, dass keiner der bislang bekannten 6 Genotypen beide Mutationen aufweist. Isolate des Genotyps 2b besitzen die Mutation an Position T204A, während Genotyp 4 die Mutation an Position E143 zeigt. In 3D-Computermodellen wurden die beiden Aminosäuresubstitutionen lokalisiert. Die Aminosäure E143 ist auf der Proteinoberfläche exponiert und könnte damit an der Interaktion mit anderen Molekülen beteiligt sein. Dahingegen befindet sich die Aminosäure T204 in einer Vertiefung des E2-Proteins. Die Mutation T204A bedingt eine Veränderung der Ladung der betreffenden Aminosäure, was eine strukturelle Veränderung der Proteindomäne zur Folge haben könnte [²⁶¹Ido et al. 2008].

Um den Einfluss des E2-Proteins auf die HIV-1-Replikation isoliert zu untersuchen, wurden überlappende 18mer-Peptide synthetisiert und in HIV-1-Neutralisationsassays getestet. Hierfür wurde in Vorversuchen das optimale Protokoll bestimmt. Während die Vorinkubation der Zielzellen mit den Peptiden ab Tag 5 eine Verringerung des inhibitorischen Effekts zeigte, führte die Vorinkubation der Peptide mit dem HIV-1-Isolat zu einer anhaltenden Suppression der nachfolgenden HIV-1-Infektion. Dieser Effekt wurde durch die Aufrechterhaltung der Peptidkonzentration im Kulturüberstand noch verstärkt, da eine Umsetzung der Peptide durch den Metabolismus der Zellen und eine eventuell kurze Halbwertszeit der Peptide so weit wie möglich abgefangen wurde. Bei einer Konzentration von 500 μM konnten in einem ersten Infektionsversuch mit einem klinischen HIV-1-Isolat 67 inhibitorische Peptide identifiziert werden; im nachfolgenden Versuch mit einer Peptidkonzentration von 250 μM reduzierte sich die Anzahl der Peptide auf 16. Ergänzend war die dosisabhängige peptidvermittelte HIV-1-Hemmung durch eine verminderte Synzytienbildung nachweisbar. Die Mehrzahl dieser Peptide war zudem im N-terminalen Bereich des E2-Proteins lokalisiert. Dieser Proteinbereich bildet die auf der Oberfläche des Virus exponierte Domäne (Ectodomäne), während die Peptide der Transmembranregion ein geringes bzw. kein HIV-1-inhibitorisches Potential aufwiesen. Sie sind aufgrund ihrer Position vermutlich nicht an Interaktionen zwischen GBV-C und HIV-1 beteiligt.

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung sollten Peptide folgende Kriterien erfüllen:

- a) eine Inhibition der HIV-1-Replikation von mindestens 90 % bei Konzentrationen von

500 und 250 μM , b) keine Präzipitatbildung des Peptids im Medium und c) keine Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen. Die untersuchten Peptide wiesen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer IC_{50} -Werte auf. Das Peptid P46 verfügte dabei mit 51,2 μM über den niedrigsten IC_{50} -Wert. Dieser Wert liegt im Vergleich zu anderen HIV-1-inhibitorischen Peptiden wie VIRIP, das die HIV-1-Infektion und Transmission hemmt, oder kleinen fusionsinhibitorischen Peptiden, im Bereich der publizierten IC_{50} -Werte von 20 μM bzw. 30-100 μM [²⁶²Frey et al. 2006, ²⁶³Münch et al. 2007]. Der inhibitorische Effekt war dabei nicht auf das im Rahmen dieser Arbeit verwendete CXCR4-trope HIV-1-Isolat 92UG024 beschränkt. In einer gemeinsamen Kooperation mit dem Biochemischen Institut in Barcelona konnten weitere CXCR4-trope sowie CCR5-trope HIV-1-Isolate effizient inhibiert werden. Gleichzeitig wurde dort in sogenannten single round of infection assays (TZM-bl-Zellen unter Verwendung von Virus like particles - VLP) bewiesen, dass die Peptide den HIV-1-spezifischen Zelleintritt, vermittelt durch die Interaktion von gp120/gp41 mit dem CD4-Rezeptor, inhibieren [¹⁹⁸Herrera et al. 2010]. Da bei diesem Testsystem die verwendeten Viruspartikel nur einen Replikationszyklus durchlaufen können, ist im Vergleich zum konventionellen Testsystem (lymphozytäre Zelllinie infiziert mit HIV-1-Wildtypisolaten) mit mehreren Replikationszyklen eine geringere Peptidkonzentration für die Etablierung einer 50 %igen Hemmung erforderlich (zum Beispiel für das Peptid P46: IC_{50} von 51,2 μM in CEMx174-Zellen vs. IC_{50} von 39,9 μM in TZM-bl-Zellen). Je näher sich das experimentelle Design also dem biologischen System annähert, umso höher sind die IC_{50} -Werte [²⁶⁴Berkhout et al. 2002, ²⁶⁵Ni et al. 2005, ²⁶⁶Swanson et al. 2010]. Die Beobachtung, dass E2-Peptide spezifisch die frühen HIV-1-Replikationsschritte wie Anheftung und Membranfusion inhibieren, wird durch die Versuche mit rekombinanten E2-Proteinen bestätigt. Durch die Verwendung von HIV-1-Viruspartikeln mit HIV-1-homologen oder -heterologen Oberflächenproteinen, die den Mechanismus des Zelleintritts maßgeblich bestimmen, konnten Jung et al. [²⁶⁰2007] zeigen, dass der inhibitorische Effekt des GBV-C-E2-Proteins auf HIV-1 beschränkt ist. HI-Viren, die mit dem Oberflächenprotein des Vesikulären Stomatitisvirus (VSV) pseudotypisiert waren und die Zielzellen rezeptorunabhängig in einem pH-Wertabhängigen Endozytosemechanismus infizierten, wurden durch das GBV-C-E2-Protein nicht am Zelleintritt gehindert. Ausgehend von der Tatsache, dass der inhibitorische Effekt der Peptide bei der Vorinkubation der Viren mit den Peptiden stärker war, gestattet diese Beobachtung die Schlussfolgerung, dass die Peptide durch direkte Interaktion mit der Virusmembran die HIV-1-Inhibition vermitteln. Weitergehende Untersuchungen von Herrera et al. [²⁰⁸2009] konnten schließlich die direkte Interaktion von E2-Peptiden mit dem gp41 von HIV-1 belegen. Durch die Bindung der inhibitorischen E2-Peptide an gp41 wird die für die Infektion notwendige Konformationsänderung des HIV-1-Oberflächenproteins blockiert. Unterstützung finden diese Erkenntnisse durch aktuelle Daten einer Forschergruppe, die ebenfalls eine inhibitorische Wirkung von GBV-C-E2-Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des E2-Proteins beschreibt [²⁶⁷Ködel et al. 2011]. Sie konnte darüber hinaus nachweisen, dass die beiden inhibitorisch

potentesten Peptide in ihrem Assay mit HIV-1 direkt interagieren. Diese Daten stützen die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Resultate sowie die daraus entwickelte Theorie der Hemmung der HIV-1-Infektion über das E2-Glykoprotein des GBV-C.

Weiterhin spielt das Peptid P46 auch im Hinblick auf die Frage nach der genetischen Ursache für die beobachteten unterschiedlichen HIV-1-inhibitorischen Phänotypen klinischer GBV-C-Isolate eine besondere Rolle. Dieses Peptid erwies sich im Rahmen dieser Arbeit von allen getesteten Peptiden als der wirksamste HIV-1-Inhibitor. Interessanterweise umfasst die Sequenz des Peptids auch die Aminosäure E143, die bei allen untersuchten HIV-1-nichtinhibitorischen GBV-C-Isolaten mutiert war (E143K/H). Dies impliziert, dass die durch das Peptid kodierte Proteinsequenz und insbesondere das Glutamat an Position 143 eine wichtige Rolle für den beobachteten inhibitorischen Effekt spielt. Weitere Protein-Protein-Interaktionsversuche sind notwendig, um die Relevanz von E143 für die E2-Bindung an gp41 zu belegen. Gleichzeitig wäre es von besonderem Interesse, die E2-Sequenzen der GBV-C-Isolate zu analysieren, die im Rahmen einer HIV-1-Infektion nicht mit einem Überlebensvorteil für ihren menschlichen Wirt assoziiert sind.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum Verständnis der Wechselwirkungen zwischen GBV-C und HIV-1 dar.

5.3.3 Analyse der IRES-Aktivität klinischer GBV-C-Isolate

Einige RNA-Viren haben die Möglichkeit entwickelt, unabhängig von einer Cap-Struktur die Translation ihrer RNA zu induzieren. Dies erfordert eine besondere RNA-Struktur in der 5'-NTR, die in der Lage ist, die Ribosomenuntereinheiten zu binden und die Translation zu regulieren [²⁶⁸Honda et al. 1996, ²⁶⁹Robertson et al. 1999, ²⁷⁰Jubin et al. 2000]. Neben Vertretern der *Picornaviridae* besitzen auch die beiden Vertreter der Familie der *Flaviviridae* HCV und GBV-C eine derartige IRES. Trotz der nahen Verwandtschaft zu HCV gleicht die GBV-C-IRES in ihrer Struktur und Funktionsweise eher der IRES der Picornaviren. Simons et al. [¹¹⁶1996] postulieren, dass das Ribosom an einen Sequenzabschnitt vor dem eigentlichen Startcodon bindet und die RNA in 5'-3'-Richtung scannt. Bei Erreichen des Startcodons wird dann die Translation initiiert. Dem Startcodon schließt sich eine Sequenz an, die eine stark konservierte Helixstruktur ausbildet. Diese Helix besitzt im oberen Bereich eine Sequenz aus neun aufeinanderfolgenden Guanin- bzw. Cytosinresten (nt587-596), die mit einer komplementären RNA-Sequenz (nt604-612) eine Bindung eingehen und mit der dazwischen liegenden Sequenz eine Helix bilden können. Diese Abfolge ist vermutlich für die bei PCR- und Sequenzierungsreaktionen beobachteten Probleme verantwortlich. Insbesondere Sequenzierungsreaktionen, bei denen die Elongationstemperatur weniger als 65 °C betrug, brachen an den entsprechenden GC-reichen Sequenzabschnitten vorzeitig und unabhängig von anderen Reaktionsbedingungen ab. Obwohl derartige Probleme in der Regel nicht publiziert werden, finden sich in den Protokollen zahlreicher kommerziell erhältlicher Polymerasen Hinweise auf dieses Phänomen (zum Beispiel: GeneAmp XL PCR

Kit, Applied Biosystems; Phusion, NEB; HighFidelity Roche). Ursache für das Problem dürften die starken Bindungsenergien zwischen Guanin und Cytosin sein, die in der vorliegenden Arbeit durch die Erhöhung der Elongationstemperatur überwunden werden konnten.

Die Analyse der IRES verschiedener klinischer GBV-C-Isolate sollte mit Hilfe von Doppelluziferasevektoren erfolgen. Doppelluziferasevektoren bieten ein elegantes System, um Fragestellungen bezüglich der Expression von Proteinen oder regulatorischer Elemente zu untersuchen. Während die Expression der einen Luziferase, in diesem Fall die Renillaluziferase, unter der Kontrolle eines zellulären Promotors steht, wird die Expression der zweiten Luziferase, hier die Fireflyluziferase, durch den zu untersuchenden Promotor bzw. durch die zu untersuchende IRES gesteuert. Das verwendete bicistronische System korreliert die Aktivität der untersuchten IRES mit der Transfektionseffizienz und gewährleistet durch die Normalisierung der Translationseffizienzen die Vergleichbarkeit der einzelnen IRES.

