

**Die Bedeutung des NS5A-Proteins des Hepatitis C Virus
für die Resistenz gegen Interferon- α und Ribavirin**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität-Duisburg-Essen

vorgelegt von
Marc aus dem Siepen

aus Mülheim an der Ruhr

Juni 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität-Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Roggendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: Prof. Dr. R. Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Heil

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2006

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Das Hepatitis C Virus	1
1.2 Therapie der chronischen Hepatitis C	1
1.3 Die Genomorganisation des HCV	1
1.4 Die HCV-kodierten Proteine	2
1.5 Die Rolle des NS5A-Proteins in der Replikation des HCV	3
1.6 Die Phosphorylierung des NS5A-Proteins	4
1.7 Der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Apoptose	5
1.8 Der Einfluss des NS5A-Proteins auf das Zellwachstum	5
1.9 Der virale Replikationszyklus	5
1.10 Das angeborene Immunsystem	6
1.11 Interferon- α und die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade	7
1.12 IFN-induzierte Gene und ihre Wirkungsweisen	8
1.13 HCV-Proteine und ihr Einfluss auf die IFN-Antwort	8
1.14 Der Einfluss des nichtstrukturellen HCV-Proteins NS5A auf die IFN-Antwort	9
1.15 Ribavirin und seine antiviralen Wirkungsweisen	10
1.17 Replikonsysteme zur Untersuchung des HCV	11
1.18 Die Zielsetzungen dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Lösungen und Puffer	17
2.1.3 Acrylamid/Bisacrylamid-Gele	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Längen- und Größenstandards für Nukleinsäuren und Proteine	19
2.1.6 Kits	20
2.1.7 Geräte	20
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.9 Computerprogramme und Internetseiten	21
2.1.10 Oligonukleotide	21
2.1.11 Bakterienstämme	22

2.1.12	Medium und Agarplatten zur Kultivierung von <i>E.coli</i> -Bakterien	23
2.1.13	Virusisolate	23
2.1.14	Plasmide und Vektoren.....	23
2.1.14.1	pFK-I ₃₈₉ neo/NS3-3'/ET	23
2.1.14.2	pFK-I ₃₄₁ PI-luc/NS3-3'/ET	23
2.1.14.3	pFK-I ₃₄₁ PI-luc/NS3-3'/ET/GND	24
2.1.14.4	pFK-I ₃₈₉ neo und pFK-β-Actin.....	24
2.1.14.5	pCR 2.1-TOPO.....	24
2.1.15	Humane Zelllinien	25
2.1.15.1	Humane Hepatomzelllinie HuH7	25
2.1.15.2	Humane Hepatomzelllinie 9-13	25
2.1.16	Medien und Reagentien für die Kultivierung humaner Zellen	25
2.1.16.1	Komplettes DMEM-Medium	25
2.1.16.2	Selektionsmedium	25
2.1.16.4	Weitere Reagentien für die Kultivierung humaner Zellen	26
2.1.17	Antiserum.....	26
2.2	Methoden	26
2.2.1	RNA-Extraktion aus Serumproben	26
2.2.2	Reverse Transkription.....	26
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.4	<i>Touchdown</i> -PCR	27
2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	28
2.2.6	Agarosegelextraktion von DNA-Fragmenten.....	28
2.2.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.8	Adenylierung der 3'-Enden von PCR-Produkten.....	28
2.2.9	Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR 2.1 TOPO.....	28
2.2.10	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i>	28
2.2.10.1	Transformation von TOP10-Zellen.....	28
2.2.10.2	Transformation von SCS110-Zellen.....	29
2.2.10.3	Transformation von Max Efficiency DH5α-Zellen.....	29
2.2.11	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	29
2.2.12	Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA.....	29
2.2.12.1	Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA vor der Ligation.....	29
2.2.12.2	Linearisierung von Plasmid-DNA vor der <i>in vitro</i> -Transkription von HCV-Replikon-RNA	29
2.2.12.2	Linearisierung von Plasmid-DNA vor der <i>in vitro</i> -Transkription radioaktiver Sonden	30
2.2.13	Ligation	30
2.2.14	Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA	30
2.2.15	<i>In vitro</i> -Transkription	30
2.2.15.1	<i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung von HCV-Replikon-RNA.....	30

2.2.15.2	<i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung von radioaktiven RNA-Sonden.....	31
2.2.16	Trizol-Extraktion von RNA-Transkripten	31
2.2.17	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben	31
2.2.18	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	31
2.2.19	Kultivierung von HuH7-Zellen	32
2.2.20	Interferon- α - und Ribavirin-Behandlung von HuH7-Zellen, die subgenomische HCV- RNA-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten.....	32
2.2.21	TNF- α -Behandlung von naiven HuH7-Zellen und HuH7-Zellen, die subgenomische HCV- RNA-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten.....	32
2.2.22	WST-1-Assay zur Bestimmung der Lebendzellrate	32
2.2.23	Lyse von HCV-Replikon-RNA enthaltenden HuH7-Zellen	33
2.2.24	Transfektion von HuH7-Zellen mit transkribierter Replikon-RNA mittels Elektroporation	33
2.2.25	Luciferase-Assay	33
2.2.26	<i>Northern Blot</i> -Verfahren.....	34
2.2.27	Hybridisierung und Waschen der Membranen	34
2.2.28	Herstellung von Proteinextrakten	34
2.2.29	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.30	Coomassie Blau-Färbung.....	35
2.2.31	Das <i>Western Blot</i> -Verfahren.....	35
2.2.32	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR.....	35
2.2.32.1	Quantitative RT-PCR zum Nachweis von HCV-RNA.....	35
2.2.32.2	Quantitative RT-PCR zum Nachweis von h-G6PDH-mRNA.....	36
2.2.32.3	Quantitative RT-PCR zum Nachweis von IFNAR 1- und IFNAR 2-mRNA.....	37
2.2.33	Sequenzspezifische Mutagenese	37
2.2.34	Sequenzierungen.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Klonierung von NS5A-Fragmenten des HCV-Stammes AD78 in die Plasmide pFKI ₃₈₉ /NS3- 3'/ET und pFK-I ₃₄₁ PI-luc/NS3-3'/ET	39
3.2	Linearisierung und <i>in vitro</i> -Transkription von HCV-Replikon-RNA.....	43
3.3	Transfektion von HuH7-Zellen mit HCV-Replikon-RNAs, die das Neomycinphospho- transferasegen enthielten.....	44
3.4	Nachweis von HCV-Replikon-RNA in transfizierten HuH7-Zellen	45
3.5	Nachweis von viralem NS5A-Protein in transfizierten HuH7-Zellen	45
3.6	Sequenzbestimmung der NS5A-Region in Replikon-transfizierten HuH7-Zellen nach fünfmonatiger Kultivierung	47
3.7	Untersuchung der Interferon- α -Resistenz der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons.....	47
3.8	Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit niedrigen Interferon- α -Konzentrationen zur Generierung resistenter Varianten der Con1/AD78-HCV-Replikons.....	48
3.9	Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit steigenden Interferon- α - Konzentrationen	49

3.10	Untersuchungen zur Expression der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors, IFNAR 1 und IFNAR 2, in IFN-resistenten Zelllinien.....	51
3.10.1	Bestimmung der mRNA-Mengen der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors	51
3.10.2	Amplifikation und Sequenzierung der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors.....	52
3.10.2.1	Amplifikation und Sequenzierung von IFNAR 1	52
3.10.2.2	Amplifikation und Sequenzierung von IFNAR 2	52
3.11	Untersuchung der Ribavirin-Resistenz der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons.....	53
3.12	Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit niedrigen Ribavirin-Konzentrationen zur Generierung resistenter Varianten der Con1/AD78-HCV-Replikons	54
3.13	Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit einer hohen Ribavirin-Konzentration	55
3.14	Bestimmung der apoptoseinduzierenden Wirkung von TNF- α auf HuH7-Zellen, die chimäre Con1/AD78-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten	56
3.15	Bestimmung der Replikationspotentiale der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons.....	57
3.16	Identifizierung und Untersuchung von Aminosäuremutationen in der NS5A-Region der Con1/AD78-HCV-Replikons mit möglichem Einfluss auf die Replikationsfähigkeit.....	58
3.16.1	Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutation an Postition 2382 auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons	59
3.16.2	Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutationen an den Postitionen 2191 und 2370 auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons	61
3.16.3	Kombinationen der Aminosäuremutationen an den Postitionen 2191, 2370 und 2382 und ihr Einfluss auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons.....	61
3.16.4	Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutation an der Position 2082 in der NS5A-Region auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons	62
3.17	Untersuchung von Aminosäuremutationen in der NS5A-Region der Con1/AD78-HCV-Replikons mit potentiellm Einfluss auf die Hyperphosphorylierung	63
4	Diskussion	65
4.1	Virusisolate des HCV-Stammes AD78 und das subgenomische HCV-Replikon zur Analyse verschiedener Eigenschaften des nichtstrukturellen HCV-Proteins NS5A.....	65
4.2	Die Bedeutung des NS5A-Proteins für die Resistenz des HCV gegen IFN- α	66
4.3	Generierung IFN- α -resistenter Con1/AD78-HCV-Replikons	67
4.4	Der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Ribavirin-Resistenz des HCV	69
4.5	RBV-Langzeitbehandlung von HuH7-Zellen zur Generierung resistenter Replikonvarianten ..	69
4.6	Der Einfluss von HCV-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten in HuH7-Zellen auf die TNF- α -induzierte Apoptose.....	70
4.7	Identifizierung von Aminosäuren des NS5A-Proteins mit Bedeutung für die Replikation des HCV	71
4.8	Identifizierung neuer potentieller Hyperphosphorylierungsstellen des NS5A-Proteins	74

5 Zusammenfassung	75
6 Literatur	77
7 Abkürzungen	86
8 Anhang	89
8.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten NS5A-Regionen	89
Publikation	91
Dank	92
Lebenslauf	93
Erklärungen	94

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus (HCV) wurde erstmals 1989 als Erreger der Non-A-Non-B-Hepatitis identifiziert (Choo et al., 1989). Es wird als eigenständiges Genus der Hepaciviren in der Familie der *Flaviviridae* geführt. Derzeit werden sechs Genotypen des HCV unterschieden, die in 76 bestätigte oder vorgeschlagene Subtypen aufgeteilt werden (Simmonds et al., 2005). Schätzungsweise sind weltweit 123 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert (Shepard et al., 2005). Bis zur Einführung der Untersuchung von Blutkonserven auf HCV-Kontaminationen waren Bluttransfusionen die Hauptursache für HCV-Übertragungen. Heute gilt die Mehrfachbenutzung von Spritzbesteck von Drogenabhängigen als Hauptübertragungsweg des HCV. Bei 60-80% der Infizierten bildet sich eine chronische Infektion aus, die über einen Zeitraum von 20-30 Jahren in 10-20% der Fälle zu einer Leberzirrhose und in 1-5% zu Leberzellkarzinomen führt. Eine HCV-Infektion ist in den westlichen Industrienationen die Hauptursache für Lebertransplantationen (Brown, 2005). Eine protektive Immunität gegen das Virus wurde bisher nicht beobachtet und es steht derzeit kein Impfstoff gegen HCV zur Verfügung (Houghton und Abrignani, 2005).

1.2 Therapie der chronischen Hepatitis C

Schon vor Identifizierung des HCV Ende der achtziger Jahre wurde Interferon- α (IFN- α) zur Therapie einer chronischen Non-A-Non-B-Hepatitis eingesetzt (Hoofnagle et al., 1986). Eine deutliche Verbesserung dieser ersten Therapieversuche gelang durch die kombinierte Verabreichung von IFN- α mit Ribavirin (RBV), einem Nukleosidanalogen mit antiviraler Wirkung (Banner et al., 1997). Eine weitere Steigerung der Ansprechrate auf die Therapie wurde durch die Kopplung von Polyethylenglykol (PEG) an das Interferon erreicht, da pegyliertes Interferon eine längere Halbwertszeit im Serum hat. So ist zurzeit die Verabreichung von pegyliertem Interferon- α in Kombination mit Ribavirin die anerkannte Therapieform (Zeuzem, 2004). Die Ansprechraten auf diese Standardtherapie variieren allerdings zwischen den verschiedenen Genotypen, so dass es bei den Genotypen 2 und 3 in 88 % der Fälle, bei den Genotypen 1, 4, 5 und 6 jedoch nur in 48 % zu einem dauerhaften virologischen und biochemischen Ansprechen kommt (Poynard et al., 2003).

1.3 Die Genomorganisation des HCV

Das HCV ist ein umhülltes Virus, dessen Genom aus einzelsträngiger RNA positiver Polarität besteht. Dieses 9,6 kb lange Genom kodiert für einen offenen Leserahmen (ORF), der von zwei nicht-translatierten Regionen (NTR) flankiert wird (Abb. 1.1; Choo et al., 1989). Die ca. 340 Nukleotide

lange NTR am 5'-Ende des Genoms ist hochkonserviert und bildet durch komplementäre Basenpaarung mehrere stabile Sekundärstrukturen. Sie fungiert als interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), an der die Ribosomen binden und die Translation startet (Brown et al., 1992; Tsukiyama-Kohara et al., 1992; Wang et al., 1993). Die 3'-NTR besteht aus drei Abschnitten (Tanaka et al., 1995, 1996; Kolykhalov et al., 1996; Yamada et al., 1996). Auf das Stopcodon des ORF folgt eine variable Sequenz. Daran schließen sich ein Poly-Uracil-Trakt von variabler Länge zwischen 20 und 90 Nukleotiden sowie eine hochkonservierte Sequenz von 98 Nukleotiden an. Letztere ist essentiell für die Replikation (Kolykhalov et al., 1996; Yanagi et al., 1999).

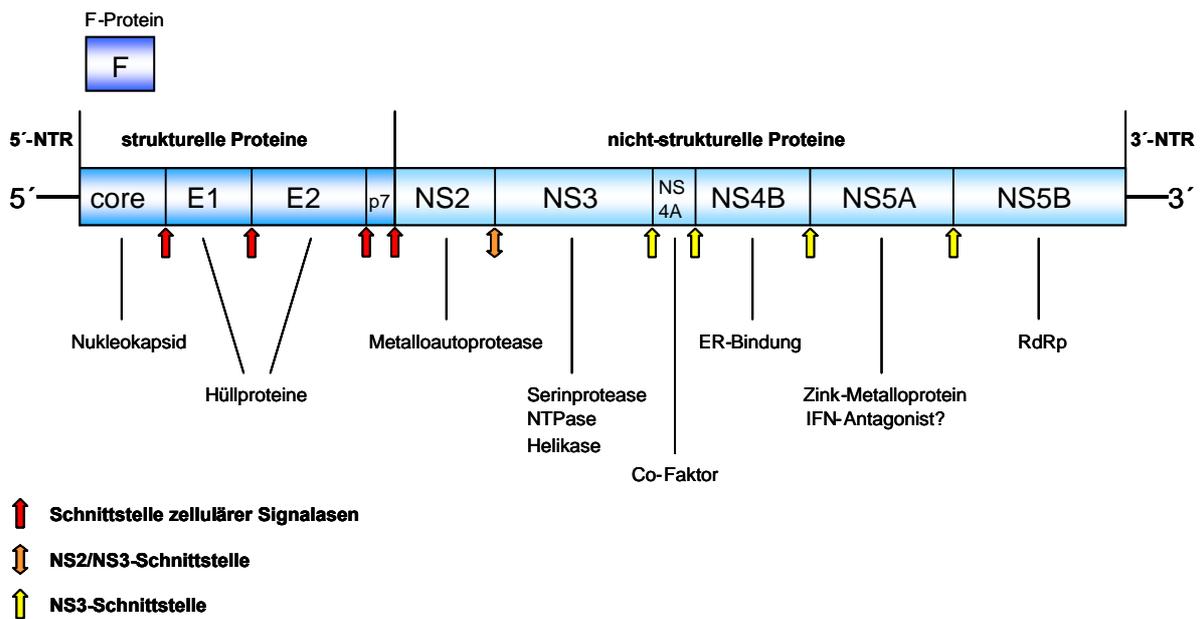


Abb. 1.1 Die Genomorganisation des HCV. Auf die 5'-NTR mit der IRES folgen die Strukturproteine. Daran schließen sich die nichtstrukturellen Proteine und die 3'-NTR an. Die Schnittstellen der verschiedenen zellulären und viralen Proteasen sind mit Pfeilen dargestellt und die Hauptfunktionen der einzelnen Proteine sind angegeben. Ein alternativer ORF kodiert für das F-Protein (nach Pavio und Lai, 2003).

1.4 Die HCV-kodierten Proteine

Der ORF des HCV kodiert für ein Polyprotein von 3022 Aminosäuren. Außerdem kann durch ribosomale Leserahmenverschiebung ein alternativer ORF entstehen, was zur Produktion des F-Proteins mit unbekannter Funktion führt (Xu et al., 2001). Das Polyprotein wird co- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in zehn verschiedene Produkte gespalten. Die Strukturproteine befinden sich im N-terminalen Drittel während C-terminal die nicht-strukturellen Proteine liegen (Abb. 1.1).

Das erste N-terminal kodierte Protein ist das *core*-Protein. Es bildet das Nukleokapsid, das die genomische HCV-RNA einschließt, und interagiert wahrscheinlich mit der viralen RNA (Baumert et al., 1998). Das *core*-Protein scheint außerdem in verschiedenen zellulären Signaltransduktionswegen und in der Onkogenese eine Rolle zu spielen (Matsumoto et al., 1997; Chang et al., 1998). Auf das *core*-Protein folgen die glycosylierten Hüllproteine E1 und E2. Diese beiden assoziieren als Heterodimere (Deleersnyder et al., 1997) und werden als Transmembrankomplex in die Doppellipidschicht integriert,

die das Kapsid umhüllt. Im Anschluss an die Hüllproteine befindet sich das Protein p7, das möglicherweise als Ionenkanal fungiert (Carrere-Kremer et al., 2002; Griffin et al., 2003).

Die nicht-strukturellen Proteine NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B, die in den carboxyterminalen zwei Dritteln des Genoms kodiert sind, haben unterschiedliche Funktionen in der viralen RNA-Replikation und der proteolytischen Prozessierung des Polyproteins (Lohmann et al., 1999; De Francesco et al., 2000). NS2 und NS3 sind als virale Proteasen für die Spaltung der nicht-strukturellen Proteine verantwortlich. Das NS2-Protein spaltet im Verbund mit NS3 autoproteolytisch an der Schnittstelle zwischen NS2 und NS3. (Grakoui et al., 1993; Hijikata et al., 1993). Die NS3-Protease spaltet zwischen NS3 und NS4A, NS4A und NS4B, NS4B und NS5A sowie zwischen NS5A und NS5B. Zusätzlich weist NS3 Helikase- und NTPase-Aktivitäten auf, die für die Translation und die RNA-Replikation essentiell sind (Bartenschlager et al., 1993; Eckart et al., 1993). Das NS4A-Protein bildet einen wichtigen Co-Faktor der NS3-Protease, mit der es einen Heterodimer bildet (Bartenschlager et al., 1994; Failla et al., 1994). Das NS4B-Protein ist ein integrales Membranprotein, das für die Verankerung des Replikationskomplexes an Membranen von Bedeutung ist (Hugle et al., 2001; Moradpour et al., 2003). Das Protein NS5A, auf das sich die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrieren, hat seine Hauptaufgaben in der Replikation des HCV und in der Beeinflussung von zellulären Signaltransduktionswegen, die in der angeborenen Immunität von Bedeutung sind. Es liegt in der Zelle cytoplasmatisch am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert vor (Ide et al., 1996), obwohl es eine mögliche Signalsequenz zum Kernimport enthält. Als letztes Protein des Polyproteins hat das NS5B die Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) (Behrens et al., 1996; Lohmann et al., 1997). Aufgrund ihrer Enzymaktivität sind die NS5B-Polymerase und die NS3/4A-Protease potentielle Ziele für eine spezifische Inhibition mit Substanzen, die dann in einer Therapie eingesetzt werden könnten (De Francesco und Migliaccio, 2005)

1.5 Die Rolle des NS5A-Proteins in der Replikation des HCV

Mehrere Studien deuten auf eine wichtige Rolle des NS5A-Proteins in der Replikation des HCV hin. Das Protein interagiert mit allen nichtstrukturellen Proteinen des HCV (Dimitrova et al., 2003) und ist Teil des Membran-assoziierten Replikationskomplexes des HCV (Gosert et al., 2003). Der Aminoterminus des Proteins bildet eine α -Helix, über die es in Membranen verankert wird (Abb. 1.3; Brass et al., 2002). Darüber hinaus interagiert NS5A mit dem humanen Vesikel-assoziierten Membranprotein-assoziierten Protein A (h-VAP-A). Diese Bindung ist wichtig für die Bildung des Replikationskomplexes des HCV. Die Hyperphosphorylierung des NS5A verhindert diese Interaktion und die Bildung des Replikationskomplexes, was sich negativ auf die Replikation auswirkt (Evans et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass Mutationen des NS5A-Proteins die HCV-Replikation verstärken (Blight et al., 2000; Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001) oder abschwächen können (Penin et al., 2004; Shimakami et al., 2004). Außerdem ist NS5A ein Zink-Metalloprotein und Veränderungen der Zink-Bindungsstellen können zur Inhibition der RNA-Replikation führen (Tellinghuisen et al., 2004).

1.6 Die Phosphorylierung des NS5A-Proteins

Das NS5A-Protein liegt in zwei phosphorylierten Formen vor, die entsprechend ihres Molekulargewichts p56 und p58 genannt werden. Dabei ist p56 die basal phosphorylierte Variante des NS5A, die durch Hyperphosphorylierung zur p58-Form wird. Die basale Phosphorylierung erfolgt in einer Region zwischen den Aminosäuren an Position 2200 und 2250 sowie zwischen Position 2350 und dem Carboxyterminus des NS5A-Proteins (Abb. 1.2; Tanji et al., 1995). Bisher bekannte Aminosäurereste, an denen die Hyperphosphorylierung stattfindet, sind die Serinreste an den Positionen 2197, 2201 und 2204 in einem zentralen Bereich des Proteins (Tanji et al., 1995). Die Hyperphosphorylierung ist ein genau regulierter Vorgang, für den die Expression eines intakten NS3-5A-Polyproteins und eine korrekte Prozessierung des Polyproteins benötigt werden (Koch und Bartenschlager, 1999; Neddermann et al., 1999). Weiterhin wird die Bildung der p58-Form des NS5A-Proteins durch NS4A verstärkt (Kaneko et al., 1994). Vermutlich werden über eine Interaktion von NS5A mit NS4A die Phosphorylierungsstellen für Kinasen zugänglicher gemacht (Asabe, 1997).

Es wurde beobachtet, dass adaptive Mutationen, die die Replikation des HCV verstärken, unter anderem die Hyperphosphorylierungsstellen des NS5A betreffen. Dabei werden Serinreste gegen andere Aminosäuren ausgetauscht, so dass keine Phosphorylierung mehr möglich ist. Gleichzeitig verringern diese Veränderungen aber die Bildung intakter Viruspartikel. Daher wird möglicherweise über die Hyperphosphorylierung der Replikationszyklus des HCV so reguliert, dass durch eine verstärkte Bildung der hyperphosphorylierten Form des NS5A-Proteins von Replikation auf Partikelbildung umgeschaltet wird (Appel et al., 2005).

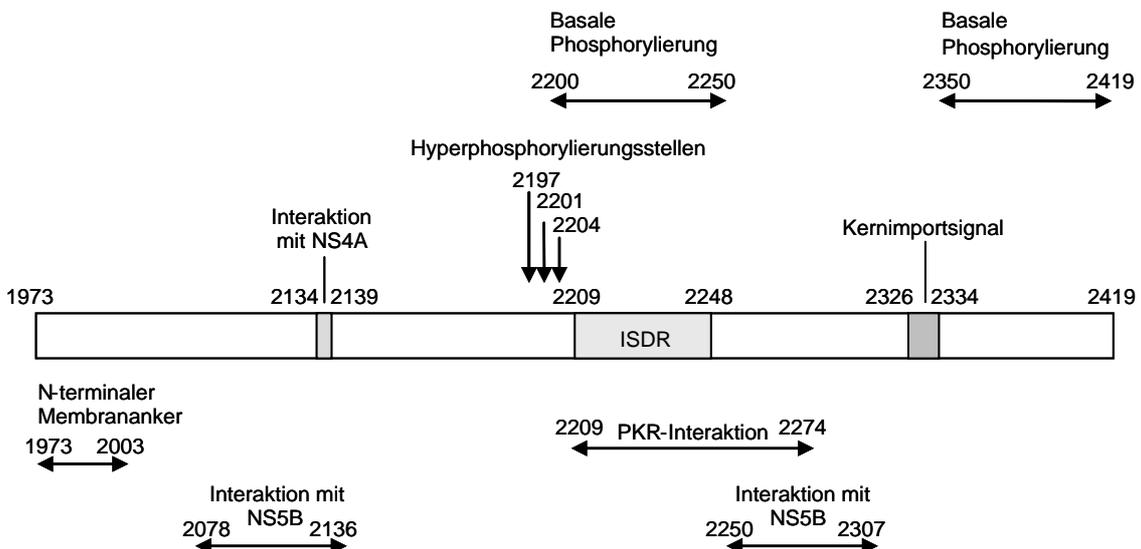


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des NS5A-Proteins des HCV mit funktionell wichtigen Strukturen wie Phosphorylierungs- und Hyperphosphorylierungsstellen sowie Abschnitten, die für die Interaktion mit anderen Proteinen wichtig sind. Die angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf das Polyprotein des Con1-Isolats mit der HCV Sequence Database Zugriffsnummer AJ238799.

1.7 Der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Apoptose

Die Apoptose ist unter anderem ein wichtiger Prozess in der Bekämpfung einer viralen Infektion, bei dem durch einen programmierten Zelltod virusinfizierte Zellen eliminiert werden (Macdonald und Harris, 2004). Viele Viren, die chronische Infektionen ausbilden, haben Mechanismen entwickelt, um dieser Abwehr zu entgehen und im Wirt zu überdauern. So wird der apoptotische Prozess in Zellen, die HCV-Proteine wie z. B. das NS5A-Protein exprimieren, nur vermindert ausgelöst (Ghosh et al., 2003; Miyasaka et al., 2003). Der Tumornekrosefaktor TNF- α ist ein starkes proinflammatorisches Cytokin mit apoptoseinduzierender Funktion. Nach Bindung von TNF- α an den Rezeptor TNFR1 assoziiert dieser mit dem Adaptorprotein TRADD. Daraufhin bildet TRADD einen Komplex mit dem Adaptorprotein FADD, der die Kaspase 8 aktiviert und so die Apoptose auslöst. Durch Bindung an TRADD kann das HCV-Protein NS5A diese Bildung des TRADD/FADD-Komplexes und das Einleiten des apoptotischen Prozesses inhibieren (Majumder et al., 2002). Hingegen kann NS5A eine Apoptose, die über den Fas-Liganden eingeleitet wird, nicht verhindern. Außerdem hemmt das NS5A-Protein die Bindung von TRADD an den Komplex TRAF2/RIP und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Majumder et al., 2002). So scheint das HCV Mechanismen entwickelt zu haben, um den antiviralen Effekten des TNF- α entgegenzuwirken. Interessanterweise hat TNF- α im Gegensatz zu IFN- γ auch keine inhibierende Wirkung auf die Replikation von subgenomischen HCV-Replikons in HuH7-Zellen, obwohl beide Cytokine teilweise die gleichen antiviralen Verteidigungsmechanismen auslösen (Frese et al., 2003).

1.8 Der Einfluss des NS5A-Proteins auf das Zellwachstum

Um persistierende Infektionen zu etablieren haben Viren Mechanismen entwickelt, die das Zellwachstum und die Zellaktivierung verändern. Zur Übertragung von für diese Prozesse wichtigen Signalen dienen mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK), eine Familie von Serin/Threoninkinasen. In einem wichtigen Weg der MAPK-Signalübertragung stellt die Proteinkinase ERK ein Schlüsselement dar. Durch Bindung an den Wachstumsfaktor Grb2 über eine prolinreiche Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne inhibiert NS5A die Interaktion von Grb2 und dem Nukleotid austauschfaktor SOS. So wird im weiteren Verlauf der Signalkaskade die Aktivierung der ERK verhindert und normale Wachstumssignale der Zellen werden durch das NS5A-Protein gestört (Reyes, 2002).

1.9 Der virale Replikationszyklus

Der virale Lebenszyklus des HCV beginnt mit der Bindung des Viruspartikels über das virale Hüllprotein E2 an das zelluläre Oberflächenprotein CD81 (Abb. 1.3). Alternativ kann das HCV auch an den LDL-Rezeptor binden. Nach der Infektion der Wirtszelle wird die genomische Virus-RNA in das Cytoplasma der Wirtszelle entlassen. Die RNA wird translatiert, das Polyprotein wird prozessiert und ein Replikationskomplex, der mit intrazellulären Membranen assoziiert, wird gebildet. Die genomische Plusstrang-RNA dient dann als Matrize zur Amplifikation negativsträngiger RNA. Diese wiederum wird als Matrize zur Amplifikation von Plusstrang-RNA genutzt.