Da sowohl die Aktivität der HCV-IRES als auch die IRES-Aktivität verschiedener Picornaviren vom verwendeten Zellkultursystem abhängen [²⁷¹Borman et al. 1997, ²⁷²Durand et al. 2010], wurden eingangs drei verschiedene Zelllinien auf ihre Eignung untersucht. Neben 293T- und HeLa-Zellen wurden auch Huh-7-Zellen getestet. Die hepatozytäre Zelllinie Huh-7 kam deshalb zur Anwendung, da hierfür bereits die erfolgreiche Expression eines GBV-C-Replicons beschrieben worden war [²¹⁰Cao et al. 2009]. Die größtmögliche Transfektionseffizienz konnte bei 293T-Zellen beobachtet werden. Auch die Aktivität der Renilla- und Fireflyluziferase war in 293T-Zellen am höchsten, während sie bei den beiden anderen Zelllinien um Faktor 7 geringer ausfiel. Überraschenderweise lag jedoch die Fireflyaktivität in Huh-7-Zellen deutlich höher als in HeLa-Zellen, obwohl diese eine doppelt so hohe Transfektionseffizienz besaßen. Nach Normalisierung der Expression der Renillaluziferase wiesen die Aktivitäten in Huh-7- und HeLa-Zellen jedoch vergleichbare Werte auf. Die hohe Aktivität der 293T-Zellen beruht vermutlich einerseits auf der guten Transfizierbarkeit der Zellen, andererseits auf der Integration des T-Antigens des Simianvirus (SV) in das Genom dieser Zellen. Die Expression der Renillaluziferase erfolgt über den SV40-Promotor im DCV, der durch das T-Antigen eine zusätzliche Aktivierung erfährt. Die erhöhte Fireflyaktivität in Huh-7-Zellen lässt wiederum vermuten, dass auch zelluläre Faktoren eine Rolle bei der IRES-vermittelten Proteinexpression spielen. So ist für die effiziente IRES-gesteuerte Translation des Poliovirus das Vorliegen des zellulären La-Proteins erforderlich [²⁷³Meerovitch et al. 1993]. Auch bei HCV spielen zelluläre Proteine eine Rolle [²⁷⁴Scheller et al. 2009]. Jones et al. [²⁷⁵2010] beschrieben in Huh-7 eine höhere HCV-Replikationsrate als in U2OS-Zellen. Offensichtlich exprimieren Huh-7-Zellen zelluläre Faktoren, welche die Funktionalität der HCV-IRES verbessern, was in einer höheren Aktivität resultiert. Auch gibt es Hinweise darauf, dass sich HCV an das Gewebe, in dem es in vivo repliziert, anpasst, was sich unmittelbar auf die Translationseffizienz auswirkt [²⁰³Forton et al. 2004]. Nukleotidsubstitutionen in der IRES-Sequenz führen in vitro in Abhängigkeit vom

verwendeten Zellkultursystem zu unterschiedlichen Proteinexpressionsraten [²⁵⁴Lerat et al. 2000]. Auch durch die Einführung bestimmter Mutationen in etablierte HCV-Replicons konnte deren Replikationseffizienz in Huh-7 optimiert werden [²⁷⁶Krieger et al. 2001]. Möglich wäre demnach bessere Voraussetzungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten IRES für die Replikation in Huh-7-Zellen als in HeLa-Zellen. Unabhängig davon, belegen die Daten eine Verwendbarkeit des etablierten Systems, da die Aktivitäten der GBV-C-Kontrollvektoren mit den Daten der Arbeitsgruppe, die sie zur Verfügung stellte, vergleichbar waren [persönliche Mitteilung P. Karyiannis]. Für die vorliegende Arbeit wurden letztlich 293T-Zellen ausgewählt, um eine möglichst effiziente Expression mit geringen Schwankungen zu gewährleisten, ein deutliches Luziferasesignal signifikant über dem Hintergrund des Assays zu detektieren und so selbst geringe Unterschiede in der IRES-Aktivität nachweisen zu können. Insgesamt waren die beobachteten Werte für die Aktivität der untersuchten GBV-C-IRES im Vergleich zur Kontroll-EMCV-IRES oder zu Aktivitätsangaben der HCV-IRES der Literatur sehr gering. Die Aktivität einer IRES in einem derartigen bicistronischen Konstrukt und die Expression der betreffenden Gene ist nicht nur von der IRES selbst, sondern auch von der Position der betreffenden Gene innerhalb des offenen Leserahmens abhängig [²⁷⁷Hennecke et al. 2001]. Häufig ist die Expression des ersten promotorgesteuerten Gens in einem derartigen Vektor höher als die des zweiten Gens, das unter der Kontrolle der IRES steht [²⁷⁸Mizuguchi et al. 2000]. Darüber hinaus liefern Konstrukte mit Cap-vermittelter Expression der Renillaluziferase und IRES-gesteuerter Fireflyluziferaseexpression bessere Resultate als Konstrukte, die in umgekehrter Reihenfolge konstruiert sind, wie auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Simons et al. [¹¹⁶1996] konnten für GBV-C zeigen, dass eine Verlängerung der C-terminalen Sequenz über das eigentliche Startcodon in den kodierenden Bereich hinein, mit einer erhöhten IRES-Aktivität einhergeht. Ähnliche Hinweise finden sich auch für die Aktivität der HCV- und EMCV-IRES [²⁷⁹Laporte et al. 2000, ²⁸⁰Bochkov et al. 2006].

Ausgewählte IRES-Sequenzen klinischer GBV-C-Isolate mit HIV-1-inhibitorischem und HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp wurden daher mit einem Teil der C-terminal flankierenden E1-Genregion kloniert und analysiert. In Relation zur Aktivität der EMCV-IRES wiesen die untersuchten GBV-C-IRES lediglich eine Aktivität von 6 % bis 13 % auf. Verantwortlich für die geringe IRES-gesteuerte Fireflyexpression könnte eine fehlerhafte posttranslationale Prozessierung der Fireflyluziferase sein. Da die Vektoren neben der IRES-Sequenz auch den N-terminalen Bereich des E1-Proteins enthielten, der für das Signalpeptid des viralen Polyproteins kodiert, ist es möglich, dass die Fireflyluziferase an zellulären Membranen prozessiert und über den Golgi-Apparat aus der Zelle ausgeschleust wurde. Eine direkte Folge wäre eine geringere Fireflyluziferasekonzentration in den Zellen und damit eine geringere Luziferaseaktivität in den untersuchten Zelllysaten. Darüber hinaus ist auch eine Inhibition der Luziferaseaktivität durch die zusätzliche Proteinsequenz denkbar, die möglicherweise die Ausbildung einer für die Funktionalität erforderlichen Raumstruktur verhindert. Die Verkürzung der IRES-Sequenz resultierte zwar in einer signifikant jedoch nur

geringfügig höheren IRES-Aktivität von maximal 6 % in Bezug auf die EMCV-IRES. Allerdings lagen die dokumentierten Werte für die GBV-C-IRES um das 10- bis 100-fache über den publizierten Werten von Simons et al. [¹¹⁶1996]. Die geringere Aktivität der GBV-C-IRES im Vergleich zur Aktivität der EMCV-IRES könnte ein Grund für die fehlende Pathogenität von GBV-C im Menschen und die schlechten Replikationseigenschaften in der Zellkultur sein. Dabei unterstützen die bisherigen Daten auch die Vermutung, dass zudem virale und/oder zelluläre Faktoren essentiell für die effiziente Translation sind. So hat zum Beispiel bei HCV die 3'-NTR zusammen mit dem zellulären Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) über die Rekrutierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 (eIF3) einen fördernden Einfluss auf die Proteinsynthese [²⁸¹Weinlich et al. 2009]. Ebenso kommt es durch das NS2-Protein von HCV zu einer Verstärkung der IRES-vermittelten Translation [²⁸²She et al. 2008]. Obwohl bisher nur wenig über die Regulationsmechanismen bei der GBV-C-Translation bekannt ist, ist ein ähnlicher Mechanismus aufgrund der Verwandtschaft beider Viren dennoch wahrscheinlich.

Die eingangs aufgestellte These, dass die unterschiedlichen HIV-1-inhibitorischen Phänotypen auf die Aktivität der jeweiligen IRES zurückzuführen ist, konnte durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Grund ist, dass die IRES mit den verschiedenen HIV-1-inhibitorischen Phänotypen nicht die geforderte Aktivität aufwies. Überraschend zeigten die in Reverse-Orientierung klonierten GBV-C-IRES eine signifikant höhere Aktivität als die in Forward-Orientierung klonierten IRES. Dieser Effekt war auf die IRES von GBV-C-Isolaten beschränkt und bei der reverse klonierten EMCV-Kontroll-IRES nicht zu beobachten. Bereits Simons et al. [¹¹⁶1996] beschrieben im Rahmen ihrer Arbeit das gleiche Phänomen, interpretierten es jedoch nicht. Die Tatsache, dass dieser Effekt bei allen reverse klonierten GBV-C-IRES beobachtet werden konnte, spricht gegen ein zufälliges Ergebnis. Dennoch kann ein systematischer Fehler nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu HCV, bei dem das Startcodon des viralen Polyproteins direkt mit einer essentiellen Sekundärstruktur assoziiert ist, scheint dies bei GBV-C nicht der Fall zu sein. Bei GBV-C ist das propagierte Startcodon mit keiner konservierten Sekundärstruktur direkt verknüpft. Die Translation des GBV-C-Polyproteins könnte im Hinblick auf analoge Modelle wie folgt ablaufen: An einer dem Startcodon vorgelagerten Sekundärstruktur werden die ribosomalen Untereinheiten gebunden und mit zellulären Faktoren zum funktionellen Ribosom vervollständigt, woraufhin die RNA nach einem Startcodon gescannt wird. Sobald das Startcodon in der P-Bindungsstelle des Ribosoms lokalisiert ist, startet die Translation. Für die IRES-Konstrukte in reverser Orientierung wäre eine ähnliche Strategie denkbar. Obwohl die ausgeprägten Sekundärstrukturen der IRES und das Startcodon im C-terminalen Bereich maßgeblich an der Translation der GBV-C-Proteine beteiligt sind, hat die IRES-Sequenz selbst keine kodierenden Eigenschaften. Auch bei den in Reverse-Orientierung klonierten IRES-Sequenzen finden sich unmittelbar vor dem Beginn der kodierenden Sequenz der Fireflyluziferase mögliche Startcodons, die im Rahmen des Scanningprozesses vom Ribosom erkannt und als Translationsstartpunkt genutzt werden könnten. In diesem Fall

würde die Initiation der Translation der Fireflyluziferase durch das Startcodon in der artifiziellen IRES in Reverse-Orientierung wesentlich effizienter erfolgen als über das Startcodon der in Forward-Orientierung klonierten, natürlich vorkommenden GBV-C-IRES. Diese verbesserte Translationsrate könnte durch eine höhere Ribosomenaffinität infolge einer stabileren Sekundärstruktur der RNA bedingt sein. Auch das Fehlen der die PCR- und Sequenzierreaktionen störenden Helix könnte zu einer Steigerung der Translationseffizienz beitragen. Hinweise darauf geben die von Peter Karayiannis zur Verfügung gestellten GBV-C-Konstrukte. Diese enden 12 Nukleotide nach dem Startcodon und damit vor dem Stemloop (Helix VI) und weisen eine zum Teil 10-fach höhere Aktivität auf als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten IRES.