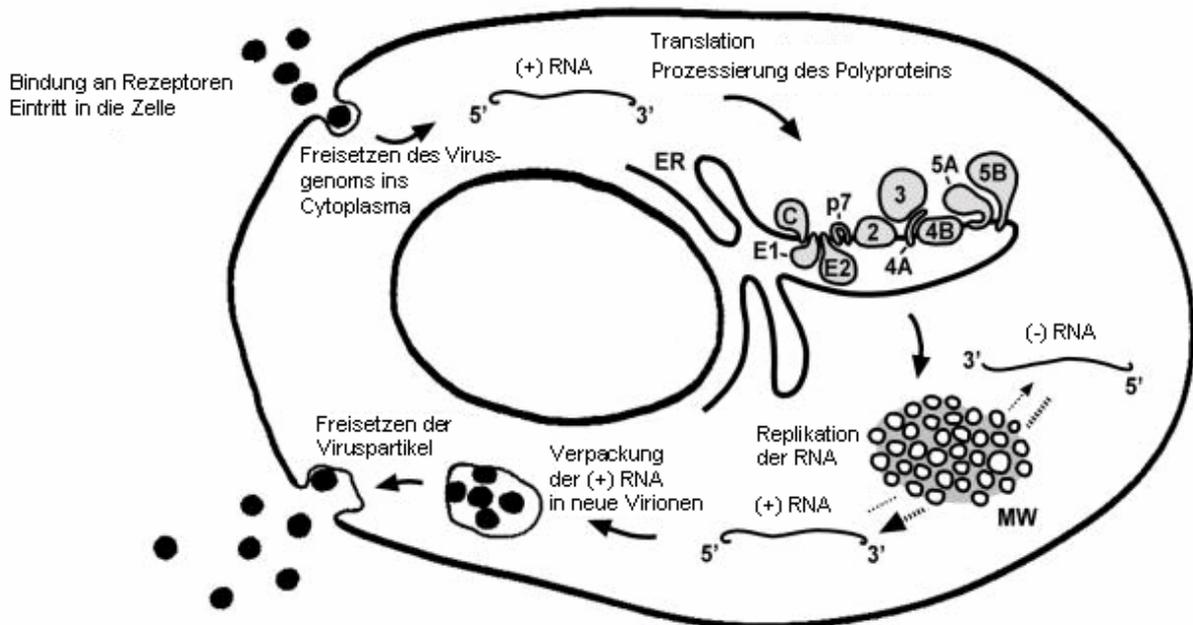


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Lebenszyklus des HCV. Nach Infektion der Wirtszelle wird das virale Genom (+ RNA) ins Cytoplasma freigesetzt und translatiert. Nach Prozessierung des Polyproteins bleiben die Virusproteine (C, E1, E2, p7, 2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B) mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert. Am *Membranous Web* (MW) wird Minussträngige RNA (- RNA) synthetisiert und dient wiederum als Matrize zur Produktion von plussträngiger RNA. Diese wird in neue Virionen verpackt, die daraufhin freigesetzt werden (nach Brass et al., 2006).

Die neue Plusstrang-RNA wird nun zur Synthese weiterer Minusstrang-RNA, zur Polyproteinexpression oder zur Verpackung in Virionen genutzt. Der Mechanismus, über den die neu gebildeten Viruspartikel freigesetzt werden, ist noch nicht geklärt (Bartenschlager und Lohmann, 2000).

1.10 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger. Es wirkt schnell, aber unspezifisch, bevor sich eine adaptive Immunität ausbildet und Infektionen durch eine spezifische Immunantwort bekämpft werden können. Zum angeborenen Immunsystem gehören Makrophagen, natürliche Killerzellen, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs), dendritische Zellen und als lösliche Komponente das Komplementsystem. Das Zusammenspiel dieser Faktoren kann zum Beispiel bei einer Virusinfektion zur Lyse einer infizierten Zelle führen. Außerdem werden Interferone und andere Cytokine induziert, die über verschiedene Signaltransduktionswege die Virusreplikation inhibieren, das Zellwachstum verändern und die Apoptose einleiten.

1.11 Interferon- α und die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade

Interferone sind Cytokine, die in der frühen Phase der Immunantwort als Reaktion auf eine Infektion gebildet werden. Sie aktivieren Effektorzellen des Immunsystems und induzieren antivirale Prozesse, die das Zellwachstum und die Differenzierung regulieren und die Apoptose einleiten können (Samuel, 2001). Das Interferon- α gehört zur Gruppe der Typ I-Interferone, die hauptsächlich in der Bekämpfung viraler Infektionen von Bedeutung sind. Es induziert die Expression antiviraler Gene über die Jak-STAT-Signaltransduktionskaskade. Dazu bindet es zunächst an die Untereinheiten IFNAR 1 und 2 des Typ I-Interferonrezeptors (Abb. 1.4). Durch diese Bindung werden die Transkriptionskinasen Jak-1, Tyk-2, STAT 1, STAT2 und STAT3 phosphoryliert und aktiviert. Daraufhin dimerisieren STAT 1 und 2 und bilden einen Komplex mit dem IFN-regulatorischen Faktor 9 (IRF-9). Dieser sogenannte IFN-stimulierte Genfaktor 3 (ISGF-3) wird in den Zellkern transportiert, wo er mit dem IFN-stimulierten Antwortelement (ISRE) interagiert und die Transkription von IFN-stimulierten Genen aktiviert (Samuel, 2001).

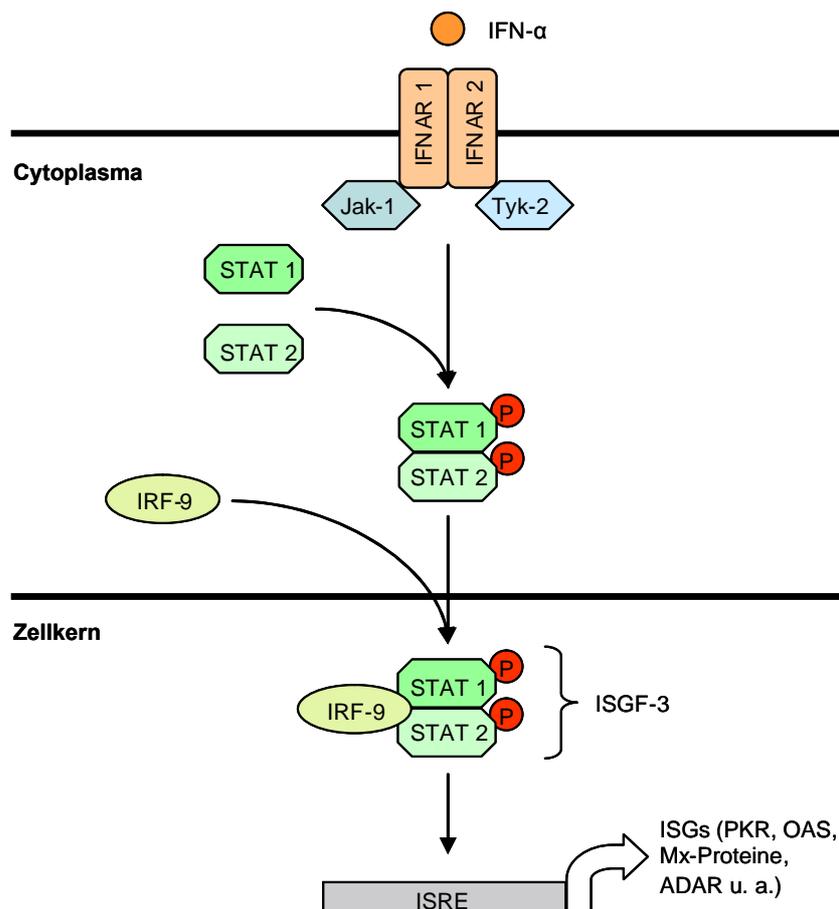


Abb. 1.4 Die IFN-Signaltransduktion über den Jak/STAT-Weg. IFN- α bindet an die Untereinheiten IFNAR 1 und 2 des Typ I-Interferonrezeptors. Durch diese Bindung werden die Transkriptionskinasen Jak-1, Tyk-2, STAT 1, STAT2 und STAT3 phosphoryliert und aktiviert. Daraufhin dimerisieren STAT 1 und 2 und bilden einen Komplex mit dem IFN-regulatorischen Faktor 9 (IRF-9). Dieser sogenannte IFN-stimulierte Genfaktor 3 (ISGF-3) wird in den Zellkern transportiert, wo er mit dem IFN-stimulierten Antwortelement (ISRE) interagiert und die Transkription von IFN-stimulierten Genen (ISGs) aktiviert (nach Samuel, 2001).

1.12 IFN-induzierte Gene und ihre Wirkungsweisen

Einige wesentliche Gene, die durch Interferone induziert werden, sind die Proteinkinase R (PKR), die 2'-5'-Oligoadenylatsynthase (OAS), die Mx-Proteine und die RNA-spezifische Adenosindeaminase ADAR1. Die Prinzipien ihrer antiviralen Wirkung werden im Folgenden beschrieben.

Die PKR ist eine Serin/Threoninkinase, die über die Phosphorylierung von Proteinen die zelluläre Transkription und Translation reguliert und als Apoptoseinduktor und Tumorsuppressor wirkt (Tan und Katze, 1999). Sie wird durch dsRNA, die häufig bei der Replikation von Virusgenomen entsteht, aktiviert und phosphoryliert die α -Untereinheit des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF2 α . Dieser inhibiert daraufhin die zelluläre Proteinsynthese und als Folge davon auch die virale Replikation (Samuel, 2001).

Die OAS verestert ATP-Reste zu Oligoadenylaten, die die RNase L binden und aktivieren. Diese baut daraufhin virale ssRNA-Moleküle ab (Samuel, 2001).

Die Mx-Proteine sind GTPasen, die vermutlich mit der viralen RNA-Polymerase interagieren und so ihre antivirale Wirkung vorwiegend auf RNA-Viren mit negativer Polarität ausüben.

Die RNA-spezifische Adenosindeaminase ADAR1 modifiziert RNA-Moleküle, indem sie Adenosine zu Inosinen desaminiert. Da Inosin von Polymerasen als Guanin erkannt wird, hat diese Veränderung die Degenerierung des genetischen Codes zur Folge. Außerdem erkennen spezifische RNasen inosinhaltige RNA und bauen sie ab (Samuel, 2001).

1.13 HCV-Proteine und ihr Einfluss auf die IFN-Antwort

Das Hepatitis C Virus hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Pavio und Lai, 2003; Bowen und Walker, 2005; Gale und Foy, 2005). Die Untersuchungen dieser Vorgänge waren dadurch limitiert, dass kein Zellkultursystem für das HCV zur Verfügung stand. Daher wurden Modellsysteme zur Erforschung des HCV verwendet, in denen in Zellkulturen Proteine exprimiert wurden oder subgenomische HCV-RNA-Moleküle replizierten. Die Studien lieferten unter anderem wegen der verschiedenen methodischen Ansätze teilweise widersprüchliche Ergebnisse, die durch die Überexpression der viralen Proteine erklärt werden können. Dennoch wurde letztlich gezeigt, dass die HCV-kodierten Protein *core*, E2, NS3/NS4A und NS5A mit der IFN-Antwort des Wirts interagieren und diese hemmen können.

Für das *core*-Protein ist bekannt, dass es den Transkriptionsfaktor NF κ B sowohl stimulieren (Chung et al., 2001, Kim et al., 2001) als auch inhibieren kann (Joo et al., 2005). Weiterhin ist bekannt, dass *core* die Bindung des ISGF-3 an das ISRE und folglich die Transkription der ISGs hemmt (de Lucas et al., 2005). Hinzu kommt eine postulierte Interaktion zwischen *core* und STAT1, die zum Abbau von STAT1 führt und somit die Übertragung des durch IFN ausgelösten Signals einschränkt (Lin et al., 2005).

Das Glykoprotein E2 des HCV enthält einen Sequenzabschnitt mit hoher Homologie zu einem Abschnitt der PKR, an dem dieses Enzym autophosphoryliert, und zur Phosphorylierungsregion des Transkriptionsfaktors eIF2 α , der ein Substrat der PKR ist. Dieser Bereich im E2-Protein wird daher PKR-eIF2 α -Phosphorylierungsdomäne (PePHD) genannt (Taylor et al., 1999). Es wird angenommen, dass E2 als Pseudosubstrat der PKR dient und so die Phosphorylierung des eIF2 α inhibiert.

Interessanterweise ist die Homologie zwischen den PePHDs aus E2-Proteinen von eher IFN-resistenten Genotypen und den Sequenzen der PKR und des eIF2 α höher als zu den PePHD-Sequenzen aus eher IFN-sensitiven Genotypen, so dass die E2-PKR-Interaktion den Unterschied in der IFN-Resistenz verschiedener HCV-Genotypen teilweise erklären kann (Pavio und Lai, 2003).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die NS3/4A-Serinprotease des HCV die Phosphorylierung des Interferon-regulierenden Faktors IRF-3 inhibieren kann. Dadurch wurde die Verlagerung von IRF-3 in den Zellkern und eine Induktion von Interferon- β verhindert (Foy et al., 2003).

1.14 Der Einfluss des nichtstrukturellen HCV-Proteins NS5A auf die IFN-Antwort

Eine Reihe von Publikationen, die einen Zusammenhang der Sequenz von natürlichen HCV-Isolaten mit der Therapierbarkeit chronischer HCV-Patienten untersuchten, postulierten einen Einfluss des nichtstrukturellen NS5A-Proteins auf die Resistenz gegen die IFN-Therapie (Enomoto et al., 1995; Chayama et al., 1997; Saiz et al., 1998). Dabei scheint vor allem der Austausch mehrerer Aminosäuren in der zentralen Region des NS5A-Proteins im Vergleich zu einer bestimmten Prototypsequenz zu einem Erfolg der IFN-Therapie zu führen. Der Abschnitt, in dem sich diese Mutationen befinden, wurde daher *Interferon Sensitivity Determining Region* (ISDR) genannt. Nach einigen widersprüchlichen Ergebnissen (Hofgärtner et al., 1997; Zeuzem et al., 1997; Polyak et al., 1998) wurde ein Zusammenhang zwischen der ISDR-Sequenz und dem Erfolg einer IFN-Therapie in einer Metaanalyse bestätigt (Schinkel et al. 2004). Nach Entwicklung des subgenomischen HCV-Replikons wurde jedoch gezeigt, dass die Replikation aller bisher untersuchter HCV-Isolate unabhängig von der Sequenz des NS5A-Proteins sensitiv für exogen verabreichtes IFN- α war (Blight et al., 2000; Frese et al. 2001; Guo et al., 2001), was erneut im Widerspruch zu der Metaanalyse stand.

Ein Mechanismus, der dem möglichen Einfluss des NS5A-Proteins auf die IFN-Antwort zugrunde liegt, ist, ähnlich wie beim E2-Protein, die Bindung des NS5A-Proteins an die Proteinkinase R (PKR). In einer Zellkultur, in der das NS5A-Protein überexprimiert wurde, wurde die enzymatische Aktivität der PKR durch Bindung von NS5A gehemmt (Gale et al., 1997). Diese Interaktion erfolgte über die ISDR und einen kurzen Abschnitt *downstream* der ISDR (Gale et al., 1998). Allerdings wurden auch widersprüchliche Daten publiziert, die weder einen Einfluss von NS5A auf die PKR-Aktivität noch eine Bindung beider Proteine bestätigen konnten (Podevin et al., 2001).

Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass NS5A die Produktion von Interleukin 8 induzieren kann (Polyak et al., 2001). Dieses Cytokin hemmt teilweise die durch IFN ausgelöste antivirale Immunantwort. Weiterhin wurde der Einfluss des NS5A-Proteins auf die IFN-induzierten Signaltransduktionswege in Microarrayanalysen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das NS5A-Protein eine Reihe IFN-induzierter Gene, speziell die OAS, inhibieren kann. (Girard et al., 2003; Geiss et al., 2003). Zusätzlich wurde eine Induktion von Interleukin 8 bestätigt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass das NS5A-Protein dem HCV auf verschiedene Arten dazu dient, der Immunantwort des Wirtes zu entkommen.