Obwohl es Hinweise auf einen möglichen Leserahmen in Reverse-Orientierung innerhalb der E2-kodierenden Sequenz gibt [¹²⁰Kondo et al. 1998], ist die Existenz eines solchen Proteins bisher rein spekulativ. Daher ist auch keine Aussage bezüglich der biologischen Relevanz des zuvor beschriebenen hypothetischen Mechanismus für die Expression eines in Reverse-Orientierung kodierten Proteins möglich. Unter nativen Bedingungen müsste es zudem zu einem Ringschluss des in Forward-Orientierung vorliegenden GBV-C-Genoms kommen, um einen solchen Translationsmechanismus zu initiieren. Interessanterweise wurde die Frage, ob es bei Plusstrang-RNA-Viren im Verlauf der Replikation zu einem Ringschluss kommt, bereits für HCV diskutiert [²⁸³Romez-López et al. 2009], und auch im Fall von GBV-C wird diese Möglichkeit als durchaus wahrscheinlich erachtet [²⁸⁴Thurner et al. 2004]. Weiterführende Studien sind aber erforderlich, um diese Hypothese wissenschaftlich zu belegen. Ein erster Schritt wäre der Expressionsnachweis des von Kondo et al. [¹²⁰1998] postulierten Proteins. Durch die Detektion spezifischer, gegen das hypothetische Protein gerichteter Antikörper konnte Richter [¹¹⁹2009] einen indirekten Nachweis für die Existenz eines solchen Proteins bereits erbringen.

Zusammenfassend ist der Mechanismus der GBV-C-vermittelten HIV-1-Suppression sehr vielschichtig und noch nicht vollständig aufgeklärt. Die vorliegende Arbeit hat aber weiter zum Verständnis der viralen Interferenz von GBV-C und HIV-1 beigetragen und konnte unter anderem zeigen, dass sich klinische GBV-C-Isolate in ihrer Eigenschaft, HIV-1 zu hemmen, unterscheiden. Neben HIV-1-inhibitorischen GBV-C-Isolaten konnten auch HIV-1-nichtinhibitorische GBV-C-Isolate identifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit gelang es, für die HIV-1-Hemmung ursächliche virale Determinanten auf einzelne 18mer-Peptide des GBV-C-Oberflächenproteins E2 einzugrenzen. Dabei könnten einzelne E2-Peptide an die HIV-1-Viruspartikel binden und infolgedessen die Infektion der Zielzellen durch HIV-1 hemmen. Von besonderer Bedeutung war in diesem Zusammenhang eine Aminosäure innerhalb des E2-Proteins, die bei klinischen GBV-C-Isolaten mit HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp mutiert war. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten in der Zukunft zur Entwicklung neuer und innovativer HIV-Medikamente beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

EINFLUSS DER GBV-C-INFEKTION AUF DIE HIV-1-REPLIKATION

eingereicht von:

Dipl.-Biol. Solveig Tenckhoff

angefertigt am:

Department für Innere Medizin, Dermatologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums
Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. J. Mössner

Prof. Dr. H. L. Tillmann

Dezember 2011

Das GB Virus C (GBV-C) wurde 1995 im Rahmen der Suche nach neuen Hepatitisviren entdeckt. Das humane, nichtpathogene, umhüllte RNA-Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae* und repliziert überwiegend in B- und T-Lymphozyten. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich sexuell oder parenteral. In Industrieländern sind durchschnittlich 2 bis 4 % der gesunden Bevölkerung und bis zu 45 % der Personen aus Risikokollektiven, zum Beispiel HIV-1-Patienten, virämisch. Aufgrund der gleichen Transmissionswege wurde seit den späten 1990ern der Einfluss von GBV-C auf den klinischen Verlauf der HIV-1-Infektion genauer untersucht. Unerwarteterweise zeigte die Mehrzahl der klinischen Studien, dass GBV-C entgegen der Erwartungen nicht mit einer schnelleren HIV-1-Progression assoziiert war, sondern die GBV-C-Koinfektion sogar mit einer signifikant erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit von GBV-C/HIV-1-koinfizierten Patienten korrelierte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die Beeinflussung der HIV-1-Progression durch GBV-C bei HCV-positiven Kindern und Jugendlichen untersucht. Entgegen der zahlreichen Publikationen über den positiven Effekt von GBV-C bei Erwachsenen konnte er bei den juvenilen Studienpatienten der Hemophilia Growth and Development Study (HGDS) nicht so eindeutig beobachtet werden. Allerdings wurde zwischen einer GBV-C-Virämie und

der Chronifizierung der HCV-Infektion eine signifikante Korrelation nachgewiesen. Sowohl bei erwachsenen HCV-infizierten Patienten, die im Rahmen der Anti-D-Studie, einer Langzeitstudie zum Verlauf der HCV-Infektion, untersucht wurden, als auch bei den HCV-infizierten Kindern verursachte eine gleichzeitige GBV-C-Infektion eine signifikant niedrigere HCV-Ausheilungsrate. Eine HIV-1-Koinfektion hatte einen ähnlichen Effekt auf den klinischen Verlauf der HCV-Infektion in der untersuchten HGDS-Kohorte.

Da klinische Studien keine direkten Zusammenhänge beweisen können, sollte im zweiten Teil der Arbeit der beobachtete Überlebensvorteil von adulten GBV-C/HIV-1-positiven Patienten in Zellkulturexperimenten untersucht werden. Hierfür wurde eine GBV-C-Serumbank aufgebaut und ausgewählte klinische GBV-C-Isolate in GBV-C/HIV-1-Koinfektionsexperimenten charakterisiert. Tatsächlich führte die GBV-C-Infektion von PBMC zu einer signifikanten Suppression der HIV-1-Replikation. Interessanterweise unterschieden sich dabei die GBV-C-Isolate hinsichtlich des von ihnen induzierten HIV-1-inhibitorischen Effekts. Während einige der klinischen GBV-C-Isolate HIV-1-inhibitorisch wirkten, hatten andere GBV-C-Isolate keinen Einfluss auf die Replikation von HIV-1. Es erfolgte daher die Klassifizierung der untersuchten GBV-C-Isolate nach ihrem Phänotyp in HIV-1-inhibitorische und HIV-1-nichtinhibitorische.

Im weiteren Verlauf der Arbeit gelang es, ein für die HIV-1-Hemmung ursächliches GBV-C-Protein zu identifizieren und die kausalen Proteinabschnitte auf mehrere 18mer-Peptide einzugrenzen. Die hemmenden E2-Peptide binden vermutlich an HIV-1-Viruspartikel und induzieren dadurch eine Suppression des HIV-1-spezifischen Eintritts in die Zielzelle. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang eine Aminosäure (E143) innerhalb des Peptides mit der stärksten HIV-1-inhibitorischen Wirkung. Bei allen untersuchten klinischen GBV-C-Isolaten mit HIV-1-nichtinhibitorischem Phänotyp war diese Aminosäure substituiert. Dieses Erkenntnis legt den Schluss nahe, dass der betreffenden E2-Domäne eine bedeutende Rolle im Rahmen der viralen Interferenz von GBV-C und HIV-1 zukommt. Eine Optimierung der HIV-1-inhibitorischen E2-Peptide und die weitere Aufklärung der der HIV-1-Inhibition durch GBV-C zugrunde liegenden Mechanismen stellen innovative Ansätze für die Entwicklung zukünftiger HIV-Medikamente dar und untermauern die eminente Bedeutung von GBV-C als viralen Suppressor von HIV-1.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Gougeon ML, Montagnier L. New concepts in the mechanisms of CD4+ lymphocyte depletion in AIDS, and the influence of opportunistic infections. *Res Microbiol.* 1992 May;143(4):362-8.
2. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997 Jun 15;126(12):946-54.
3. Aronoff DM. Using live pathogens to treat infectious diseases: a historical perspective on the relationship between GB virus C and HIV. *Antivir Ther.* 2002;7(2):73-80.
4. Asada H, Klaus-Kovtun V, Golding H, Katz SI, Blauvelt A. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses HIV-1 replication in coinfecting cultures. *J Virol* 1999;73(5):4019-4028.
5. Pinto LA, Blazevic V, Patterson BK, MacTrubey C, Dolan MJ, Shearer GM. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication prior to Reverse Transcription by Influenza Virus Stimulation. *J Virol.* 2000 May;74(10):4505-4511.
6. Moss WJ, Ryon JJ, Monze M, Cutts F, Quinn TC, Griffin DE. Suppression of human immunodeficiency virus replication during acute measles. *J Infect Dis.* 2002 Apr 15;185(8):1035-42.
7. García M, Yu XF, Griffin DE, Moss WJ. In vitro suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by measles virus. *J Virol.* 2005 Jul;79(14):9197-205.
8. Ruel TD, Achan J, Gasasira AF, Charlebois ED, Mehbratu T, Rosenthal PJ, Dorsey G, Kanya MR, Kekitiinwa A, Wong J, Havlir DV. HIV RNA suppression among HIV-infected Ugandan children with measles. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008 Jun 1;48(2):225-7.
9. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, Hunt J, Jou C, Solomon N, Schmidt RE, Manns MP. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favourable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? *J Infect Dis.* 1998;177(6):1723-6.
10. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, Goergen B, Detmer J, McMorro M, Stoll M, Schmidt RE, Manns MP. Infection with GB Virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001; 6;345(10):715-24.
11. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, Stapleton JT. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2001;345:707-714.
12. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viremia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med.* 2006;7:173-180.
13. CDC. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30:1-3.
14. CDC. Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31:365-367.
15. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-71.
16. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220:865-867.
17. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 1984 Aug 24;225(4664):840-2.
18. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Termin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R. HIV. *Science.* 1986;232:697.
19. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* 2009, 23:147-160.
20. Clavel F, Guetard D, Brun-Veziniet F, Chamaret S, Rey M, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzleoux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 1986;233:343-346.
21. Schim van der Loeff MF, Jaffar S, Aveika AA, Sabally S, Corrah T, Harding E, Alabi A, Bayang A, Ariyoshi K, Whittle HC. Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia. *AIDS.* 2002 Sep 6;16(13):1775-83.
22. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, Kapitel 3.
23. Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):55-65.

24. Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*. 1985;227:173-177.
25. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of HIV and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987;156:171-176.
26. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;53:55-67.
27. Earl PL, Doms RW, Ross B. Oligomeric structure of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:648-652.
28. Weiss CD, Levy JA, White JM. Oligomeric organization of gp120 on infectious HIV-1 particles. *J Virol*. 1990;64:5674-5677.
29. Kuznetsov YG, Victoria JG, Robinson WE Jr, McPherson A. Atomic force microscopy investigation of HIV and HIV-infected lymphocytes. *J Virol*. 2003;77:11896-11909.
30. Zhu P, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 2006;41:847-852.
31. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamp RA, Martin MA. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2006;5th revised edition.
32. Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(5):1495-9.
33. Sawai ET, Baur A, Struble H, Peterli BM, Levy JA, Cheng-Mayer C. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:1539-1543.
34. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002 Aug 8;418(6898):646-50.
35. Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriët S, Paillart JC, Marquet R. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(2):633-46.
36. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*. 2002;8:673-680.
37. Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *PNAS*. Febr, 2006;103(9):3369-3374.
38. Belzile JP, Abrahamyan LG, Gérard FCA, Rougeau N, Cohen ÉA. Formation of Mobile Chromatin-Associated Nuclear Foci Containing HIV-1 Vpr and VPRBP Is Critical for the Induction of G2 Cell Cycle Arrest. *PLoS Pathog*. 2010 Sep 2;6(9):e1001080.
39. Freed EO. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *TRENDS in Microbiology* Vol.12 No.4 April 2004.
40. Cullen BR, Greene WC. Functions of the auxiliary gene products of the HIV type 1. *Virology*. 1990;178, 1-5.
41. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 1992;360:358-361.
42. Subbramanian RA, Cohen EA. Molecular biology of the HIV accessory proteins. *J Virol*. 1994;68:6831-6835.
43. Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;214:219-235.
44. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-666.
45. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1149-58.
46. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-877.
47. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*. 1997 Jul;71(7):5382-90.
48. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001;26:13-33.
49. Gomez C, Hope TJ. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*. 2005;7:621-626.
50. UNAIDS and WHO. AIDS epidemic update: December 2010. Report.
51. Quinn TC, Wawer MJ et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1, Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000;6(1):82-85.
52. Gray RH, Wawer MJ, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamies, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 2001;357(9263):1149-1153.