1.15 Ribavirin und seine antiviralen Wirkungsweisen

Ribavirin (RBV) ist ein Guanosinanalogen (Abb. 1.5) mit einer antiviralen Wirkung auf ein breites Spektrum von RNA- und DNA-Viren, das in Kombination mit Interferon- α in der Therapie von HCV-Infektionen eingesetzt wird. Derzeit bestehen verschiedene Hypothesen, wie RBV seine direkte oder indirekte antivirale Wirkung entfaltet. Erstens wurde gezeigt, dass RBV an die HCV-RNA-Polymerase bindet und so die RNA-Synthese und die Replikation des HCV gehemmt werden (Maag et al., 2001). Zweitens konkurriert RBV mit Inosinmonophosphat (IMP) als Substrat der Inosinmonophosphatdehydrogenase (IMPDH). Dieses Enzym setzt normalerweise IMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) um, welches unter anderem für die RNA-Replikation benötigt wird. Durch RBV wird die intrazelluläre GMP-Konzentration herabgesetzt, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Replikation hat (Sintchak et al., 2000). Drittens kann der Einbau von RBV in neu synthetisierte Virusgenome zur Bildung einer Quasispecies führen, die nicht mehr zur Replikation fähig ist (Contreras et al., 2002). Viertens kann durch RBV das Th1/Th2-Verhältnis der T-Zellen erhöht werden, was die Kontrolle einer Infektion in der frühen Phase verbessert (Hultgren et al., 1998). Diese vorgeschlagenen Mechanismen schließen sich nicht gegenseitig aus und möglicherweise entwickelt das RBV durch mehrere dieser Wirkungsweisen gleichzeitig seine antiviralen Effekte.

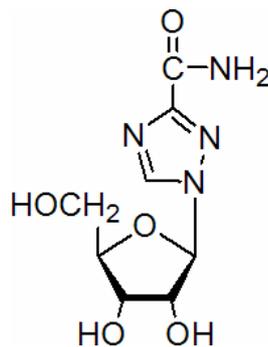


Abb. 1.5 Die Strukturformel des Guanosinanalogs Ribavirin (1- β -D-Riobofuranosyl-1H-1,2,3-triazol-3-carboxamid)

1.16 Modellsysteme für das HCV

Trotz geringer Sequenzhomologie sind weitere Viren aus der Familie der *Flaviviridae* hilfreiche Modelle zur Forschung am HCV, da sie eine ähnliche Genomorganisation aufweisen. So führte z. B. die Beobachtung, dass eine subgenomische RNA des Pestiviruses BVDV, der die Strukturproteine fehlten, zur autonomen Replikation fähig war, zur Entwicklung eines subgenomischen HCV-Replikonsystems, das ebenfalls autonom in Zellkultur replizieren kann (Behrens et al., 1998, Lohmann et al. 1999). Allerdings bestehen auch wichtige Unterschiede, die eine explizite HCV-Forschung nötig machen. So wurde z. B. bei cytotoxischen Isolaten von Pestviren die Bildung des NS3-Proteins beobachtet, während in nicht cytotoxischen Isolaten ein NS2-3-Fusionsprotein produziert wird. Für HCV-Isolate ist bisher nur bekannt, dass NS2 und NS3 gespalten werden und keine Fusionsproteine vorkommen.

Das einzige Tiermodell, das für HCV zur Verfügung steht, ist der Schimpanse. Es wurde auch versucht ein Kleintiermodell mit Tupajas (*T. belangeri chinensis*) zu etablieren, doch nur eine geringe Anzahl an Tieren wurde infiziert und bildete ausheilende Infektionen oder Virämien mit niedrigen Virustitern aus (Xie et al., 1998).

1.17 Replikonsysteme zur Untersuchung des HCV

Lange Zeit standen zur Forschung am HCV in humaner Zellkultur nur Systeme zur Verfügung, in denen mit Hilfe von Plasmiden bestimmte HCV-Proteine in der Zelle überexprimiert wurden (Macdonald und Harris, 2004). Mit der Entwicklung eines subgenomischen Replikonmodells ist es heutzutage möglich, das HCV unter physiologischeren intrazellulären Bedingungen zu untersuchen, bei denen die viralen Proteine ihre Funktionen im Komplex miteinander erfüllen können (Lohmann et al., 1999). Die Replikons mit HCV-Sequenzen des Genotyps 1b replizieren hauptsächlich in der humanen Hepatomzelllinie HuH7. Durch adaptive Mutationen in den Sequenzabschnitten der Proteine NS3, NS4B, NS5A und NS5B wurde die Replikation der ersten entwickelten Replikons wesentlich verbessert (Blight et al., 2002; Lohmann et al., 2003). Ein Replikon des Genotyps 2 wurde aus dem Klon JFH-1 hergestellt, der aus einem Patienten mit fulminanter Hepatitis isoliert wurde. Dieses Replikon benötigt keine adaptiven Mutationen mehr, um in Zellkultur zu replizieren (Kato et al., 2003). Mittlerweile wurden auch gezeigt, dass Replikons auf Basis des Genotyps 2 effizient in nicht hepatischen Zelllinien wie der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293 und der HeLa-Zelllinie replizieren können (Ali et al., 2004; Kato et al., 2005). Diese und weitere Zelllinien und Replikons, mit denen eine Replikation in Zellkultur gezeigt werden konnte, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Zelllinien, in denen subgenomische HCV-Replikons replizieren.

Zelllinie	Gewebe / Organismus	Replikon	Genotyp	Publikation
HuH7	Hepatom / human	Con1	1 b	Lohmann et al., 1999
		JFH-1	2 a	Kato et al., 2003
		HC-J4	1 b	Maekawa et al., 2004
HuH7.5	Hepatom / human	H77	1 a	Blight et al., 2003
Hepa1-6	Hepatom / Maus	Con1	1 b	Zhu et al., 2003
HeLa	Epithel / human	Con1	1 b	Zhu et al., 2003
		JFH-1	2 a	Kato et al., 2005
293	embryonale Niere / human	JFH-1	2 a	Ali et al., 2004
		JFH-1	2 a	Kato et al., 2005

Kürzlich ist die Entwicklung eines Zellkultursystems gelungen, in dem gesamtgenomische HCV-Moleküle auf Basis der JFH-1-Sequenz replizieren und es zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln kommt (Wakita et al., 2005; Lindenbach et al., 2005; Zhong et al., 2005). Möglicherweise war dabei von Vorteil, dass die Sequenz keine adaptiven Mutationen aufweist, die die Bildung des Viruskapsids oder ein reguliertes Umschalten von Replikation auf Partikelbildung verhindern könnten. In diesem System werden die natürlichen Bedingungen und Abläufe einer HCV-Infektion wie die Anlagerung des Virus an und der Eintritt in die Wirtszelle sowie die Bildung neuer infektiöser Partikel vollständig widergespiegelt. Außerdem werden alle HCV-Proteine einschließlich der strukturellen Proteine exprimiert, so dass sie wie während einer natürlichen Infektion miteinander interagieren und ihre Funktionen entfalten können. Daher werden diese HCV-infizierten Zellkulturen, in denen es zur Bildung infektiöser Viruspartikel kommt, in Zukunft dazu beitragen, die Abläufe einer HCV-Infektion und die Entwicklung der IFN-Resistenz des HCV in seiner Gesamtheit zu verstehen. So wurde bereits gezeigt, dass die Infektiösität der Viruspartikel durch spezifische Antikörper gegen das zelluläre HCV-Rezeptormolekül CD81 und durch Immunglobuline aus chronisch infizierten Patienten neutralisiert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden subgenomische Replikons auf Basis des HCV-Stamms Con1 verwendet, deren Replikation bereits durch adaptive Mutationen in den NS3- und den NS4B-Regionen an die Bedingungen in der verwendeten HuH7-Zelllinie angepasst waren (Lohmann et al., 1999 und 2003). Darin wurden die strukturellen Proteine *core*, E1 und E2, die möglicherweise cytotoxisch wirken (Moradpour et al., 1998) und für die Replikation nicht essentiell sind, sowie das NS2-Protein, das ebenfalls für die Replikation nicht benötigt wird, deletiert (Abb. 1.6). Stattdessen wurde am 5'-Ende *downstream* der HCV-IRES das Neomycinphosphotransferasegen (*neo*), welches G418-Resistenz vermittelt, eingeführt, um eine Selektion von Zellen zu ermöglichen, in denen das Replikon effizient repliziert. Eine zweite IRES des Encephalomyocarditisvirus wurde *upstream* der nichtstrukturellen HCV-Proteine NS3 bis NS5B eingesetzt, um deren Translation zu initiieren. Nach Transfektion dieser bicistronischen Replikonmoleküle in humane Zellen können mit Hilfe von G418 jene Zellen selektiert werden, die die Replikation der HCV-RNA unterstützen und somit auch das *neo*-Gen exprimieren, während nicht transfizierte Zellen bzw. Zellen, die die Replikation nicht ermöglichen, absterben. Die

etablierten Zelllinien können dann für verschiedene Untersuchungen der Replikoneigenschaften genutzt werden (Abb. 1.7).

Alternativ wurden Replikons verwendet, in denen das neo-Gen gegen ein Leuchtkäfer- (*Photinus vulgaris*)-Luciferase-Gen ersetzt wurde. Mit solchen Konstrukten kann man in einem transienten Assay schon kurze Zeit nach der Transfektion von Zellen die Stärke der Replikation messen, indem man zu Lysaten der transfizierten Zellen ein Substrat zugibt, das von der Luciferase unter Lichtemission umgesetzt wird. Das Luciferase-Gen befand sich in diesem Konstrukt *downstream* eines leicht veränderten 5'-Bereiches (Abb. 1.6). Dieser bestand aus der 5'-NTR des HCV von 341 bp Länge, einer kurzen *Spacer*-Region von 63 bp Länge und einer Poliovirus-IRES, die eine höhere Translationsaktivität als die IRES des HCV vermittelte (Friebe et al., 2001).

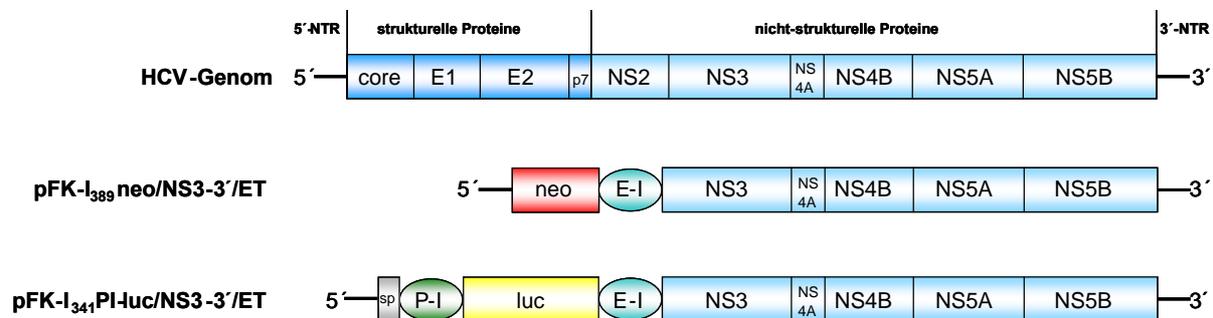


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des HCV-Genoms mit davon abgeleiteten subgenomischen HCV-Replikons. Oben ist die Struktur des HCV-Genoms mit strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen dargestellt. Darunter abgebildet sind die Replikonkonstrukte pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET bestehend aus der 5'-NTR des HCV incl. der HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (neo)- bzw. dem Luciferasegen (luc), der IRES des Encephalomyocarditisvirus (E-I), den nichtstrukturellen Proteinen NS3 bis NS5B und abschliessend der 3'-NTR des HCV. Im Luciferasekonstrukt sind zusätzlich eine 63 bp-lange *Spacer*-Region (sp) und eine Poliovirus-IRES (P-I) enthalten.

1.18 Die Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Replikation des Hepatitis C Virus wird *in vitro* effektiv durch Interferon- α inhibiert. Dennoch sprechen *in vivo* nicht alle HCV-Patienten auf die Therapie mit Interferon- α in Kombination mit Ribavirin an. Ob Wirts- oder Virusfaktoren für diese Resistenz verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Das HCV-Protein NS5A ist ein potentieller viraler Faktor, für den ein Einfluss auf die Resistenz gegen Interferon postuliert wurde. Untersuchungen natürlicher HCV-Isolate konnten einen Zusammenhang zwischen dem Ausgang der Therapie und der Sequenz eines Abschnitts des NS5A-Proteins feststellen. Der genaue molekulare Hintergrund dieser Eigenschaft des NS5A-Proteins ist jedoch noch nicht bekannt.

Für die vorliegende Arbeit standen eng verwandte HCV-Isolate aus acht Patienten zur Verfügung, die mit dem gleichen Isolat des HCV-Stammes AD78 infiziert worden waren. Diese Patienten zeigten zur Hälfte eine dauerhafte virologische und biochemische Antwort auf die Therapie (*Responder*), bei der anderen Hälfte blieb die Therapie erfolglos (*Nonresponder*). Anhand der NS5A-Fragmente dieser Isolate sollten molekularbiologische Tests zur Bedeutung des NS5A-Proteins für die Resistenz des HCV gegen IFN- α und Ribavirin durchgeführt werden. Dazu wurde mit einem subgenomischen Replikon auf Basis des HCV-Stamms Con1 gearbeitet, das autonom in Zellen repliziert (Abb. 1.6). Nach Klonierung der NS5A-Fragmente aus den Patientenseren in das Replikon sollten HuH7-Hepatomzellen mit den chimären HCV-RNA-Molekülen transfiziert werden. Mit Hilfe der Zelllinien, in denen die virale RNA dauerhaft replizierte, sollte dann die Resistenz der Replikation gegen Interferon- α und Ribavirin bestimmt werden. Wenn das NS5A-Protein der virale Faktor wäre, der *in vivo* zur Resistenz des HCV gegen die antiviralen Komponenten führt, sollte auch *in vitro* die Replikation von chimären Replikons mit NS5A-Fragmenten aus Isolaten von *Nonrespondern* resistent sein. Eine Sequenzanalyse sollte Merkmale aufdecken, die zu den unterschiedlichen Ansprechverhalten der Replikons auf die Behandlung mit Interferon- α und Ribavirin beitragen.

Die transfizierten Zelllinien sollten außerdem dazu genutzt werden, durch eine langfristige Inkubation mit Interferon- α und Ribavirin resistente Varianten der Replikons zu generieren, anhand derer Mutationen der HCV-RNA identifiziert werden sollten, die die Resistenz vermittelten.

Weiterhin sollte im Rahmen der Arbeit mit den Zelllinien, die HCV-Replikons enthielten, die Inhibition der TNF- α -induzierten Apoptose durch das NS5A-Protein analysiert werden. Dazu sollten die Zellen, in denen die verschiedenen Varianten von NS5A exprimiert wurden, mit TNF- α behandelt und die Lebendzellraten bestimmt werden.

In einem weiteren experimentellen Ansatz sollte der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Replikation des HCV untersucht werden. HuH7-Zellen sollten mit der Reihe der chimären HCV-Replikons transfiziert und die Stärke der Replikation mit Hilfe eines Luciferase-Reportergens unmittelbar nach der Transfektion bestimmt werden. Über einen Vergleich der NS5A-Sequenzen sollten dann Aminosäuremutationen identifiziert werden, die zu einer veränderten Replikation führten. Ein umfassenderes Verständnis der Rolle des NS5A-Proteins in der HCV-Replikation wird helfen, Medikamente und Therapieansätze gegen HCV-Infektionen zu verbessern.

Con1/AD78-Konstrukte auf Basis der Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET mit NS5A-Abschnitten des HCV-Stammes AD78

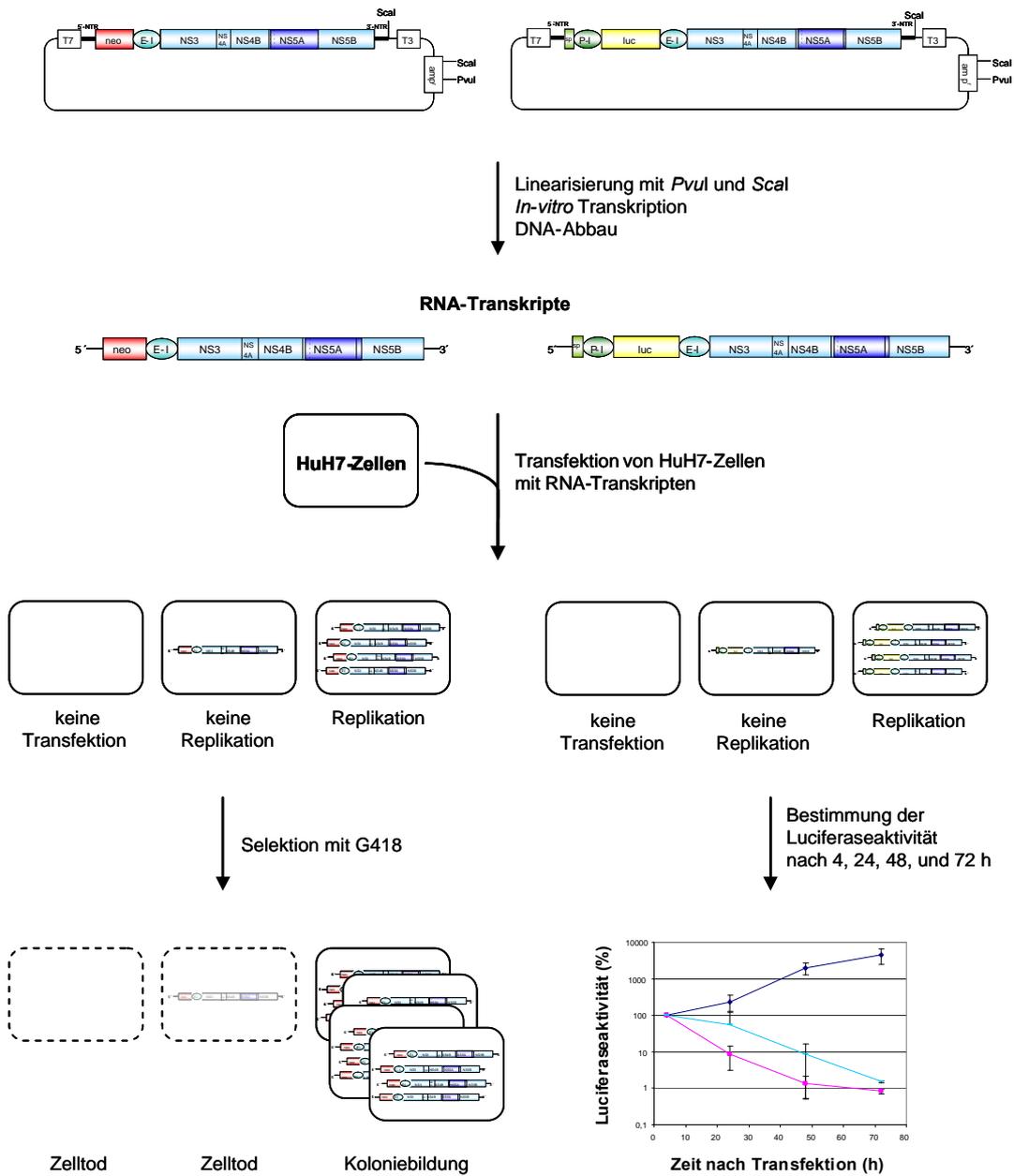


Abb. 1.7 Schematische Darstellung der Transfektion von HuH7-Zellen mit chimären Con1/AD78-Konstrukten auf Basis der Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, die NS5A-Abschnitte aus Isolaten des HCV-Stammes AD78 enthielten. Die Plasmide wurden mit PvuI und Scal linearisiert und dienten dann als Matrize zur *in vitro*-Transkription von Replikon-RNA. Die DNA wurde abgebaut und HuH7-Zellen wurden durch Elektroporation mit den RNA-Transkripten transfiziert. Nach der Transfektion mit neo-Konstrukten erfolgte eine G418-Selektion von Zellen, in denen die Replikons effizient replizierten und die daraufhin Kolonien bildeten. Im Falle der Transfektion mit luc-Konstrukten wurde nach 4, 24, 48 und 72 h die Luciferaseaktivität bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Deionisiertes Wasser (dH₂O) wurde in einer NANOpure-Anlage hergestellt. Alle verwendeten Chemikalien, die nicht im Folgenden aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck bezogen.

³² P-UTP	Amersham Biosciences
Agarose	Eurogentec
Agarose (für RNA-Gele)	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampicillin	Roth
Aqua-Roti-Phenol	Roth
Bacto-Agar	BD
β-Mercaptoethanol	Stratagen
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
Cell Lysis II Puffer	Ambion
Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Coomassie Blau R250	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
DAB	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
DEPC-H ₂ O	Ambion
DMSO	Roth
dNTPs	Promega
D-PBS	Invitrogen
D-PBS (+ CaCl ₂ , + MgCl ₂)	Invitrogen
EDTA-Lösung (0,5 M)	Ambion
EGTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Eukobrom SW-Papierentwickler	Tetenal
Formaldehyde Load Dye	Ambion

G418-Sulfatlösung	PAA
Glycin	Sigma-Aldrich
Interferon- α	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
LB-Medium	Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Natrium-4-Phenylbutyrat	Calbiochem
Northern Max 10x Denaturing Gel Buffer	Ambion
Northern Max MOPS gel running buffer	Ambion
Northern Max Prehybridization/Hybridization Buffer	Ambion
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Protein A/HRP-Konjugat	ICN
Ribavirin	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30	Roth
Saccharose	Applichem
SDS (20%ige Lösung)	Applichem
SSC-Puffer (20x)	Invitrogen
Superfix Plus Schnellfixierkonzentrat	Tetenal
TBE-Puffer ultrapure (10x)	Invitrogen
TEMED	Sigma-Aldrich
TNF- α	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Calbiochem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trypsin-EDTA (1x)	PAA
Tween-20	Sigma
ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer	Ambion
WST-1	Roche

2.1.2 Lösungen und Puffer

Blockierungspuffer	D-PBS 1% BSA
Coomassie-Entfärbelösung	30% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,5% Coomassie R-250 (1 g/200 ml) 8% Essigsäure 20% Ethanol

Cytomix (sterilfiltriert)	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 25 mM HEPES 2 mM EGTA 5 mM MgCl ₂ 2 mM ATP 5 mM Glutathion pH 7,6
DEPC-H ₂ O	1 ml DEPC wurde zu 1 l dH ₂ O gegeben und über Nacht bei 37°C gelagert. Am folgenden Tag wurde das Wasser autoklaviert.
NaOH-Transferpuffer	50 mM NaOH
<i>Northern Blot</i> -Waschpuffer I	2x SSC 0,1% SDS
<i>Northern Blot</i> -Waschpuffer II	0,1x SSC 0,1% SDS
Proteinprobenpuffer	200 mM Tris (pH 8,8) 5 mM EDTA 2% SDS 1% β-Mercaptoethanol 10% Saccharose 0,1% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,01% SDS
SDS-Probenpuffer	60 mM Tris (pH 6,8) 2% SDS 2% β-Mercaptoethanol 15% Glycerin 0,1% Bromphenolblau
SSC-Puffer	20x SSC Buffer mit dH ₂ O auf 1x verdünnt

TBE-Puffer	10x TBE-Puffer ultrapure mit dH ₂ O auf 1x verdünnt
<i>Western Blot</i> -Transferpuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin
<i>Western Blot</i> -Waschpuffer	D-PBS 0,02 % Tween-20

2.1.3 Acrylamid/Bisacrylamid-Gele

Die Zusammensetzungen des 12%igen Acrylamid/Bisacrylamid-Trenngels und des 5%igen Acrylamid/Bisacrylamid-Sammelgels sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1 Die Zusammensetzungen der Acrylamid/Bisacrylamid-Gele.

Substanz	12%iges Trenngel	5%iges Trenngel
Rotiphorese Gel 30 (30%ige Acrylamidstammllösung mit 0,8% Bisacrylamid)	6,0 ml	0,8 ml
dH ₂ O	5,8 ml	3,6 ml
1,875 M Tris-HCl (pH 8,8)	3,0 ml	-
1,25 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	0,5 ml
SDS (10%ige Lösung)	150 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	5 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	17 µl

2.1.4 Enzyme

DNase I	Ambion
Expand Long Template PCR System	Roche
Restriktionsendonukleasen (<i>BclI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>MluI</i> , <i>PvuI</i> , <i>ScaI</i>)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen
Thermoscript Reverse Transkriptase	Invitrogen

2.1.5 Längen- und Größenstandards für Nukleinsäuren und Proteine

Rainbow Marker high	Amersham
RNA Millenium Marker	Ambion
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
Smart ladder	Eurogentech

2.1.6 Kits

HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen
Light Cycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche
Light Cycler RNA Amplification Kit Hybridization Probes	Roche
Luciferase Luminescence Reporter Gene Assay System	Perkin Elmer Life Science
MinElute Reaction Cleanup Kit	Qiagen
pTOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
QIAamp MinElute Virus Spin Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR	Qiagen
QuikChange XL II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
T3 Maxi Script In vitro Transcription Kit	Ambion
T7 Mega Script High Yield Transcription Kit	Ambion

2.1.7 Geräte

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5804	Eppendorf
Cronex Cassette Lightning Plus	Du Pont
Cytoperm 2	Heraeus
E132 Power Supply	Consort
Gel Dryer Model 583	Bio Rad
Gene Genius	Syngene
Gene Pulser II	Bio Rad
Gene Quant pro	Amersham Biosciences
HERAfreeze	Heraeus
HERAsafe	Heraeus
Hybridisierungsröhre	Amersham
Light Cycler	Roche
Mini Oven	MWG-Biotech
Mini Protean II	Bio RAD
Multifuge 3 R-L	Heraeus
Mupid-21	Cosmo Bio
NANOpure	Barnsted
Neubauerkammer	Assistent
Thermocycler 60	Biomed
Titertek Multiskan Plus	Labsystems
Top Count NXT	Packard
Trio Thermoblock	Biometra
U3-Wasserbad	Julabo

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

50 ml-Röhren	Sarstedt
BioMax MS Film	Kodak
Cellstar 6- <i>well</i> -Platten	Greiner bio-one
Cellstar Tissue Culture Flask (non pyrogenic, 50 ml und 250 ml)	Greiner bio-one
CulturPlate-96F	Packard
Gene Pulser Cuvette (0,4 cm)	Bio Rad
Hybond N+ Membran	Amersham Biosciences
Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche
Microtest Tissue Culture Plate (96 <i>well</i>)	Falcon
Nuc Away Spin Columns	Ambion
Petrischalen	Greiner bio-one
PharmAssure (0,45 nm)-Filter	Pall Medical
Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Greiner bio-one
Protran BA85 (Nitrocellulose)	Schleicher & Schuell

2.1.9 Computerprogramme und Internetseiten

ALIGN Version 1.02	Scientific & Educational Software
HCV Sequence Database	http://hcv.lanl.gov/
NCBI HomePage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
GeneScan	Syngene
Light Cycler Software 3.5	Roche
Microsoft Office	Microsoft

2.1.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden kommerziell bezogen. Ihre Namen, Sequenzen und Herstellerfirmen sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Tab. 2.2 Verwendete Primer mit Sequenzen in 5'→3'-Richtung und Herstellerfirmen. A: Adenosin, C: Cytosin, G: Guanodin, T: Thymin, R: Adenosin + Guanodin, Y: Cytosin + Thymin

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Firma
HCV6311seq	TTTCAAGACCTGGCTCC	Biomers
hFL (HCV sensor)	GTGTCGTGCAGCCTCCAGG-Fluorescin	TIB Molbiol
hLC (HCV anchor)	LC-Red640-CCCCCCTCCCGGGAGAGCC-PH	TIB Molbiol
p47LC	TGTGAGGAAGTACTGTCTTCACGC	Biomers
p81LC	GGTGTACTCACCGGTTCCG	Biomers
QuantiTect Primer Assay Hs-IFNAR1-SG-1	nicht angegeben	Qiagen
QuantiTect Primer Assay Hs-IFNAR2-SG-1	nicht angegeben	Qiagen
SV63	CCCTTCTCTGGTTGRACRC	Biomers
SV83	GGTTATGGAGCAGGGGTGG	Biomers
SV84	CACTCAGCTGCTGAAGAGGCTTACC	Biomers
SV87	TATGGTGATCAGGGCRCTGTCCAYG	Biomers
SV110	GACCTCCGACAGGATCTCCGCC	Biomers
SV320	GACGCGGGATCCGACGCTGAGTCGTAACCTCC	Biomers
SV321	GGAGGAGTACGACTCAGCGTCCGATCCCGCGTC	Biomers
SV322	GACGCAGGGTCCGACGTTGAGTCGATTCTCC	Biomers
SV323	GGAGGAATACGACTCAACGTCGGACCTCGCTC	Biomers
SV324	GCTAAGCGCAGGTTGGCCAGGGGGTCTCCTCC	Biomers
SV325	GGGAGGAGACCCCTGGCCAACCTGCGCTTAGC	Biomers
SV326	CAACCGCTCCTCCTGACCAGCCTTCCGACGG	Biomers
SV327	CCGTCGGAAGGCTGGTCAGGAGGAGCGGTTG	Biomers
SV342	GCGGCACGGCAACGGCCCTCCTGACCAGCCCTCC	Biomers
SV343	GGAGGGCTGGTCAGGAGGGGGCCGTTGCCGTGCCG	Biomers
SV344	GCAACGGCCTCCTGCGCCAGCCCTCCGACG	Biomers
SV345	CGTCGGAGGGCTGGCCAGGAGAGGCGGTTGC	Biomers
SV351	GCTAAGCGTAGGCTGGACAGGGGATCTCCCCC	Biomers
SV352	GGGGGGAGATCCCTGTCCAGCCTACGCTTAGC	Biomers
SV353	GAGGACGGTTGTCCTGACAGAATCTACCGTGTC	Biomers
SV354	GACACGGTAGATTCTGTCAGGACAACCGTCCTC	Biomers
SV413	ATTATTCTAGGGCGCCGTGGCGGGTGGGTGC	Biomers
SV414	GCAGCCACCCGCCACGGCGCCCTAGAATAAT	Biomers
SV429	ATGATGGTCGTCCTCCTG	Biomers
SV430	TCATACAAAGTCCTGCTG	Biomers
SV433	ACTACTTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGC	Biomers
SV434	GCAGCCACCCGCCACAGCCCTAGAGTAGT	Biomers
SV464	GCGACGACCTAGTGCTC	Biomers
SV465	CCTGCTGTAGTTCTTCACTTG	Biomers
SV482	CCGGCGCTTCCGTATCGCTCCTCG	Biomers
SV483	CACAGGGATGCAGCTTGTAATCCC	Biomers
SV484	ACCCGCACTAAAGACGCTTCTTCCC	Biomers
SV485	TCCCAGCTACTGGGGAAGCTTAGGC	Biomers

2.1.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Max Efficiency DH5α	Invitrogen
<i>E. coli</i> SCS110-Zellen	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10-Zellen	Invitrogen

2.1.12 Medium und Agarplatten zur Kultivierung von *E.coli*-Bakterien

LB-Ampicillin-Medium	25 g LB-Medium-Pulver in 1 l dH ₂ O, nach dem Autoklavieren Zugabe von 100 mg sterilfiltriertem Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/l Ampicillin)
LB-Ampicillin-Agarplatten	25 g LB-Medium-Pulver und 15 g Bacto Agar in 1 l dH ₂ O, nach dem Autoklavieren Zugabe von 100 mg sterilfiltriertem Ampicillin (Enkonzentration 100 mg/l Ampicillin). Gießen der Agarplatten in Petrischalen.