53. Busch MP, Operskalski EA, Mosley JW, Lee TH, Henrard D, Herman S, Sachs DH, Harris M, Huang W, Stram DO. Factors influencing human immunodeficiency virus type 1 transmission by blood transfusion. Transfusion Safety Study Group. *J Infect Dis.* 1996;174:26-33.
54. Quinn TC. Global burden of the HIV pandemic. *Lancet* 1996;348:99-106.
55. Kashuba AD, Dyer JR, Kramer LM, Raasch RH, Eron JJ, Cohen MS. Antiretroviral-drug concentrations in semen: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1817-1826.
56. Shepard RN, Schock J, Robertson K, Shugars DC, Dyer J, Vernazza P, Hall C, Cohen S, Fiscus SA. Quantitation of HIV type 1 RNA in different biological compartments. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1414-1418.
57. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993 Mar 19;259(5102):1749-54.
58. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol.* 2004;5(3):233-236.
59. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68:6103-6110.
60. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68(7):4650-4655.
61. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar 4;94(5):1890-5.
62. Huang L, Crothers K. HIV-associated opportunistic pneumonias. *Respirology.* 2009 May;14(4):474-85.
63. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 1991 Apr 6;337(8745):805-9.
64. Weiss RA. Retroviruses and human disease. *J Clin Pathol.* 1987 Sep;40(9):1064-9.
65. Rastogi N, McFadden JJ. Mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system. *Res Microbiol.* 1992 May;143(4):361-2.
66. Luft BJ, Remington JS. AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis.* 1988 Jan;157(1):1-6.
67. Crowe SM, Carlin JB, Stewart KI, Lucas CR, Hoy JF. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991;4(8):770-6.
68. Miller V, Mocroft A, Reiss P, Katlama C, Papadopoulos AI, Katzenstein T, van Lunzen J, Antunes F, Phillips AN, Lundgren JD. Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA study. *Ann Intern Med.* 1999 Apr 6;130(7):570-7.
69. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, O'Shea MA, Hallahan CW, Daucher M, Ward DJ, Moir S, Mullins JI, Kovacs C, Fauci AS. HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3250-5.
70. Dau B, Holodniy M. Novel targets for antiretroviral therapy: clinical progress to date. *Drugs.* 2009;69(1):31-50.
71. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.* 1995 Aug;69(8):5087-94.
72. Chen R, Quinones-Mateu ME, Mansky LM. Drug resistance, virus fitness and HIV-1 mutagenesis. *Curr Pharm Des.* 2004;10(32):4065-70.
73. Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S. Emerging of HIV drug resistance: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *Curr HIV Res.* 2009 May;7(3):273-8.
74. Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):1896-905.
75. Delaugerre C, Flandre P, Chaix ML, Ghosn J, Raffi F, Dellamonica P, Jaeger H, Shürmann D, Cohen-Codar I, Van PN, Norton M, Taburet AM, Delfraissy JF, Rouzioux C; MONARK Study Group. Protease inhibitor resistance analysis in the MONARK trial comparing first-line lopinavir-ritonavir monotherapy to lopinavir-ritonavir plus zidovudine and lamivudine triple therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jul;53(7):2934-9.
76. Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin – Eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Verlag Arzt + Information. 6. Ergänzte Auflage 2005.

77. Carr A, Marriott D, Field A, Vasak E, Cooper DA. Treatment of HIV-1-associated microsporidiosis and cryptosporidiosis with combination antiretroviral therapy. *Lancet*. 1998 Jan 24;351(9098):256-61.
78. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998 Mar 26;338(13):853-60.
79. Race EM, Adelson-Mitty J, Krieger GR, Barlam TF, Reimann KA, Letvin NL, Japour AJ. Focal mycobacterial lymphadenitis following initiation of protease-inhibitor therapy in patients with advanced HIV-1 disease. *Lancet*. 1998 Jan 24;351(9098):252-5.
80. Chen LF, Hoy J, Lewin SR. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Med J Aust*. 2007 Feb 5;186(3):146-51.
81. Boyd MA. Improvements in antiretroviral therapy outcomes over calendar time. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 May;4(3):194-9.
82. Randell P, Moyle G. Antiretroviral therapy with heart. *Am J Ther*. 2009 Nov-Dec;16(6):579-84.
83. Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. Hepatitis B and C in HIV-infected patients. Prevalence and prognostic value. *J Hepatol*. 1997;27(1):18-24.
84. Borgia G, Reynaud L, Gentile I, Piazza M. HIV and hepatitis C virus: facts and controversies. *Infection* 2003;31:232-240.
85. Konopnicki D, Mocroft A, de Wit S, Antunes F, Ledergerber B, Katlama C, Zilmer K, Vella S, Kirk O, Lundgren JD; EuroSIDA Group. Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. *AIDS* 2005;19(6):593-601.
86. Rockstroh JK, Mocroft A, Soriano V, Tural C, Losso MH, Horban A, Kirk O, Phillips A, Ledergerber B, Lundgren J; EuroSIDA Study Group. Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15;192(6):992-1002.
87. Thomas DL. The challenge of hepatitis C in the HIV-infected person. *Annu Rev Med*. 2008;59, 473-485.
88. Blackard JT, Sherman KE. HCV/ HIV co-infection: time to re-evaluate the role of HIV in the liver? *J Viral Hepat*. 2008;15:323-330.
89. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *JAMA*. 1965 Feb 15;191:541-6.
90. Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia antigen). *Blood*. 1966 Mar;27(3):297-309.
91. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970 Apr 4;1(7649):695-8.
92. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1973 Dec 7;182(116):1026-8.
93. Feinstone SM, Kapikian AZ, Gerin JL, Purcell RH. Buoyant density of the hepatitis A virus-like particle in cesium chloride. *J Virol*. 1974 Jun;13(6):1412-4.
94. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med*. 1967 Apr 1;125(4):673-88.
95. Deinhardt F, Peterson D, Cross G, Wolfe L, Holmes AW. Hepatitis in marmosets. *Am J Med Sci*. 1975 Jul-Aug;270(1):73-80.
96. Tabor E, Seeff LB, Gerety RJ. Lack of susceptibility of marmosets to human non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis*. 1979;140(5):794-797.
97. Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology*. 1993 Apr;104(4):955-63.
98. Rizzetto M, Shih JW, Gocke DJ, Purcell RH, Verme G, Gerin JL. Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet*. 1979 Nov 10;2(8150):986-90.
99. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.
100. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
101. Simons JN, Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med*;1995;1(6):564-569.
102. Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih JW, Young L, Piatak M Jr, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SK, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 1996 Jan 26;271(5248):505-8.
103. Zuckerman JN. Hepatitis--how far down the alphabet? *J Clin Pathol*. 1997 Jan;50(1):1-2.

104. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2011 Feb;92(Pt 2):233-46.
105. Smith DB, Basaras M, Frost S, Haydon D, Cuceanu N, Prescott L, Kamenka C, Millband D, Sathar MA, Simmonds P. Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol.* 2000 Mar;81(Pt 3):769-80.
106. Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J Med Virol.* 2006 Jan;78(1):105-11.
107. Mohr EL, Stapleton JT. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *J Viral Hepat.* 2009;16:757-768.
108. Tucker TJ, Smuts HE. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J Med Virol.* 2000 Sep;62(1):82-3.
109. Nishiya AS, Ribeiro-dos-Santos G, Bassit L, Focaccia R, Chamone DF, Sabino EC. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003 Jul-Aug;45(4):213-6.
110. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, Schlauder GG, Dawson GJ, Desai SM, Mushahwar IK. Sequence and Genomic Organization of GBV-C: A Novel Member of the Flaviviridae Associated With Human Non-A-E Hepatitis. *J Med Virol.* 1996;48:60-67.
111. Belyaev AS, Chong S, Novikov A, Kongpachith A, Masiarz FR, Lim M, Kim JP. Hepatitis G virus encodes protease activities which can effect processing of the virus putative nonstructural proteins. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):868-72.
112. Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol.* 2001 Apr;82(Pt 4):693-712.
113. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: Insights into co-infection. *J Clin Virol.* 2005;33, 257-266.
114. Grassmann CW, Yu H, Isken O, Behrens SE. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: Implications for the viral life cycle. *Virology* 2005;333:349-366.
115. Erker JC, Simons JN, Muerhoff AS, Leary TP, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Molecular cloning and characterization of a GB virus C isolate from a patient with non-A-E hepatitis. *J Gen Virol.* 1996;77:2713-2720.
116. Simons JN, Desai SM, Schultz DE, Lemon SM, Mushahwar IK. Translation Initiation in GB Viruses A and C: Evidence for Internal Ribosome Entry and Implications for Genome Organization. *J Virol.* 1996;61:26-35.
117. Xiang J, Klinzmann D, McLinden J, Schmidt WN, LaBrecque DR, Gish R, Stapleton JT. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol.* 1998;72:2738-2744.
118. Xiang J, Daniels KJ, Soll DR, Schmidt WN, Labrecque DR, Stapleton JT. Visualization and characterization of GB virus-C particles: evidence for a nucleocapsid. *J Viral Hepat.* 1999 Jul;6 Suppl 1:16-22.
119. Richter M. Entwicklung Antigen-basierter Capture ELISA zum serodiagnostischen Nachweis GBV-C spezifischer Antikörper. Diplomarbeit 2009, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Erlangen.
120. Kondo Y, Mizokami M, Nakano T, Kato T, Tanaka Y, Hirashima N, Ueda R, Kunimatsu M, Sasaki M, Yasuda K, Iino S. Analysis of conserved ambisense sequences within GB virus C. *J Infect Dis.* 1998 Oct;178(4):1185-8.
121. Pavesi A. Detection of signature sequences in overlapping genes and prediction of a novel overlapping gene in hepatitis G virus. *J Mol Evol.* 2000 Mar;50(3):284-95.
122. Berg T, Müller AR, Platz KP, Höhne M, Bechstein WO, Hopf U, Wiedenmann B, Neuhaus P, Schreier E. Dynamics of GB Virus C Viremia Early After Orthotopic Liver Transplantation Indicates Extrahepatic Tissues as the Predominant Site of GB Virus C Replication. *Hepatology.* 1999;29:245-249.
123. Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Liver and peripheral blood mononuclear cells are not major sites for GB virus-C/hepatitis G virus replication. *Arch Virol.* 1999;144(11):2173-83.
124. Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, Furuwatari C, Katsuyama T, Kawasaki S, Kiyosawa K. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol.* 1999 Feb;57(2):114-21.
125. Fogeda M, Navas S, Martín J, Casqueiro M, Rodríguez E, Arocena C, Carreno V. In Vitro Infection of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by GB Virus C/Hepatitis G Virus. *J Virol.* May 1999;73(5):4052-4061.
126. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol.* 2000;74:9125-9133.
127. George SL, Varmaz D, Stapleton JT. GB Virus C Replicates in Primary T and B Lymphocytes. *J Infect Dis.* 2006 Feb 1;193(3):451-4.
128. Nattermann J, Nischalke H, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, Spengler U. Regulation of CC chemokine receptor 5 in Hepatitis G virus infection. *AIDS* 2003;17:1457-1462.

129. Kaufman TM, McLinden JH, Xiang J, Engel AM, Stapleton JT. The GBV-C envelope glycoprotein E2 does not interact specifically with CD81. *AIDS*. 2007;21:1043-1058.
130. Ali N, Tardif KD, Siddiqui A. Cell-free replication of the hepatitis C virus subgenomic replicon. *J Virol*. 2002 Dec;76(23):12001-7.
131. Ferron F, Bussetta C, Dutartre H, Canard B. The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C Virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics*. 2005 Oct 14;6:255.
132. Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;242:55-84.
133. Cuceanu NM, Tuplin A, Simmonds P. Evolutionarily conserved RNA secondary structures in coding and non-coding sequences at the 3' end of the hepatitis G virus/GB-virus C genome. *J Gen Virol*. 2001;82:713-722.
134. Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Laufs R. Vertical transmission of hepatitis G. *Lancet*. 1996;347:615-616.
135. Lin HH, Kao JH, Chen PJ, Chen DS. Mechanism of vertical transmission of hepatitis G. *Lancet*. 1996;347:1116.
136. Schmidt B, Korn K, Fleckenstein B. Molecular evidence for transmission of hepatitis G virus by blood transfusion. *Lancet*. 1996;347:909.
137. Stark K, Bienzle U, Hess G, Engel AM, Hegenscheid B, Schluter V. Detection of the hepatitis G virus genome among injecting drug users, homosexual and bisexual men, and blood donors. *J Infect Dis*. 1996;174:1320-1323.
138. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, Kim JP. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med*. 1997;336:747-754.
139. Kao JH, Liu CJ, Chen PJ, Chen W, Hsiang SC, Lai MY, Chen DS. Interspousal transmission of GB virus-C/hepatitis G virus: a comparison with hepatitis C virus. *J Med Virol*. 1997;53:348-353.
140. Viazov S, Riffelmann M, Sarr S, Ballauff A, Meisel H, Roggendorf M. Transmission of GBV-C/HGV from drug-addicted mothers to their babies. *J Hepatol*. 1997;27:85-90.
141. Lefrère JJ, Sender A, Mercier B, Mariotti M, Pernot F, Soulié JC, Malvoisin A, Berry M, Gabai A, Lattes F, Galiay JC, Pawlak C, de Lachaux V, Chauveau V, Hreiche G, Larsen M, Férec C, Parnet-Mathieu F, Roudot-Thoraval F, Brossard Y. High rate of GB virus type C/HGV transmission from mother to infant: possible implications for the prevalence of infection in blood donors. *Transfusion*. 2000;40:602-607.
142. Frey SE, Homan SM, Sokol-Anderson M, Cayco MT, Cortorreal P, Musial CE, Di Bisceglie. Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis g virus. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1033-1038.
143. Paternoster D, Serena A, Santin M, Marchiori S, Surico N, Amoroso E, Longo D, Gussetti N. GB virus C infection in pregnancy: Maternal and perinatal importance of the infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 Jun;144(2):115-8.
144. Dille BJ, Surowy TK, Gutierrez RA, Coleman PF, Knigge MF, Carrick RJ, Aach RD, Hollinger FB, Stevens CE, Barbosa LH, Nemo GJ, Mosley JW, Dawson GJ, Mushahwar IK. An ELISA for detection of antibodies to the E2 protein of GB virus C. *J Infect Dis*. 1997;175:458-461.
145. Nordbo SA, Krokstad S, Winge P, Skjeldestad FE, Dalen AB. Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2584-2590.
146. Christensen PB, Fisker N, Mygind LH, Krarup HB, Wedderkopp N, Varming K, Georgsen J. GB virus C epidemiology in Denmark: different routes of transmission in children and low- and high-risk adults. *J Med Virol*. 2003;70:156-162.
147. Dawson GJ, Schlauder GG, Pilot-Matias TJ, Thiele D, Leary TP, Murphy P, Rosenblatt JE, Simons JN, Martinson FE, Gutierrez RA, Lentino JR, Pachucki C, Muerhoff AS, Widell A, Tegtmeier G, Desai S, Mushahwar IK. Prevalence studies of GB virus-C infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1996 Sep;50(1):97-103.
148. Tucker TJ, Louw SJ, Robson SC, Isaacs S, Kirsch RE. High prevalence of GBV-C hepatitis G virus infection in a rural South African population. *J Med Virol*. 1997;53:225-228.
149. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohba K, Kato T, Kondo Y, Mboudjeka I, Zekeng L, Kaptue L, Bikandou B, M'Pele P, Takehisa J, Hayami M, Suzuki Y, Gojobori T. African origin of GB virus C/hepatitis G virus. *FEBS Lett*. 1998;423:143-148.
150. Tuveri R, Perret JL, Delaporte E, Nguemby-Mbina C, D'Allones LR, Henzel D, Faivre D, Scarpa B, Contu P, Colombo M, Thiers V, Bréchet C, Larouze B. Prevalence and genetic variants of hepatitis GB-C/HG and TT viruses in Gabon, equatorial Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;63:192-198.
151. Tacke M, Schmolke S, Schlueter V, Saulea S, Esteban JI, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ, Schmitt U, Hess G, Ofenloch-Haehnle B, Engel AM. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. *Hepatology*. 1997;26:1626-1633.

152. Feucht HH, Fischer L, Sterneck M, Knödler B, Broelsch CE, Laufs R. GB virus C infection and liver transplantation: increased risk of transfusion-transmitted infection. *Blood*. 1997;89:2223-2224.
153. Tillmann HL, Heringlake S, Trautwein C, Meissner D, Nashan B, Schlitt HJ, Kratochvil J, Hunt J, Qiu X, Lou SC, Pichlmayr R, Manns MP. Antibodies against the GB virus C envelope 2 protein before liver transplantation protect against GB virus C de novo infection. *Hepatology*. 1998;28:379-384.
154. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, Liu C, Phair J, Margolick JB, Zdunek D, Hess G, Stapleton JT. Persistent GB Virus C Infection and Survival in HIV-Infected Men. *N Engl J Med* 2004;350:981-90.
155. Tacke M, Kiyosawa K, Stark K, Schlueter V, Ofenloch-Haehnle B, Hess G, Engel AM. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet*. 1997;349:318-320.
156. Feucht H, Schröter M, Zöllner B, Polywka S, Laufs R. Age-Dependent Acquisition of Hepatitis G Virus/GB Virus C in a Nonrisk Population: Detection of the Virus by Antibodies. *J Clin Microbiol*. 1999 May;37(5):1294-7.
157. Tan D, Matsumoto A, Conry-Cantilena C, Melpolder JC, Shih JW, Leuther M, Hess G, Gobble JW, Ness PM, Alter HJ. Analysis of hepatitis G virus (HGV) RNA, antibody to HGV envelope protein, and risk factors for blood donors coinfecting with HGV and hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 1999;179:1055-1061.
158. Björkman P, Widell A, Veress B, Verbaan H, Hoffmann G, Elmståhl S, Lindgren S. GB virus C/hepatitis G virus infection in patients investigated for chronic liver disease and in the general population in southern Sweden. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:611-617.
159. Kleinman S. Hepatitis G virus biology, epidemiology, and clinical manifestations: Implications for blood safety. *Transfus Med Rev*. 2001;15:201-212.
160. Heringlake S, Tillmann HL, Cordes-Temme P, Trautwein C, Hunsmann G, Manns MP. GBV-C/HGV is not the major cause of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1996;25:980-984.
161. Panda SK, Panigrahi AK, Dasarathy S, Acharya SK. Hepatitis G virus in India. *Lancet*. 1996;348:1319.
162. Lightfoot K, Skelton M, Kew MC, Yu MC, Kedda MA, Coppin A, Hodgkinson J. Does hepatitis GB virus-C infection cause hepatocellular carcinoma in black Africans? *Hepatology*. 1997;26:740-742.
163. Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Ehata T, Saisho H, Omata M. GB virus-C RNA in Japanese patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Hepatology*. 1997;27:464-469.
164. Rambusch EG, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heringlake S, Manns MP. Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C--a review of the literature. *Z Gastroenterol*. 1998 Jan;36(1):41-53.
165. Tagger A, Ribero ML, Larghi A, Donato F, Zuin M, Chiesa R, Benetti G, Ramella G, Borzio M, Podda M. Prevalence of GB virus-C/hepatitis G virus infection in patients with cryptogenic chronic liver disease and in patients with primary biliary cirrhosis or Wilson's disease. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:484-488.
166. Kapoor S, Gupta RK, Das BC, Kar P. Clinical implications of hepatitis G virus (HGV) infection in patients of acute viral hepatitis & fulminant hepatic failure. *Indian J Med Res*. 2000;112:121-127.
167. Jones JF, Kulkarni PS, Butera ST, Reeves WC. GB virus-C – a virus without a disease: We cannot give it chronic fatigue syndrome. *BMC Inf Diseases*. 2005;5:78.
168. Vogt M, Klostermann B, Braun S, Busch R, Hess J, Frösner G, Lang T. Prevalence and clinical role of GBV-C infection after cardiac surgery in childhood: a study on 414 patients. *J Infect*. 2006 Jul;53(1):43-8.
169. Tassopoulos NC, Papatheodoridis GV, Delladetsima I, Hatzakis A. Clinicopathological features and natural history of acute sporadic non-(A-E) hepatitis. *Gastroenterol Hepatol*. 2008 Aug;23(8 Pt 1):1208-15.
170. Yoshida M, Okamoto H, Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet*. 1995 Oct 28;346(8983):1131-2.
171. Heringlake S, Osterkamp S, Trautwein C, Tillmann HL, Böker K, Muerhoff S, Mushahwar IK, Hunsmann G, Manns MP. Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV virus C. *Lancet*. 1996 Dec 14;348(9042):1626-9.
172. Feucht HH, Fischer L, Sterneck M, Broelsch CE, Laufs R. GB virus C transmission by blood products. *Lancet*. 1997 Feb 8;349(9049):435.
173. Inoue K, Yoshida M, Sekiyama K, Kohara M. Possible association between serum GB virus C RNA level and disease activity in fulminant hepatitis type G. *J Hepatol*. 1999 May;30(5):801-6.
174. De Renzo A, Persico E, de Marino F, di Giacomo Russo G, Notaro R, di Grazia C, Picardi M, Santoro L, Torella R, Rotoli B, Persico M. High prevalence of hepatitis G virus infection in Hodgkin's disease and B-cell lymphoproliferative disorders: absence of correlation with hepatitis C virus infection. *Haematologica*. 2002;87:714-718.
175. Kraiden M, Yu A, Braybrook H, Lai AS, Mak A, Chow R, Cook D, Tellier R, Petric M, Gascoyne RD, Connors JM, Brooks-Wilson AR, Gallagher RP, Spinelli JJ. GBV-C/hepatitis G virus infection and non-Hodgkin lymphoma: a case control study. *Int J Cancer*. 2009 Jun 15;126(12):2885-92.
176. Stapleton JT, Chaloner K. GB virus C infection and non-Hodgkin lymphoma: important to know but the jury is out. *Int J Cancer*. 2010 Jun 15;126(12):2759-61.