2.1.13 Virusisolate

Für die vorliegende Arbeit standen Serumproben von acht chronisch infizierten Patientinnen zur Verfügung. Diese hatten sich in den Jahren 1978 und 1979 bei einer Behandlung mit dem gleichen Anti D-Immunglobulin-Präparat infiziert, das mit Hepatitis C Virus des Stammes AD78 kontaminiert gewesen war (Dittmann et al., 1991). Vier der Patientinnen hatten auf eine Kombinationstherapie mit Interferon- α und Ribavirin angesprochen (*Responder*, R1–R4), die vier anderen nicht (*Nonresponder*, NR1–NR4). Die Serumproben der vier *Responder* waren ein bis drei Monate vor Beginn der Therapie, die Proben der *Nonresponder* zwölf bis sechzehn Monate nach Einsetzen der Behandlung entnommen worden.

2.1.14 Plasmide und Vektoren

2.1.14.1 pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET

Das Plasmid pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET (Abb. 2.1 A) wurde von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem Plasmid pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/wt mit der Sequenz des subgenomischen Replikons I₃₈₉/NS3-3'UTR (NCBI-Zugriffsnummer AJ242654). Darin enthalten ist die HCV-Sequenz des Stammes Con1 vom NS3-Protein bis zum 3'-Ende. Im Vergleich zum Wildtyp-Replikon befinden sich im Plasmid pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET jedoch die adaptiven Mutationen E1202G und T1280I im NS3-Protein sowie K1846T im Protein NS4B, die eine effizientere Replikation ermöglichen (Lohmann et al., 2003).

2.1.14.2 pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET

Das Plasmid pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET (Abb. 2.1 B) wurde von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem Plasmid pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET (2.1.14.1). Im Gegensatz dazu wurde allerdings das Neomycinphosphotransferasegen gegen einen Sequenzabschnitt ersetzt, der aus der 341 nt-langen 5'-NTR des HCV, einem 63 bp-langen *Spacer*-Element, einer Poliovirus-IRES und dem Leuchtkäfer- (*Photinus vulgaris*)-Luciferase-Gen besteht.

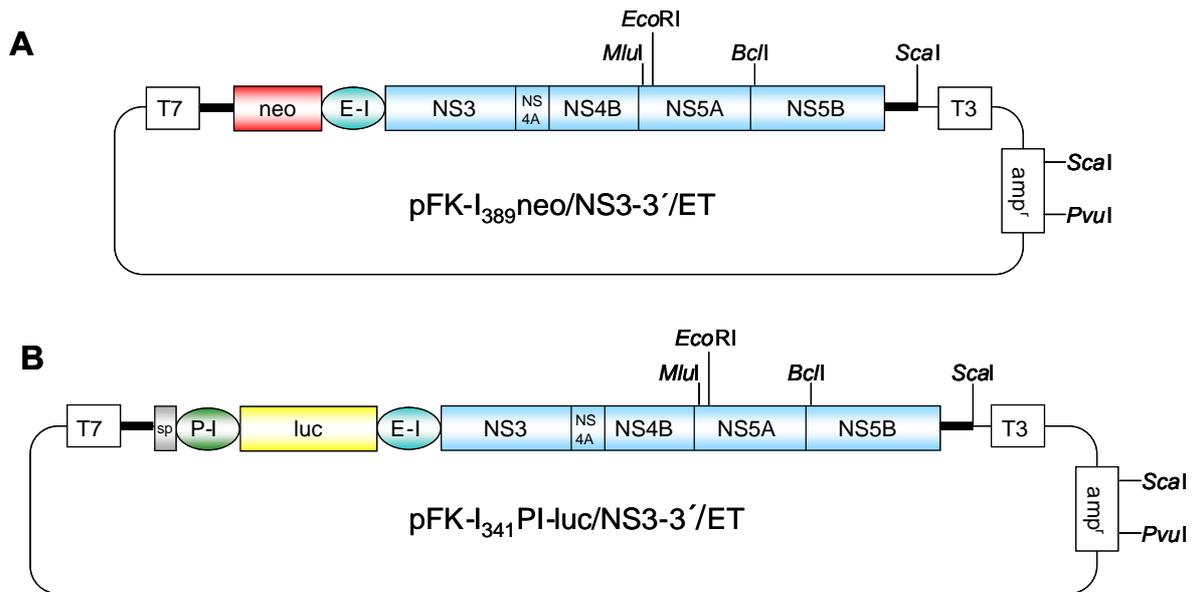


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET (A) und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET (B), die die Sequenzen der subgenomischen HCV-Replikons enthalten. Außerdem sind Promotorsequenzen (T3, T7) zur *in vitro*-Transkription von RNA und das Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter Zellen enthalten. Für diese Arbeit relevante Schnittstellen von Endonukleasen (*MluI*, *EcoRI*, *BclI*, *Scal*, *PvuI*) sind angegeben.

2.1.14.3 pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET/GND

Das Plasmid pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET/GND wurde von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Es ist bis auf eine Mutation in der NS5B-RNA-Polymerase identisch mit dem Plasmid pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET. Diese Mutation führt zu einem Austausch des für die Replikation essentiellen GDD-Motivs durch das inaktive Motiv GND, wodurch das Replikon replikationsunfähig ist.

2.1.14.4 pFK-I₃₈₉neo und pFK-β-Actin

Die Plasmide pFK-I₃₈₉neo und pFK-β-Actin dienten als Matrize in der *in vitro*-Transkription von RNA-Sonden für den spezifischen Nachweis von Replikon-RNA bzw. β-Actin-mRNA.

2.1.14.5 pCR 2.1-TOPO

Der Vektor pCR 2.1-TOPO war im pTOPO TA Cloning Kit enthalten. Er liegt linearisiert vor und hat einzelne überhängende 3'-Desoxythymidinreste, über die er mit PCR-Fragmenten ligiert werden kann. Die Ligation wird durch die Topoisomerase I katalysiert, die kovalent an den Vektor gebunden ist.

2.1.15 Humane Zelllinien

2.1.15.1 Humane Hepatomzelllinie HuH7

Die humane Hepatomzelllinie HuH7 stammt aus einem Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom (Nakabayashi et al., 1982) und wächst adhärent. In der vorliegenden Arbeit wurden HuH7-Zellen verwendet, die bereits mit HCV-Replikon-RNA infiziert gewesen waren, jedoch durch eine Interferon- α -Behandlung wieder von den HCV-Replikonmolekülen befreit worden waren. Dadurch wurde eine Population von Zellen selektiert, die in der Lage ist, die Replikation von HCV-Molekülen effektiver zu unterstützen als ursprüngliche HuH7-Zellen. Diese geheilten HuH7-Zellen wurde von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.15.2 Humane Hepatomzelllinie 9-13

Die humane Hepatomzelllinie 9-13 basiert auf HuH7-Zellen, enthält jedoch subgenomische HCV-Replikon-RNA, die autonom in den Zellen repliziert. Die viralen nichtstrukturellen HCV-Proteine werden in der 9-13-Zelllinie besonders stark exprimiert. Diese Zellen wurden von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.16 Medien und Reagentien für die Kultivierung humaner Zellen

2.1.16.1 Komplettes DMEM-Medium

Die humane Hepatomzelllinie HuH7 wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Die Zusammensetzung von komplettem DMEM-Medium ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3 Die Zusammensetzung von komplettem DMEM-Medium. Die einzelnen Bestandteile mit Herstellerfirmen, eingesetzten Mengen und Endkonzentrationen im kompletten Medium sind angegeben.

Bestandteil	Firma	Menge	Endkonzentration im Medium
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose (4,5 g/l), with L-glutamin)	PAA	500 ml	-
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert bei 65°C für 20 min)	Biochrom	50 ml	10%
HEPES Pufferlösung	PAA	5 ml	10 mM
Nichtessentielle Aminosäuren	PAA	5 ml	1x
L-Glutamin	PAA	5 ml	2 mM
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	5 ml	Pen.: 100 U/ml, Strep.: 100 μ g/ml

2.1.16.2 Selektionsmedium

Zur Herstellung von Selektionsmedium mit einer Endkonzentration von 500 μ g/ml G418 wurden zum kompletten DMEM-Medium 5 ml einer G418-Sulfatlösung (50 mg/ml) gegeben.

2.1.16.4 Weitere Reagentien für die Kultivierung humaner Zellen

Weitere Reagenzien und Puffer, die in der Kultivierung humaner Zellen verwendet wurden, waren D-PBS zum Waschen und Trypsin-EDTA zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen.

2.1.17 Antiserum

Polyklonales α -NS5A-Antiserum wurde von Prof. Dr. Bartenschlager (Hygiene Institut, Abteilung Molekulare Virologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Extraktion aus Serumproben

Die Extraktion viraler RNA aus 200 μ l Serumproben wurde mit dem QIAamp MinElute Virus Spin Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2 Reverse Transkription

Reverse Transkriptionen verschiedener Sequenzen wurden mit der Thermoscript Reversen Transkriptase und zugehörigen Reagenzien nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde mit folgendem Ansatz gearbeitet.

20 μ l-Ansatz

4 μ l 5x cDNA Synthesis Buffer
2 μ l Primer (10 pmol/ μ l)
2 μ l dNTP Mix
1 μ l DTT (0,1 M)
1 μ l Thermoscript Reverse Transkriptase (15 U/ μ l)
3 μ l RNA-Probe
7 μ l H₂O

Die Ansätze wurden 60 min bei 50°C inkubiert und anschließend 5 min auf 85°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden. Verwendete Primer sind mit zugehöriger transkribierter RNA-Sequenz in Tabelle 2.4 angegeben.

Tab. 2.4 Revers transkribierte Sequenzen und verwendete Primer.

transkribierte RNA-Sequenz	Primer
NS5A	SV63
IFNAR 1	SV430
IFNAR 2	SV483

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCRs wurden im Trio Thermoblock mit dem Expand Long Template PCR System durchgeführt. Als Matrize dienten in der Regel DNA-Abschnitte aus Reversen Transkriptionen. Außerdem wurde teilweise mit PCR-Fragmenten als Matrize eine weitere *nested* PCR durchgeführt, wobei die *Primer* mit Sequenzen des bereits amplifizierten PCR-Fragments hybridisierten. Dadurch wurde die Spezifität der gesamten Reaktion erhöht. Amplifizierte Sequenzen und zugehörige Primerpaare mit *Annealing*-Temperaturen sind in Tabelle 2.5 angegeben. Es wurde mit folgendem Ansatz und PCR-Programm gearbeitet.

50 µl-Ansatz

25,0 µl	H ₂ O
10,0 µl	dNTPs (jeweils 25 nmol/µl)
5,0 µl	Puffer 2 (incl. 27,5 mM MgCl ₂)
1,5 µl	Primer 1 (Tab. 2.5)
1,5 µl	Primer 2 (Tab. 2.5)
5,0 µl	RT- oder PCR-Reaktion

PCR-Programme:

Denaturierung	94°C	3 min
PCR (35 Zyklen)	94°C	1 min
	variable <i>Annealing</i> -Temperatur	1 min
	68°C	3 min
Elongation	68°C	15 min

Tab. 2.5 In der PCR amplifizierte Sequenzabschnitte und zugehörige Primerpaare mit *Annealing*-Temperaturen. Die verschiedenen *Annealing*-Temperaturen, die in einer *touchdown*-PCR angewendet wurden, sind mit der jeweiligen Anzahl der PCR-Zyklen angegeben.

amplifizierte Sequenz	Primerpaar	<i>Annealing</i> -Temperatur (°C)
IFNAR1 (1.PCR)	SV429/SV430	40
IFNAR1 (<i>nested</i> PCR)	SV464/SV465	47
IFNAR2 (1.PCR)	SV482/SV483	62 oder <i>touchdown</i> -PCR: 64 (5x), 62 (35x)
IFNAR2 (<i>nested</i> PCR)	SV484/SV485	60 oder <i>touchdown</i> -PCR: 64 (5x), 62 (5x), 60 (30x)
NS5A-Region (1. PCR)	SV63/SV83	57
NS5A-Region (<i>nested</i> PCR)	SV84/SV87	55

2.2.4 Touchdown-PCR

Um eine spezifischere Primerbindung zu ermöglichen, wurde in einigen Fällen eine *touchdown*-PCR durchgeführt, in der die *Annealing*-Temperatur, bei der die Primer mit ihrer Zielsequenz hybridisieren, schrittweise gesenkt wurde. So wurden beispielsweise ein- oder zweimal fünf Zyklen mit höheren *Annealing*-Temperaturen durchgeführt bevor bei der niedrigsten *Annealing*-Temperatur 30 oder 35 Zyklen durchgeführt wurden. Die verwendeten *Annealing*-Temperaturen und Zyklenzahlen sind in Tab. 2.5 angegeben. Alle anderen Temperaturen oder Zeiten wurden wie im PCR-Programm unter 2.2.3 beibehalten.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde mit 1-2%igen Agarosegelen in Mupid-21-Kammern bei 100 V für 45-60 min durchgeführt.

2.2.6 Agarosegelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach der Restriktion mit Endonukleasen wurden DNA-Fragmenten mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.8 Adenylierung der 3'-Enden von PCR-Produkten

Um eine Klonierung mit dem Vektor pCR 2.1-TOPO zu ermöglichen, wurden am 3'-Ende von DNA-Fragmenten mit der *Taq*-DNA-Polymerase einzelne Desoxyadenosinreste angehängt. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µl-Ansatz

6,9 µl PCR-Fragmente
1,0 µl 10x *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer
1,0 µl dNTPs (jeweils 25mM)
0,1 µl *Taq*-DNA-Polymerase

Diese Ansätze wurden 15 min bei 72°C inkubiert.

2.2.9 Klonierung von PCR-Produkten in den Vektor pCR 2.1 TOPO

PCR-Fragmente wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit nach Herstellerangaben in den Vektor pCR 2.1 TOPO kloniert. Dieser Vektor liegt linearisiert vor und hat einzelne Desoxythymidinreste, die am 3'-Ende überhängen. So konnten PCR-Fragmente, an die am 3'-Ende einzelne Desoxyadenosinreste angehängt worden waren, mit dem Vektor ligiert werden. Diese Ligation wird von der Topoisomerase I katalysiert, die kovalent an den Vektor gebunden ist.

2.2.10 Transformation von kompetenten *E.coli*

2.2.10.1 Transformation von TOP10-Zellen

TOP10-Zellen wurden mittels *heat-shock*-Methode nach Herstellerangaben mit Vektoren auf Basis des pCR 2.1-TOPO-Vektors, die NS5A-Fragmente enthielten, transformiert und auf LB-Agar-Platten mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert. Der Vektor pCR 2.1-TOPO enthält ein Ampicillinresistenzgen, so dass nur erfolgreich transfizierte TOP10-Zellen auf Ampicillin-Platten Kolonien bilden konnten.