177. Ernst D, Pischke S, Greer M, Wedemeyer H, Stoll M. No increased incidence for GB-virus C infection in a cohort of HIV-positive lymphoma patients. *Int J Cancer*. 2010 Aug 19.
178. Kraiden M, Cook D, Spinelli JJ. Author's reply to: no increased incidence for GB-Virus C infection in a cohort of HIV-positive lymphoma patients. *Int J Cancer*. 2010 Aug 19.
179. Lau DT, Miller KD, Detmer J, Kolberg J, Herpin B, Metcalf JA, Davey RT, Hoofnagle JH. Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus coinfection: response to interferon-alpha therapy. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):1334-7.
180. Rey D, Fraize S, Vidinic J, Meyer P, Fritsch S, Labouret N, Schmitt C, Lang JM, Stoll-Keller F. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Med Virol*. 1999 Jan;57(1):75-9.
181. Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, Clotet B, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC, Martinez MA. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000 Jan 1;23(1):89-94.
182. Rendina D, Vigorita E, Bonavolta R, D'Onofrio M, Iura A, Pietronigro MT, Laccetti R, Bonadies G, Liuzzi G, Borgia G, Formisano P, Laccetti P, Portella G. HCV and GBV-c/HGV infection in HIV positive patients in southern Italy. *Eur J Epidemiol*. 2001;17:801-807.
183. Hinrichsen H, Leimenstoll G, Stegen G, Schrader H, Fölsch UR, Schmidt WE; PHV Study Group. Prevalence of and risk factors for hepatitis G (HGV) infection in haemodialysis patients: a multicentre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Feb;17(2):271-5.
184. Oubiña JR, Mathet V, Feld M, Della Latta MP, Ferrario D, Verdun R, Libonatti O, Fernández J, Carballal G, Sánchez DO, Quarleri JF. Genetic diversity of GBV-C/HGV strains among HIV infected-IVDU and blood donors from Buenos Aires, Argentina. *Virus Res*. 1999 Dec 15;65(2):121-9.
185. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, Mariotti M. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis*. 1999;179:783-789.
186. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. *Multicenter Hemophilia Cohort Study*. *Ann Intern Med*. 2000;132:959-963.
187. Yirrell DL, Wright E, Shafer LA, Campbell E, Van der Paal L, Kaleebu P, Grosskurth H, Whitworth JA. Association between active GB virus-C (hepatitis G) infection and HIV-1 disease in Uganda. *Int J STD AIDS*. 2007 Apr;18(4):244-9.
188. Moenkemeyer M, Schmidt RE, Wedemeyer H, Tillmann H, Heiken H. GBV-C coinfection is negatively correlated to Fas expression and Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infected patients. *J Med Virol*. 2008;80:1933-1940.
189. Birk M, Lindbäck S, Lidman C. No influence of GB virus C replication on the prognosis in a cohort of HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2002 Dec 6;16(18):2482-5.
190. Brumme ZL, Chan KJ, Dong WW, Mo T, Wynhoven B, Hogg RS, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, Harrigan PR. No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS*. 2002 Sep 27;16(14):1929-33.
191. Björkman P, Flamholz L, Naució A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A. GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *AIDS*. 2004 Apr 9;18(6):877-86.
192. Kaye S, Howard M, Alabi A, Hansmann A, Whittle H, Schim van der Loeff M. No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin Infect Dis*. 2005 Mar 15;40(6):876-8.
193. Xiang J, George SL, Wünschman S, Chang Q, Klinzmann D, Stapleton JT. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , and SDF-1. *Lancet*. 2004;363:2040-46.
194. Jung S, Knauer O, Donhauser N, Eichenmüller M, Helm M, Fleckenstein B, Reil H. Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *AIDS*. 2005;19:1267-1272.
195. Schuval S, Lindsey JC, Stapleton JT, Van Dyke RB, Palumbo P, Mofenson LM, Oleske JM, Cervia J, Kovacs A, Dankner WN, Smith E, Nowak B, Ciupak G, Webb N, Eagle M, Smith D, Hennessey R, Goodman-Kerkau M, Klinzman D, Hess G, Zdunek D, Levin MJ; Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 1028S Team. GB virus C infection in children with perinatal human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 May;24(5):417-22.
196. Zhang Y. I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9:100-13.
197. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2010;5(4):725-38.

198. Herrera E, Tenckhoff S, Gómera MJ, Galatola R, Bleda MJ, Gil C, Ercilla G, Gatell JM, Tillmann HL, Haro I. Effect of Synthetic Peptides Belonging to E2 Envelope Protein of GB Virus C on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Med. Chem.* 2010;53:6054-6063.
199. Hamilton, M. A., R. C. Russo, and T. V. Thurston. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 1977;11:714-719.
200. Daar ES, Lynn H, Donfield S, Gomperts E, O'Brien SJ, Hilgartner MW, Hoots WK, Chernoff D, Arkin S, Wong WY, Winkler CA; Hemophilia Growth and Development Study. Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs. *J Infect Dis.* 2001 Feb 15;183(4):589-95.
201. Soogoor M, Lynn HS, Donfield, SM, Gomperts E, Bell TS, Daar ES; for the Hemophilia Growth and Development Study. Hepatitis C virus infection and neurocognitive function. *Neurology.* 2006;67:1482-1485.
202. Loveland KA, Stehens J, Contant C, Bordeaux JD, Sirois P, Bell TS, Hill S. Hemophilia Growth and Development Study: Baseline Neurodevelopmental Findings. *J Pediatr Psychol.* 1994 Apr;19(2):223-39.
203. Forton DM, Karayiannis P, Mahmud N, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. *J Virol.* 2004 May;78(10):5170-83.
204. Kaiser T. Entwicklung, Etablierung und Anwendung einer Real-Time-PCR-Methode zur Untersuchung der Relevanz einer GB-Virus C-Infektion bei HIV-infizierten Patienten. Dissertationsschrift 2005, Universität Leipzig.
205. Seipp S, Scheidel M, Hofmann WJ, Töx U, Theilmann L, Goeser T, Kallinowski B. Hepatotropism of GB virus C (GBV-C): GBV-C replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. *J Hepatol.* 1999 Apr;30(4):570-9.
206. George SL, Xiang J, Stapleton JT. Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virology.* 2003 Nov 25;316(2):191-201.
207. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Jordan EL, Stapleton JT. Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PLoS One.* 2008 Jul 2;3(7):e2580.
208. Herrera E, Gomara MJ, Mazzini S, Ragg E, Haro I. Synthetic peptides of hepatitis G virus (GBV-C/HGV) in the selection of putative peptide inhibitors of the HIV-1 fusion peptide. *J Phys Chem B.* 2009 May 21;113(20):7383-91.
209. Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11259-73.
210. Cao MM, Ren H, Zhao P, Pan W, Chen QL, Qi ZT. Persistent replication of the GBV-C subgenomic replicons in Huh7 cells. *J Virol Methods.* 2009 May;157(2):168-74.
211. UNAIDS and WHO. AIDS epidemic update: December 2009. Report.
212. Herrero MD, Rivas P, Rallón NI, Ramírez-Olivencia G, Puente S. HIV and malaria. *AIDS Rev.* 2007 Apr-Jun;9(2):88-98.
213. Thio CL. Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology.* 2009 May;49(5 Suppl):S138-45.
214. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1996 Nov;2(11):1240-3.
215. Biti R, French R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med.* 1997 Mar;3(3):252-3.
216. Mannucci PM, Schimpf K, Brettler DB, Ciavarella N, Colombo M, Haschke F, Lechner K, Lusher J, Weissbach G. Low risk for hepatitis C in hemophiliacs given a high-purity, pasteurized factor VIII concentrate. International Study Group. *Ann Intern Med.* 1991 Jan 15;114(2):171.
217. Morfini M, Mannucci PM, Ciavarella N, Schiavoni M, Gringeri A, Rafanelli D, Di Bona E, Chistolini A, Tagliaferri A, Rodorigo G, et al. Prevalence of infection with the hepatitis C virus among Italian hemophiliacs before and after the introduction of virally inactivated clotting factor concentrates: a retrospective evaluation. *Vox Sang.* 1994;67(2):178-82.
218. http://history.nih.gov/NIHInOwnWords/docs/page_30.html. November 2011.
219. Montagnier L. Historical Essay, *Science.* 2002;298:1727-8.
220. Morin T, Pariente A. Acute hepatitis C: a retrospective study of 62 cases. *Gastroenterol Clin Bio.* 2002;26:994-1000.
221. Santantonio T, Medda E, Ferrari C, Fabris P, Cariti G, Massari M, Babudieri S, Toti M, Francavilla R, Ancarani F, Antonucci G, Scotto G, Di Marco V, Pastore G, Stroffolini T. Risk factors and outcome among a large patient cohort with community-acquired acute hepatitis C in Italy. *Clin Infect Dis.* 2006 Nov 1;43(9):1154-9.

222. Deterding K, Wiegand J, Grüner N, Wedemeyer H. Medical procedures as a risk factor for HCV infection in developed countries: Do we neglect a significant problem in medical care? *J Hepatol.* 2008;48:1018-1021.
223. Martínez-Bauer E, Fornis X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, Fàbregas S, Vega R, Salmerón J, Diago M, Sánchez-Tapias JM, Bruguera M, The Spanish Acute HCV Study Group. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol.* 2008;48:20-27.
224. Anastassopoulou CG, Paraskevis D, Tassopoulos NC, Boletis J, Sypsa VA, Hess G, Hatzakis A. Molecular epidemiology of GB virus C/hepatitis G virus in Athens, Greece. *J Med Virol.* 2000 Jul;61(3):319-26.
225. Handa A, Jubran RF, Dickstein B, Boylan A, Luban NLC, Young NS, Brown KE. GB Virus C/Hepatitis G Virus Infection Is Frequent in American Children and Young Adults. *Clin Infect Dis.* 2000;30:569-71.
226. Woelfle J, Berg T, Bialek R, Keller KM, Effenberger W, Wagner N. GB virus C/hepatitis G virus infection in HIV infected patients with haemophilia despite treatment with virus inactivated clotting factor concentrates. *Arch Dis Child.* 1999;80:429-432.
227. Berg T, Dirla U, Naumann U, Heuft HG, Küther S, Lobeck H, Schreier E, Hopf U. Responsiveness to interferon alpha treatment in patients with chronic hepatitis C coinfecting with hepatitis G virus. *J Hepatol.* 1996 Nov;25(5):763-8.
228. Schreier E, Hohne M, Kunkel U, Berg T, Hopf U. Hepatitis GBV-C sequences in patients infected with HCV contaminated anti-D immunoglobulin and among i.v. drug users in Germany. *Hepatology.* 1996;25:385-389.
229. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology.* 2000 Jul;32(1):91-6.
230. Wiese M, Grüngreif K, Güthoff W, Lafrenz M, Oesen U, Porst H; East German Hepatitis C Study Group. Outcome in a hepatitis C (genotype 1b) single source outbreak in Germany--a 25-year multicenter study. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):590-8
231. Kupfer B, Ruf T, Matz B, Nattermann J, Spengler U, Rockstroh JK, Brackmann HH, Blümel J, Tacke M, Kaiser R. Comparison of GB virus C, HIV, and HCV infection markers in hemophiliacs exposed to non-inactivated or inactivated factor concentrates. *J Clin Virol.* 2005;34:42-47.
232. Jarvis LM, Davidson F, Hanley JP, Yap PL, Ludlam CA, Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet.* 1996 Nov 16;348(9038):1352-5.
233. Orito E, Mizokami M, Yasuda K, Sugihara K, Nakamura M, Mukaide M, Ohba K, Nakano T, Kato T, Kondo Y, Kurnada T, Ueda R and Iino S. Interferon- α therapy in patients dually infected with hepatitis C virus and GB virus C/hepatitis G virus - virological response of HGV and pretreatment HGV viremia level. *J Hepatol.* 1997;27:603-612.
234. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Zheng H, Addo MM, Lin W, Robbins GK, Sherman KE, Zdunek D, Hess G, Chung RT; AIDS Clinical Trial Group A5071 Study Team. GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfecting patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype. *J Infect Dis.* 2006 Aug 15;194(4):410-9.
235. Hofer H, Aydin I, Neumueller-Guber S, Mueller C, Scherzer TM, Staufer K, Steindl-Munda P, Wrba F, Ferenci P. Prevalence and clinical significance of GB virus type C/hepatitis G virus coinfection in patients with chronic hepatitis C undergoing antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2011 Jul;18(7):513-7.
236. Prati D, Zanella A, Bosoni P, Rebulli P, Farma E, De Mattei C, Capelli C, Mozzi F, Gallisai D, Magnano C, Melevendi C, Sirchia G. The incidence and natural course of transfusion-associated GB virus C/hepatitis G virus infection in a cohort of thalassemic patients. The CooleyCare Cooperative Group. *Blood.* 1998 Feb 1;91(3):774-7.
237. Stark K, Doering CD, Bienzle U, Pauli G, Hamouda O, Engel AM, Schreier E. Risk and clearance of GB virus C/hepatitis G virus infection in homosexual men: A longitudinal study. *J Med Virol.* 1999 Nov;59(3):303-6.
238. Tenckhoff S, Wiegand J, Patel K, et al. Interaction between IL28B, CCR Δ 32, and HCV persistence with GBV-C viremia and symptoms during acute infection [abstract EASL2011_PO_1327]. In: Program and abstracts of the 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). Berlin: European association for the Study of the Liver, 2011.
239. Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, Ledergerber B, Knysz B, Chaplinskas S, Peters L, Karlsson A, Katlama C, Toro C, Kupfer B, Vogel M, Lundgren J; EuroSIDA Study Group. Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis.* 2008 Nov 1;198(9):1337-44.
240. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* 1999 Apr;10(4):439-49.
241. Thomson EC, Nastouli E, Main J, Karayiannis P, Eliahoo J, Muir D, McClure MO. Delayed anti-HCV antibody response in HIV-positive men acutely infected with HCV. *AIDS.* 2009 Jan 2;23(1):89-93.
242. Ruys TA, Nanlohy NM, van den Berg CH, Hassink E, Beld M, van de Laar T, Bruisten S, Wit F, Krol A, Prins M, Lange J, van Baarle D. HCV-specific T-cell responses in injecting drug users: evidence for previous

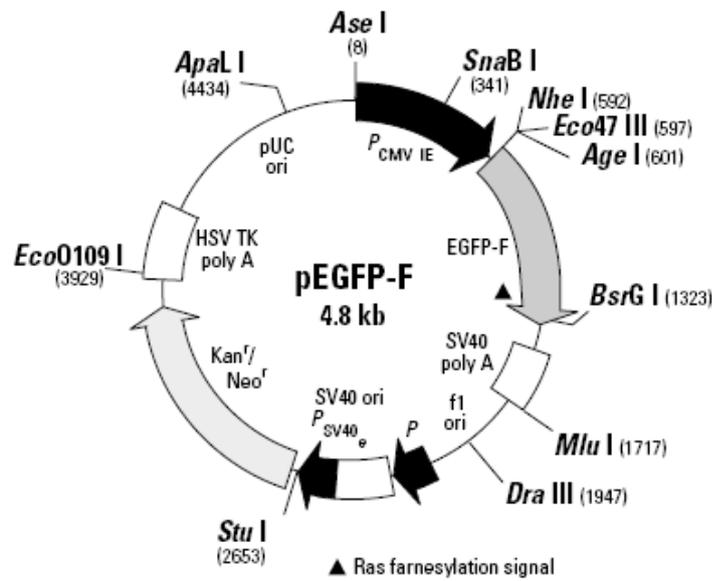
- exposure to HCV and a role for CD4+ T cells focussing on nonstructural proteins in viral clearance. *J Viral Hepat.* 2008 Jun;15(6):409-20.
243. Thimme R, Neumann-Haefelin C, Boettler T, Blum HE. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. *Biol Chem.* 2008 May;389(5):457-67.
244. Falconer K, Gonzalez VD, Reichard O, Sandberg JK, Alaeus A. Spontaneous HCV clearance in HCV/HIV-1 coinfection associated with normalized CD4 counts, low level of chronic immune activation and high level of T cell function. *J Clin Virol.* 2008 Feb;41(2):160-3.
245. Gerolami V, Halfon P, Chambost H, Sicardi F, Thuret I, Planells R, Halimi G, Fossat C, Michel G, Cartouzou G. Prevalence of hepatitis G virus RNA in a monocentric population of French haemophiliacs. *Br J Haematol.* 1997 Oct;99(1):209-14.
246. Fabrizi F, De Vecchi AF, Lunghi G, Finazzi S, Bisegna S, Ponticelli C. Epidemiology of GB virus c/hepatitis g virus infection in patients on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2002 May-Jun;22(3):405-10.
247. Jarvis LM, Bell H, Simmonds P, Hawkins A, Hellum K, Harthug S, Maeland A, Ritland S, Myrvang B, von der Lippe B, Raknerud N, Skaug K. The effect of treatment with alpha-interferon on hepatitis G/GBV-C viraemia. The CONSTRUCT Group. *Scand J Gastroenterol.* 1998 Feb;33(2):195-200.
248. Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science.* 2003 May 16;300(5622):1145-8.
249. Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2689-99.
250. Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* 2005 Aug 18;436(7053):939-45.
251. Aurisicchio L, De Tomassi A, La Monica N, Ciliberto G, Traboni C, Palombo F. Regulated and liver-specific tamarin alpha interferon gene delivery by a helper-dependent adenoviral vector. *J Virol.* 2005 Jun;79(11):6772-80.
252. Buckwold VE, Collins B, Hogan P, Rippeon S, Wei J. Investigation into the ability of GB virus B to replicate in various immortalized cell lines. *Antiviral Res.* 2005 Jun;66(2-3):165-8.
253. Nakajima N, Hijikata M, Yoshikura H, Shimizu Y. Characterization of Long-Term Cultures of Hepatitis C Virus. *J Virol.* May 1996;70(5):3325-3329.
254. Lerat H, Shimizu YK, Lemon SM. Cell Type-Specific Enhancement of Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation due to Nontranslated Region Substitutions Selected during Passage of Virus in Lymphoblastoid Cells. *J Virol.* Aug 2000;74(15):7024-7031.
255. Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology.* 2009;6:211.
256. Jung S. GB Virus C Proteins interfere with the Replication of HIV-1. Dissertation 2010. Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universitätsklinikum Erlangen.
257. Grivel JC, Ito Y, Fagà G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, Fitzgerald W, Lusso P, Margolis L. Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1232-5.
258. Xiang J, McLinden JH, Chang Q, Kaufman TM, Stapleton JT. An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15570-5.
259. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, Chang Q, Kaufman TM, Klinzman D, Stapleton JT. Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):7860-9.
260. Jung S, Eichenmüller M, Donhauser N, Neipel F, Engel AM, Hess G, Fleckenstein B, Reil H. HIV entry inhibition by the envelope 2 glycoprotein of GB virus C. *AIDS.* 2007;21:643-647
261. Ido H, Ito S, Taniguchi Y, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Sanzen N, Hayashi Y, Futaki S, Sekiguchi K. Laminin isoforms containing the gamma3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma1 and gamma2 chains. *J Biol Chem.* 2008 Oct 17;283(42):28149-57.
262. Frey G, Rits-Volloch S, Zhang XQ, Schooley RT, Chen B, Harrison SC. Small molecules that bind the inner core of gp41 and inhibit HIV envelope-mediated fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* September 19, 2006;103(38):13938-13943.
263. Münch J, Ständker L, Adermann K, Schulz A, Schindler M, Chinnadurai R, Pöhlmann S, Chaipan C, Biet T, Peters T, Meyer B, Wilhelm D, Lu H, Jing W, Jiang S, Forssmann WG, Kirchhoff F. Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell.* 2007 Apr 20;129(2):263-75.

264. Berkhout B, van Wamel JL, Beljaars L, Meijer DK, Visser S, Floris R. Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res.* 2002 Aug;55(2):341-55.
265. Ni L, Gao GF, Tien P. Rational design of highly potent HIV-1 fusion inhibitory proteins: implication for developing antiviral therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 8;332(3):831-6.
266. Swanson MD, Winter HC, Goldstein IJ, Markovitz DM. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *J Biol Chem.* 2010 Mar 19;285(12):8646-55.
267. Ködel Y, Eissmann K, Wend H, Fleckenstein B, Reil H. Peptides derived from a distinct region of GB Virus C glycoprotein E2 mediate strain specific HIV-1 entry inhibition. *J Virol.* Jul;85(14):7037-47.
268. Honda M, Brown EA, Lemon SM. Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA.* 1996 Oct;2(10):955-68.
269. Robertson ME, Seamons RA, Belsham GJ. A selection system for functional internal ribosome entry site (IRES) elements: analysis of the requirement for a conserved GNRA tetraloop in the encephalomyocarditis virus IRES. *RNA.* 1999 Sep;5(9):1167-79.
270. Jubin R, Vantuno NE, Kieft JS, Murray MG, Doudna JA, Lau JY, Baroudy BM. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10430-7.
271. Borman A, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucl Acid Res.* 1997;25(5):925-932.
272. Durand T, Di Liberto G, Colman H, Cammas A, Boni S, Marcellin P, Cahour A, Vagner S, Féray C. Occult infection of peripheral B cells by hepatitis C variants which have low translational efficiency in cultured hepatocytes. *Gut.* 2010;59:934-942.
273. Meerovitch K, Svitkin YV, Lee HS, Lejbkovicz F, Kenan DJ, Chan EKL, Agol VI, Keene JD, Sonenberg N.. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* 1993;67:3798-3807.
274. Scheller N, Mina LB, Galao RP, Chari A, Giménez-Barcons M, Noueiry A, Fischer U, Meyerhans A, Díez J. Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *PNAS.* Aug 2009;106(32):13517-13522.
275. Jones DM, Domingues P, Targett-Adams P, McLauchlan J. Comparison of U2OS and Huh-7 cells for identifying host factors that affect hepatitis C virus RNA replication. *J Gen Virol.* 2010 Sep;91(Pt 9):2238-48.
276. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R. Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations *J Virol.* May 2001;4614-4624.
277. Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reinmann J, Hauser H. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucl Acid Res.* 2001;26(16):3327-3334.
278. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther.* 2000 Apr;1(4):376-382.
279. Laporte J, Malet I, Andrieu T, Thibault V, Toulme JJ, Wychowski C, Pawlotsky JM, Huraux JM, Agut H, Cahour A. Comparative Analysis of Translation Efficiencies of Hepatitis C Virus 5' Untranslated Regions among Intra-individual Quasispecies Present in Chronic Infection: Opposite Behaviors Depending on Cell Type. *J Virol.* Nov 2000;74(22): 10827-10833.
280. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Bio Techn.* 2006;41(3):283-290.
281. Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH. IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'-UTR. *RNA.* 2009;15:1528-1542.
282. She Y, Liao Q, Chen X, Ye L, Wu Z. Hepatitis C virus (HCV) NS2 protein up-regulates HCV IRES-dependent translation and down-regulates NS5B RdRp activity. *Arch Virol.* 2008;153:1991-1997.
283. Romero-López C, Berzal-Herranz A. A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA.* 2009 Sep;15(9):1740-52.
284. Thurner C, Witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J Gen Virol.* 2004;85:1113-1124.