2.2.10.2 Transformation von SCS110-Zellen

In SCS110-Zellen wird die DNA nicht an Adenosinresten methyliert. Die Restriktionsendonuklease *BclI* ist nur in der Lage, solche unmethylierten DNA-Moleküle zu schneiden. Daher wurden sowohl pCR 2.1 TOPO-Vektoren als auch die Plasmide pFK_{I389}/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, aus denen NS5A-Fragmente mit *BclI* ausgeschnitten werden sollten, in SCS110-Zellen gebracht. Die Transformation erfolgte mittels *heat-shock*-Methode nach Herstellerangaben. Am folgenden Tag wurden von gewachsenen Kolonien 50 ml-ÜN-Kulturen der SCS110-Zellen in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin angeimpft, aus denen Plasmid-DNA gewonnen wurde.

2.2.10.3 Transformation von Max Efficiency DH5 α -Zellen

Max Efficiency DH5 α -Zellen wurden mittels *heat-shock*-Methode nach Herstellerangaben mit chimären Con1/AD78-Plasmiden auf Basis des Plasmids pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET transformiert und auf LB-Agar-Platten mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert. Am folgenden Tag wurden von gewachsenen Kolonien 50 ml-ÜN-Kulturen in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin angeimpft, aus denen Plasmid-DNA gewonnen wurde.

2.2.11 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 50 ml-ÜN-Kulturen in LB-Ampicillin-Medium erfolgte mit dem HiSpeed Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben.

2.2.12 Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

2.2.12.1 Restriktion von PCR-Produkten und Plasmid-DNA vor der Ligation

Aus den Plasmiden auf Basis des pCR 2.1-TOPO-Vektors, die die NS5A-Regionen der HCV-Isolate aus den Patientinnen R2, R3, R4, NR2, NR3 und NR4 enthielten, wurden NS5A-Fragmente zwischen der *MluI*-Schnittstelle im 5'-Bereich und der *BclI*-Schnittstelle im 3'-Bereich ausgeschnitten. Die *MluI*-Schnittstelle war allerdings in den Sequenzen der Virusisolate aus den Patienten R1 und NR1 nicht vorhanden. Daher wurde hier im 5'-Bereich 171 nt weiter *downstream* mit *EcoRI* geschnitten. Entsprechende Fragmente wurden aus den Plasmiden pFK-I₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET mit *MluI* und *BclI* oder *EcoRI* und *BclI* ausgeschnitten. Die Restriktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.12.2 Linearisierung von Plasmid-DNA vor der *in vitro*-Transkription von HCV-Replikon-RNA

Als Vorbereitung zur *in vitro*-Transkription von HCV-Replikon-RNA wurden die Plasmide pFK-I₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET sowie darauf basierende chimäre Con1/AD78-Konstrukte mit *PvuI* und *ScaI* nach Herstellerangaben linearisiert. Die korrekte Restriktion am 3'-Ende der Replikon-kodierenden Sequenz wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.12.2 Linearisierung von Plasmid-DNA vor der *in vitro*-Transkription radioaktiver Sonden

Die Plasmide pFK-I₃₈₉neo und pFK-β-Actin wurden mit *Hind*III nach Herstellerangaben linearisiert und zur *in vitro*-Transkription von radioaktiven Sonden verwendet.

2.2.13 Ligation

Die Ligation von *Mlu*I/*Bcl*I- oder *Eco*RI/*Bcl*I-geschnittenen NS5A-Fragmenten in die Plasmide pFK-I₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, aus denen entsprechende Fragmente der NS5A-Region ausgeschnitten worden waren, erfolgte nach Herstellerangaben mit der T4 DNA Ligase bei 14°C für 16 Stunden. Die resultierenden chimären Plasmide auf Basis der Plasmide pFKI₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET (HCV-Stamm Con1), in denen beinahe die komplette NS5A-Sequenz gegen die aus Virusisolaten der Patienten R1-4 und NR1-4, die mit dem HCV-Stamm AD78 infiziert waren, ausgetauscht worden waren, wurden wie folgt genannt:

- Con1/AD78-R1, -R2, -R3 oder -R4
- Con1/AD78-NR1, -NR2, -NR3 oder -NR4

Ob Plasmide mit dem Gen für die Neomycinphosphotransferase oder dem Luciferasegen verwendet wurden, leitet sich aus den jeweiligen Versuchen ab.

2.2.14 Phenol/Chloroform-Extraktion von Plasmid-DNA

Nach der Restriktion mit *Pvu*I und *Scal*I oder *Hind*III wurde linearisierte DNA mit Phenol gereinigt und angereichert. Dazu wurde zum Restriktionsansatz 1 Vol. eines 1:1-Gemisches von Phenol und Chloroform gegeben, 10 sec geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min bei 4°C wurde die wässrige obere Phase abgenommen und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde 30 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.15 *In vitro*-Transkription

2.2.15.1 *In vitro*-Transkription zur Herstellung von HCV-Replikon-RNA

Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit *Pvu*I und *Scal*I linearisierte DNA als Matrize in einer *in vitro*-Transkription von RNA mit dem T7 Mega Script High Yield Transkription Kit eingesetzt. Dazu wurde 1 µg der DNA mit je 2 µl der vier NTP-Lösungen, 2 µl des Reaktionspuffers und 2 µl des Enzymmixes in einem 20 µl-Ansatz für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zum Abbau der DNA 1µl DNase I hinzugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die transkribierten Replikon-RNAs werden im Folgenden entsprechend ihrer Plasmide Con1/AD78-R1, -R2, -R3, oder -R4 und Con1/AD78-NR1, -NR2, -NR3 oder -NR4 genannt. Ob Replikons mit dem Gen für die Neomycinphosphotransferase oder dem Luciferasegen verwendet wurden, leitet sich aus den jeweiligen Versuchen ab.

2.2.15.2 *In vitro*-Transkription zur Herstellung von radioaktiven RNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiver RNA-Sonden für die Detektion von spezifischen RNA-Sequenzen, die im *Northern Blot*-Verfahren auf eine Membran fixiert wurden, dienten die *Hind*III-linearisierten Plasmide pFK-I₃₈₉neo und pFK- β -Actin als Matrize. In der *in vitro*-Transkription mit dem T3 Maxi Script *In vitro* Transcription Kit wurde statt unmarkiertem UTP radioaktives ³²P-UTP eingesetzt um die Sonden zu markieren. Folgender Ansatz wurde verwendet:

20 μ l-Ansatz

8 μ l *Hind*III-linearisierte Plasmid-DNA (pFK-I₃₈₉neo oder pFK- β -Actin, je 1 μ g DNA)
1 μ l ATP
1 μ l CTP
1 μ l GTP
5 μ l ³²P-UTP (10 μ Ci/ μ l)
2 μ l T3 Transcription Buffer
2 μ l T3 Enzyme Mix

Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde zum Abbau der DNA 1 μ l DNase I hinzugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Aktivität der DNase I wurde 1 μ l einer EDTA-Lösung (0,5 M) hinzugegeben. Die Sonden wurden mit Nuc Away Spin Columns nach Herstellerangaben aufgereinigt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.16 Trizol-Extraktion von RNA-Transkripten

RNA-Transkripte nach DNase I-Behandlung und Gesamt-RNA aus HuH7-Zellen wurden mit Trizol nach Herstellerangaben extrahiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.17 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde mit dem Gene Quant pro gemessen.

2.2.18 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Vor der Elektrophorese von RNA wurden die Gelkammer, der Gelschlitten, der Gelkamm und der Erlenmeyerkolben, in dem die Agarose aufgeköcht wurde, über Nacht in 0,2% SDS eingelegt, um RNasen zu zerstören. Am folgenden Tag wurden diese Gegenstände zweimal mit DEPC-H₂O abgespült. Für ein 1,8%iges Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 75 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und 8 ml Northern Max 10x Denaturing Gel Buffer, der zur Denaturierung der RNA Formaldehyd enthält, hinzugegeben. Als Laufpuffer diente der Northern Max MOPS gel running buffer, der mit DEPC-H₂O auf eine 1x-Konzentration verdünnt worden war. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die RNA-Proben und der RNA Millenium Size Marker mit 3 Vol. Formaldehyd Loading Dye versetzt, 15 min auf 65°C erhitzt und bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Wenn die untersuchten RNA-Proben mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden sollten, wurden sie zusätzlich mit 2,5 μ l einer Ethidiumbromidlösung (1 μ g/ μ l) versetzt. Der Gellauf erfolgte bei 50 V und 4°C für drei Stunden.

2.2.19 Kultivierung von HuH7-Zellen

Die humane Hepatomzelllinie HuH7 wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem CO₂-Gehalt von 5% in einem Cytoperm 2-Brutschrank kultiviert. HuH7-Zellen, die HCV-Replikons mit dem Gen für die Neomycinphosphotransferase enthielten, wurden in DMEM-Selektionsmedium mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml G418 gehalten, um Zellen zu selektieren, in denen die subgenomischen HCV-RNA-Moleküle dauerhaft replizierten.

2.2.20 Interferon- α - und Ribavirin-Behandlung von HuH7-Zellen, die subgenomische HCV-RNA-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten

Zur Behandlung mit Interferon- α (IFN- α) und Ribavirin (RBV) wurden HuH7-Zellen, die replizierende HCV-RNA-Konstrukte enthielten, in Cellstar 96 *well*-Platten kultiviert. Zur Bestimmung der IFN- α -Sensitivität der HCV-Replikons wurde bei 50-60% Konfluenz das DMEM-Medium mit 500 µg/ml G418 gegen DMEM-Medium mit 500 µg/ml G418 und 0,55; 1,67; 5, 15, 45 und 135 IU/ml IFN- α ausgetauscht. Zur Bestimmung der RBV-Sensitivität der HCV-Replikons wurde das DMEM-Medium mit 500 µg/ml G418 erst bei 90-95% Konfluenz gegen DMEM-Medium mit 500 µg/ml G418 und 100, 200, 300 und 400 µM RBV ausgetauscht, da RBV auf konfluente Zellen weniger cytotoxisch wirkt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen wie in 2.2.23 beschrieben lysiert.

2.2.21 TNF- α -Behandlung von naiven HuH7-Zellen und HuH7-Zellen, die subgenomische HCV-RNA-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten

Um die apoptoseinduzierende Wirkung des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) auf naive HuH7-Zellen und HuH7-Zellen, die chimäre Con1/AD78-Replikons mit verschiedenen NS5A-Proteinen enthielten, zu untersuchen, wurden die Zelllinien in 96-*well*-Platten für 48 h mit 40, 5 und 0,6 ng/ml TNF- α behandelt. Gleichzeitig wurde zu allen Zellen Cyclohexidin in einer Konzentration von 10 pg/ml gegeben. Diese translationsinhibierende Komponente verhindert die Synthese von Proteinen, die die Induktion der Apoptose hemmen. Zur Bestimmung der Lebendzellrate ohne TNF- α -Behandlung wurden Zellen nur mit Cyclohexidin inkubiert. Die Bestimmung der Lebendzellrate erfolgte nach 48 h in einem WST-1-Assay.

2.2.22 WST-1-Assay zur Bestimmung der Lebendzellrate

Zur Bestimmung vitaler Zellen wurden zu 100 µl Medium in 96-*well*-Platten 10 µl WST-1-Reagenz gegeben. Lebende, metabolisch aktive Zellen setzen dieses Tetrazoliumsalz unter Entstehung eines gelblich-orangen Farbstoffes um. Die Stärke dieser Reaktion, die direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen ist, wurde in einem Titertek Multiskan Plus-Plattenleser bei 450 nm gemessen.

2.2.23 Lyse von HCV-Replikon-RNA enthaltenden HuH7-Zellen

Um Zelllysate von HCV-Replikon-RNA enthaltenden HuH7-Zellen herzustellen, die in der *Light-Cycler*-Reaktion eingesetzt wurden, wurde das Medium abgenommen, die Platte zweimal mit D-PBS gewaschen und auf Eis gestellt. Je *well* wurden 20 µl des Cell Lysis Buffers hinzugegeben und die Platte wurde 30 min bei 75°C im Wasserbad erhitzt. Dieser Schritt diente sowohl zur Lyse der Zellen als auch zur Inaktivierung von RNasen. Die Platten wurden dann bei -80°C gelagert.

2.2.24 Transfektion von HuH7-Zellen mit transkribierter Replikon-RNA mittels Elektroporation

Zur Vorbereitung auf eine Transfektion mit Replikon-RNA-Transkripten wurden HuH7-Zellen, die ca. 70-90% konfluent waren, mit Trypsin abgelöst und in komplettem DMEM-Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation in der Multifuge 3 R-L für 8 min bei 1.200 rpm wurde das Zellpellet in 20-30 ml PBS gewaschen. Dabei wurden die Zellen mehrmals durch eine 1 ml-Pipettenspitze pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, was für eine erfolgreiche Transfektion essentiell ist. Ein Aliquot von 20 µl wurde entnommen, um die Zellzahl in einer Neubauerkammer zu bestimmen. Nach einer weiteren Zentrifugation der Zellsuspension bei 1.200 rpm für 8 min wurde das Zellpellet in soviel Cytomix aufgenommen, dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Je Transfektion wurden 400 µl der Zellen in Cytomix mit der gewünschten Menge an Replikon-RNA gemischt. Für Transfektionen mit Konstrukten, die das neo-Gen enthielten, waren dies 500 ng der RNA-Transkripte mit 5 µg Gesamt-RNA aus naiven HuH7-Zellen als *carrier*-RNA, die vor dem Abbau durch RNasen schützen sollte. Bei Transfektionen mit Replikons, die das Luciferasegen enthielten, wurden 5 µg der RNA-Transkripte eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte in Gene Pulser Cuvetten (0,4 cm) mit dem Gene Pulser II bei 950 µF und 270 V. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Medium aufgenommen und in Cellstar 6-*well*-Platten ausgesät. Bei Transfektionen von neo-Replikons wurden die gesamten 10 ml Medium mit den Zellen auf eine 6-*well*-Platte verteilt. Nach 24 h wurde mit der Selektion erfolgreich transfizierter Zellen begonnen, indem das DMEM-Medium gegen DMEM-Medium mit 500 µg/ml G418 ausgetauscht wurde. Im Fall von Transfektionen mit Luciferase-Replikons wurden für Messungen der Luciferaseaktivität nach 4 und 24 h 2 ml, für Messungen nach 48 und 72 h 1 ml der 10 ml Zellsuspension in ein 6-*well* ausgesät. Die Werte der Luciferaseaktivität nach 48 und 72 Stunden wurden daher mit 2 multipliziert.

2.2.25 Luciferase-Assay

In Zellen, die mit HCV-Replikonkonstrukten transfiziert sind, die das Luciferasegen enthalten, kommt es bei der Replikation der HCV-RNA auch zur Expression der Luciferase. Dieses Enzym kann ein Substrat umsetzen, das daraufhin mit molekularem Sauerstoff reagiert, wobei Licht ausgesendet wird. Die Intensität des Lichts ist proportional zur Replikation des Luciferase/HCV-Konstruktes.

Um die Luciferaseaktivität zu messen wurden HuH7-Zellen in 6-*well*-Platten zweimal mit 3 ml D-PBS (+ CaCl₂, + MgCl₂) gewaschen. Dann wurden je *well* 200 µl D-PBS (+ CaCl₂, + MgCl₂) und 200 µl Lucite-Luminescence-Substratlösung hinzugegeben und 10 min bei Dunkelheit geschüttelt. Das entstandene Zelllysate wurde mehrmals auf- und abpipettiert und auf vier *wells* à 100 µl einer schwarzen CulturPlate-96F aufgeteilt. Die Messung der Lichtintensität erfolgte im Top Count NXT.