8. ANLAGEN

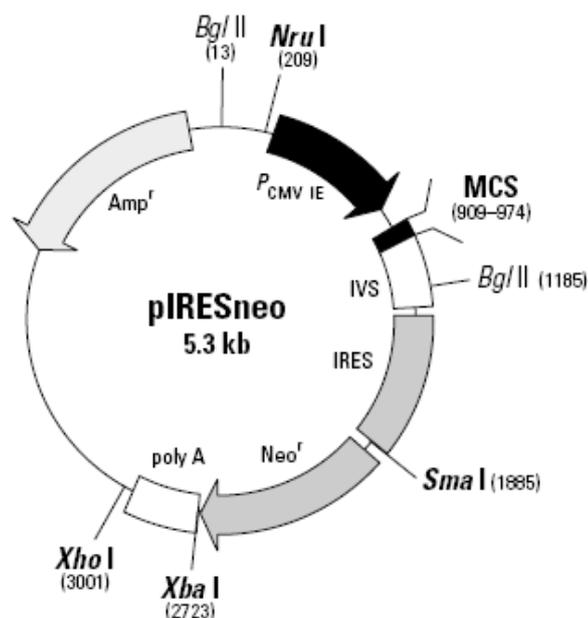
pEGFP-F (#6074-1, Clontech, Mountain View, CA/USA):

Das Plasmid pEGFP-F codiert für ein farnesyliertes grünes fluoreszierendes Protein (*farnesylated enhanced green fluorescent protein* – EGFP-F) mit einer verbesserten Expression in Säugerzellen (Exzitationsmaximum = 488 nm, Emissionsmaximum = 507 nm). Die MCS liegt zwischen der EGFP-F-codierenden Sequenz und dem SV40-Polyadenylierungssignal. Darüber hinaus enthält der Vektor eine Neomycin/Kanamycin-Resistenz.



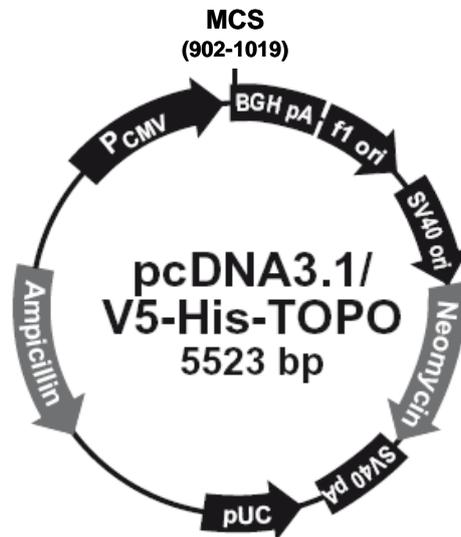
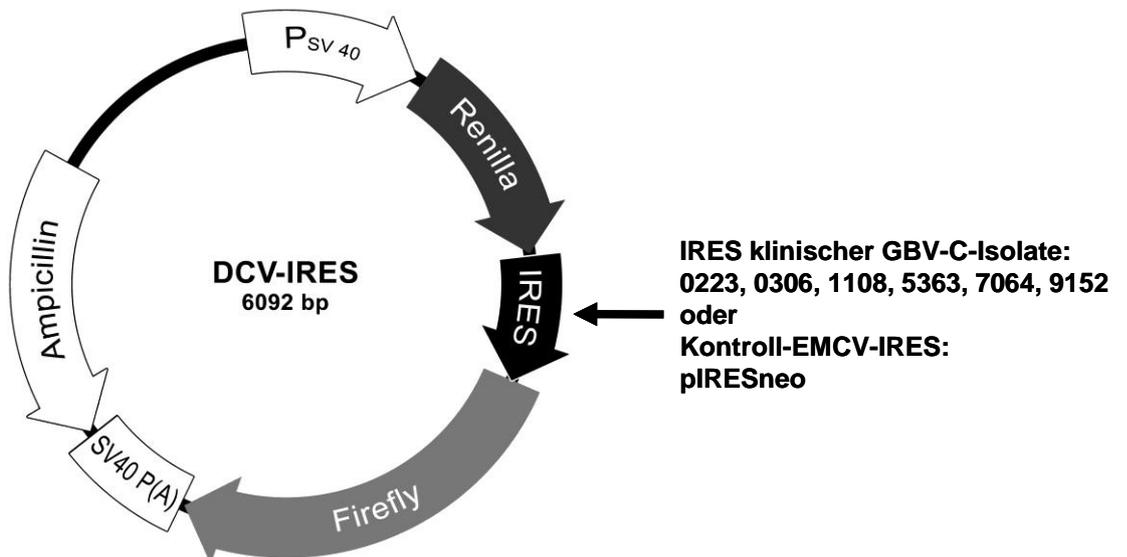
pIRESneo (Clontech, Mountain View, CA/USA):

Der pIRESneo-Vektor beinhaltet einen CMV-Promotor sowie ein Ampicillinresistenzgen. Des Weiteren trägt er eine EMCV-IRES.



pcDNA3.1/V5-HisTOPO TA (#K480001, Invitrogen, Groningen/D):

Der pcDNA3.1/V5-His TOPO-Vektor besitzt je einen CMV- und T7-Promotor sowie einen SV40-Promotor und das SV40-Polyadenylierungssignal. Als Selektionsmarker codiert der Vektor für eine Ampicillinresistenz. Die *Multiple Cloning Site* (MCS) befindet sich hinter dem CMV-Promotor und beinhaltet 5'-T-Überhänge für eine einfache TA-Klonierung.

**DCV-IRES:**

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 12.12.2011

Solveig Tenckhoff

LEBENS LAUF

Für Online-Veröffentlichung entfernt.

PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DIESER ARBEIT

Publikationen:

Herrera E, **Tenckhoff S**, Gómera MJ, Galatola R, Bleda MJ, Gil C, Ercilla G, Gatell JM, Tillmann HL, Haro I. Effect of Synthetic Peptides Belonging to E2 Envelope Protein of GB Virus C on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Med. Chem.* 2010;53:6054-6063.

Kongressbeiträge:

Solveig Tenckhoff, Johannes Wiegand, Keyur Patel, Manfred Wiese, Hannelore Tenckhoff, Hans D. Nischalke, Ulrike Kullig, Uwe Göbel, Emanuela Capka, Ingolf Schiefke, Wolfgang Güthoff, Kurt Grüngreiff, Ingrid König, Ulrich Spengler, Jeanette McCarthy, John G. McHutchison, Jörg Timm, Sergej Viazov, Jacob Nattermann, Hans L. Tillmann, for the German anti-D Study Group. Interaction between IL28B, CCR5 32, and HCV persistence with GBV-C viremia and symptoms during acute infection. Jahrestagung der EASL, Berlin, April 2011.

Solveig Tenckhoff, Fritz Bredeek, Sharyne Donfield, Erika Menius, Alice Lail, Joachim Mössner, Hans L. Tillmann, Eric S. Daar, the Hemophilia Growth and Development Study. Role of GBV-C in HCV/HIV coinfections in the Hemophilia Growth and Development Study. 8. Research Festival der Universität Leipzig, Leipzig, 2009 Dezember.

Solveig Tenckhoff, Susan Jung, Heide Reil, Hans Tillmann, Joachim Mössner. Insights in HIV-GBV-C interference. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Leipzig, 2009 März.

Susan Jung, **Solveig Tenckhoff**, Hans Tillmann, Heide Reil. Zelluläre Mechanismen der Interaktion von GBV-C und HIV - Mehrere Proteine des nicht-humanpathogenen GB Virus C inhibieren unabhängig von einander verschiedene Schritte der HIV-Replikation. Tagung des HEPNET, Hannover, 2008 Juni.

Susan Jung, **Solveig Tenckhoff**, Hans Tillmann, Ralf Müller, Georg Hess and Heide Reil. More than one interaction: GBV-C clinical isolates differ in the ability to interfere with entry and post entry replication steps of HIV. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Nürnberg, 2008 März.

Solveig Tenckhoff, Susan Jung, Hans Damerow, Thorsten Kaiser, Joachim Mössner, Hans Tillmann. Discrimination of clinical GB Virus C isolates in accordance with their HIV inhibitory phenotype. 6. Research Festival der Universität Leipzig, Leipzig, 2007 Dezember.

Jung S and **Tenckhoff S**, Helm M, Mueller R, Hess G, Fleckenstein B, Reil H. Discrimination of clinical GBV-C isolates in accordance with their HIV inhibitory phenotype - Impact of the GBV-C envelope glycoprotein 2 on HIV entry impairment. Jahrestagung der Internationalen AIDS Gesellschaft (International AIDS Society IAS) Sydney, 2007 Juli.

Susan Jung, **Solveig Tenckhoff**, Hans Tillmann, Heide Reil. Cellular mechanisms of GB Virus-C in ameliorating HIV disease progression. Tagung des HEPNET, Hannover, 2007 Juni.

Susan Jung, **Solveig Tenckhoff**, Hans Tillmann, Heide Reil. Zelluläre Mechanismen der Interaktion des GB Virus-C und HIV: Erklärung für die verlangsamte Progression der HIV-Erkrankung? Tagung des HEPNET, Hannover, 2006 Juni.

DANKSAGUNG

Prof. Tillmann möchte ich für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die fortwährende Unterstützung danken, die trotz der Unmengen an Wasser zwischen Durham und Leipzig nie abgerissen ist. Prof. Mössner danke ich für die Bereitschaft, den Posten des Doktorvaters zu übernehmen.

Dr. Breun und Dr. Baumann gilt mein Dank für die Zusammenarbeit am IRES-Projekt und der Bereitschaft, sich in das Thema einzuarbeiten sowie für die wertvollen Diskussionen in der Endphase der Arbeit.

Des Weiteren danke ich meinen Kooperationspartnern: Dr. Haro und Dr. Herrera (Universität Barcelona) für die Zusammenarbeit mit den E2-Peptiden, A. Lail, E. Menius und S. Donfield für die statistischen Analysen der HGDS-Studie, Dr. Viazov (Universität Essen) für die Zusammenarbeit in der Anti-D-Studie.

Dr. Susan Jung und Dr. Dr. Heide Reil möchte ich für die Starthilfe in das Projekt und die unermüdliche Unterstützung sowie den temporären Unterschlupf im Spatzennest und im Erlangener Labor danken.

Ebenso gilt mein besonderer Dank den „Kellermädels“ Claudia Ruffert und Susanne Kistner für jede Menge trimethylxanthanhaltige Festflüssigphasenheißextrakte und moralische Motivationsspritzen.

Dr. Thorsten Kaiser danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit besonders zu Beginn der Arbeit und die Diskussionen in der Endphase. Dr. Johannes Wiegand gilt mein Dank für die unkomplizierte Zusammenarbeit, obwohl sein Herz für andere Viren schlägt.

Ohne Freunde wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Daher danke ich all denen, die mich immer wieder motiviert haben. Insbesondere Nadja Hilger für gemeinsame nächtliche Schreibmarathons, Sandra Pinkert für das eine oder andere Brainstorming, Kathleen Weise für die verdienten Feierabendbiere und Claudia Drewniok für Freundschaftsdienste.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Oliver Graute bedanken, die mich stets unterstützt haben.