2.2.26 Northern Blot-Verfahren

Der Lauf von RNA-Gelen, die im *Northern Blot*-Verfahren verwendet wurden, erfolgte wie unter 2.18. beschrieben. Nach dem Gellauf wurde das Gel 10 min in 300 ml DEPC-H₂O und anschließend 20 min in 150 ml NaOH-Transferpuffer geschwenkt. Die Hybond N+ Membran wurde 5 min in NaOH-Transferpuffer eingeweicht. Zum Aufbau des Northern Blots wurden zuerst zwei Whatman-Papiere auf den Model 785 Vacuum Blotter gelegt und mit NaOH-Transferpuffer getränkt. Darüber wurde die Membran gelegt und deren Ränder mit einer Schablone abgedeckt. Darauf wurde das Agarosegel gelegt und die Ränder und Geltaschen wurden mit Agarosegel abgedichtet. Zu diesem Aufbau wurden 300 ml NaOH-Transferpuffer gegeben. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte bei 12 bar für 90 min. Zum Fixieren der RNA wurde die Membran 90 min bei 80°C im Mini Oven erhitzt.

2.2.27 Hybridisierung und Waschen der Membranen

HCV-Replikonmoleküle mit Neomycinphosphotransferasegen bzw. β -Aktin-mRNA wurde über die Hybridisierung von spezifischen radioaktiven Sonden nachgewiesen. Die mRNA für β -Aktin steht stellvertretend für die Gesamt-RNA in der analysierten Probe, da das β -Aktin als wichtiges Strukturprotein in allen Stadien des Zellzyklus in ähnlicher Menge exprimiert wird. Die Zahl der HCV-Moleküle konnte so mit der je Bahn aufgetragenen Gesamt-RNA abgeglichen werden.

Die Membran mit der geblotteten RNA wurde zwischen der HCV-RNA und der β -Aktin-mRNA durchgeschnitten. Zur Prähybridisierung wurden die Membranstücke in Hybridisierungsröhren zusammen mit 15 ml auf 68°C vorgewärmtem ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer (HCV) oder Northern Max Prehybridization/Hybridization Buffer (β -Aktin) für eine Stunde bei 68°C im Mini Oven inkubiert. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösungen wurde ein Aliquot der HCV- bzw. β -Aktin-Sonden in 1 ml auf 68°C vorgewärmtem ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer (HCV) oder Northern Max Prehybridization/Hybridization Buffer (β -Aktin) zu den Membranen gegeben und über Nacht bei 68°C inkubiert. Nach der Hybridisierung der radioaktiven Sonden an spezifische Sequenzen auf den Membranen wurde überschüssiges Sondenmaterial abgewaschen. Dazu wurden die Hybridisierungslösungen verworfen und zweimal mit *Northern Blot*-Waschpuffer I für 15 min bei Raumtemperatur und einmal mit 25 ml *Northern Blot*-Waschpuffer II für 60 min bei 60°C gewaschen. Danach wurde in einer Dunkelkammer ein BioMax MS Film für 1-24 Stunden in einer Cronex Cassette Lightning Plus aufgelegt und anschließend mit Eukobrom SW-Papierentwickler und Superfix Plus Schnellfixierer entwickelt.

2.2.28 Herstellung von Proteinextrakten

Zum Nachweis von Proteinen in HuH7-Zellen wurde bei 70-80% Konfluenz der Zellen in einem 6-*well* nach einmaligem Waschen mit D-PBS ein Proteinextrakt hergestellt. Dazu wurden je *well* 100 μ l SDS-Probenpuffer hinzugegeben und das entstandene Lysat 5 min bei 95°C erhitzt.

2.2.29 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurde ein 12%iges Acrylamid/Bisacrylamid-Trenngel gegossen und mit einem 5%igen Acrylamid/Bisacrylamid-Sammelgel überschichtet. Vor dem Auftragen wurden 20 µl der Proben in SDS-Probenpuffer und 10 µl des Größenstandards SeeBlue Plus2 5 min bei 95°C inkubiert. Der Gellauf erfolgte in einer Mini Protean II-Kammer in SDS-Laufpuffer bei 150 V für eine Stunde.

2.2.30 Coomassie Blau-Färbung

Zur Färbung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Polyacrylamidgel eine Stunde in 20 ml Coomassie-Entfärbelösung, dann eine Stunde in 5 ml Coomassie-Färbelösung und schließlich wieder eine Stunde in 20 ml Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt.

2.2.31 Das Western Blot-Verfahren

Zum spezifischen Nachweis des HCV-Proteins NS5A wurden zunächst die gesamten in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im *Western Blot*-Verfahren auf eine Protran-Membran übertragen. Dieses *Blotting* erfolgte in *Western Blot*-Transferpuffer in einer Mini Protean II-Kammer bei 100 V für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in Blockierungspuffer leicht geschüttelt. Die Bindung der NS5A-spezifischen Antikörper an das NS5A-Protein erfolgte während einer ÜN-Inkubation der Membran in einer 1:1000-Verdünnung von polyklonalem α-NS5A-Serum in Blockierungspuffer. Nach zweimaligem Waschen der Membran in 20 ml D-PBS wurde zum Nachweis der gebundenen NS5A-spezifischen Antikörper Protein A/HRP-Konjugat in einer 1:1000-Verdünnung in D-PBS hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde dreimal 10 min mit *Western Blot*-Waschpuffer und einmal 10 min mit D-PBS gewaschen. Dann wurden 10 mg DAB in 10 ml D-PBS-Puffer mit 10 µl H₂O₂ versetzt und zu der Membran gegeben. Die Peroxidase setzte das Substrat DAB um und bildete ein braunes Endprodukt. Die Farbentwicklung wurde mit dH₂O abgestoppt.

2.2.32 Quantitative *real-time* RT-PCR

2.2.32.1 Quantitative RT-PCR zum Nachweis von HCV-RNA

Zum quantitativen Nachweis von HCV-RNA-Molekülen in Zelllysaten diente die quantitative *real-time* RT-PCR. Diese wurde am LightCycler-Instrument in Light Cycler Capillaries (20 µl) durchgeführt. Für die Reaktionsansätze wurde der Light Cycler RNA Amplification Hybridization Probes Kit in Kombination mit HCV-spezifischen Primern und Sonden verwendet. Im Kit enthalten ist die Tth-Polymerase mit RNA-abhängiger Reverse Transkriptions (RT)-Aktivität und DNA-abhängiger Polymerase-Aktivität. So konnten RT und PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die beiden HCV-spezifischen Primer p47LC und p81LC initiieren durch ihre Bindung in der 5'-NTR der HCV-RNA die Amplifikation eines 124 Nukleotide langen Fragments. Während den Denaturierungsschritten der PCR binden innerhalb dieses Abschnittes mit nur einem Nukleotid Abstand voneinander die Hybridisierungssonden hFL (HCV sensor) und hLC (HCV anchor). Die Sonde hFL ist am 3'-Ende mit Fluorescein, die Sonde hLC am 5'-Ende mit dem LC-Red Fluorophor

640 markiert. Während der Hybridisierung der Sonden werden die beiden Fluorophore in räumliche Nähe zueinander gebracht, so dass es zu einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) kommt. Nach Anregung durch eine Lichtquelle des Light Cyclers wird Fluoreszenz emittiert, die proportional zu den amplifizierten HCV-Fragmenten zunimmt. Die Anzahl der in der PCR entstandenen HCV-Moleküle ist wiederum abhängig von der Menge der HCV-RNA in der analysierten Probe, die im RT-Schritt revers transkribiert wurde.

Als Standard dienten definierte Kopienzahlen (10^9 bis 10^6) eines RNA-Transkripts, das einen Teil der *core*-Region und die gesamte 5'-NTR-Region des HCV-Genotyps 1b umfasst. Je Reaktion wurden 5 μ l Zellysat in Cell Lysis Buffer eingesetzt. Folgende Reaktionsansätze und PCR-Programme wurden verwendet.

20 μ l-Ansatz:

0,8 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
4,0 μ l	5x Reaction Mix
1,0 μ l	Primer p47LC (10 pmol/ μ l)
1,0 μ l	Primer p81LC (10 pmol/ μ l)
0,5 μ l	HCV sensor hFL (3 pmol/ μ l)
0,5 μ l	HCV anchor hLC (3 pmol/ μ l)
0,4 μ l	Enzyme Mix
5,0 μ l	Zellysat in Cell Lysis Buffer bzw. Standard
6,8 μ l	H ₂ O

RT-PCR-Programm zum quantitativen Nachweis von HCV-RNA-Replikons

Reverse Transkription	55°C	30 min
Denaturierung	95°C	30 sec
PCR (45 Zyklen)	95°C	5 sec
	52°C	15 sec
	72°C	15 sec
Kühlung	40°C	30 sec

2.2.32.2 Quantitative RT-PCR zum Nachweis von h-G6PDH-mRNA

Um die in quantitativen *real-time* PCR-Reaktionen eingesetzte Menge der Gesamt-RNA zu messen, wurde mit 5 μ l Zellysat aus demselben *well* eine weitere quantitative RT-PCR durchgeführt, in der die Zahl der mRNA-Moleküle für die humane Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (h-G6PDH) bestimmt wurde. Dieses Enzym steht stellvertretend für die Gesamt-RNA, da es als wichtiges Enzym des Stoffwechsels in allen Stadien des Zellzyklus in gleicher Menge exprimiert wird. Die Zahl der HCV-Moleküle konnte so mit der Menge der je Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA abgeglichen werden. Für diese quantitative RT-PCR wurde das LightCycler-h-G6PDH Housekeeping Gene Set verwendet, in dem h-G6PDH-spezifische Primer und Hybridisierungssonden im Detektionsmix und ein h-G6PDH-Standard mit 10^6 bis 10^2 Kopien/ μ l enthalten waren. Aus dem Light Cycler RNA Amplification Hybridization Probes Kit wurden der Reaction Mix und der Enzyme Mix verwendet. Folgende Reaktionsansätze und PCR-Programme wurden verwendet.

20 µl-Ansatz:

0,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)
4,0 µl	5x Reaction Mix
2,0 µl	10x Detection Mix
0,4 µl	Enzyme Mix
5,0 µl	Zelllysat in Cell Lysis Buffer bzw. Standard
7,8 µl	H ₂ O

RT-PCR-Programm zum quantitativen Nachweis von h-G6PDH-mRNA

Reverse Transkription	55°C	30 min
Denaturierung	95°C	30 sec
PCR (45 Zyklen)	95°C	5 sec
	55°C	15 sec
	72°C	15 sec
Kühlung	40°C	30 sec

2.2.32.3 Quantitative RT-PCR zum Nachweis von IFNAR 1- und IFNAR 2-mRNA

Zum quantitativen Nachweis der mRNAs der beiden Ketten des Typ I-Interferon-Rezeptors, IFNAR 1 und IFNAR 2, wurden für die jeweiligen Gene spezifische Primerpaare (QuantiTect Primer Assay Hs-IFNAR1-SG 1, QuantiTect Primer Assay Hs-IFNAR2-SG 1) in Kombination mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit verwendet. Der im Reaktionsmix des Kits enthaltene Farbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA und emittiert dabei Fluoreszenz. Die gemessene Intensität ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA und zur Zahl der mRNA-Moleküle in der Probe. Folgende Reaktionsansätze und PCR-Programme wurden verwendet.

20 µl-Ansatz

10,0 µl	2x QuantiTect SYBR Green
0,2 µl	QuantiTect RT Mix
2,0 µl	QuantiTect Primer Assays Hs-IFNAR1-SG 1 oder Hs-IFNAR2-SG 1
5,0 µl	Zelllysat in Cell Lysis Buffer
2,8 µl	H ₂ O

RT-PCR-Programm zum quantitativen Nachweis von IFNAR 1- und IFNAR 2-mRNA

Reverse Transkription	52°C	30 min
Denaturierung	95°C	15 min
PCR (43 Zyklen)	96°C	20 sec
	53°C	25 sec
	72°C	40 sec
Kühlung	38°C	1 min

2.2.33 Sequenzspezifische Mutagenese

Sequenzspezifische Mutagenesen wurden mit dem QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden zwei komplementäre Oligonukleotide mit der erwünschten Mutation in der Mitte von nicht modifizierten Sequenzabschnitten synthetisiert und HPLC-gereinigt. Die zu mutierenden Plasmide mit den eingeführten Mutationen, den verwendeten Oligonukleotiden und den Namen der resultierenden Plasmide und Replikons sind in Tab. 2.6 angegeben. Folgende Reaktionsansätze und PCR-Programme wurden verwendet.

50 µl-Ansatz:

5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	Plasmid-DNA (10 ng/µl)
1 µl	dNTP-Mix
3 µl	QuikSolution
1 µl	<i>Pfu Ultra High Fidelity</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)
40 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	1 min
PCR (18 Zyklen)	95°C	50 sec
	60°C	50 sec
	68°C	11 min
Elongation	68°C	7 min

Tab. 2.6 Die zu mutierenden Plasmide mit den eingeführten Mutationen, den verwendeten Oligonukleotiden und den Namen der resultierenden Plasmiden. Die Aminosäurepositionen der Mutationen beziehen sich auf die Sequenz des Con1-Isolats mit der NCBI-Zugriffsnummer AJ238799.

Ausgangsplasmid	Mutation	Oligonukleotide	Resultierende Plasmide und Replikons
Con1 (pFK-I ₃₄₁ PI-luc/NS3-3'/ET)	2382A	SV320/SV321	Con1/2382A
Con1	2191D	SV351/SV352	Con1/2191D
Con1	2370G	SV344/SV345	Con1/2370G
Con1	2082P	SV413/SV414	Con1/2082P
Con1	2368P	SV342/SV343	Con1/2368P
Con1	2336T	SV353/SV354	Con1/2336T
Con1/2191D	2370G	SV344/SV345	Con1/2191D/2370G
Con1/AD78-R3	2382V	SV322/SV323	Con1/AD78/R32382V
Con1/AD78-NR1	2191A	SV324/SV325	Con1/AD78-NR1/2191A
Con1/AD78-NR1/2191A	2370D	SV326/SV327	Con1/AD78-NR1/2191A/2370D
Con1/AD78-R4	2082L	SV433/SV434	Con1/AD78-R4/2082L

2.2.34 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden vom zentralen DNA-Sequenzierservice der Medizinische Fakultät am Universitätsklinikum Essen mit dem ABI Prism® 3100 Sequenzierer (Applied Biosystems) durchgeführt. Die sequenzierten Sequenzabschnitte sind mit den verwendeten Primern in Tabelle 2.7 angegeben.

Tab. 2.7 Sequenzabschnitte mit den zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotiden.

Sequenzabschnitt	Primer
IFNAR 1	SV464, SV465
IFNAR 2	SV484, SV485
NS5A in pCR 2.1 TOPO	M13 Reverse Primer, M13 Forward (-20) Primer
NS5A in pFK-I-Replikonkonstrukten	HCV6311seq, SV145, HCV7216seq
Con1/2382A	SV87
Con1/2191D	SV110
Con1/2370G	SV87
Con1/2082P	HCV6311seq
Con1/2368P	SV87
Con1/2336T	SV87
Con1/2191D/2370G	SV87
Con1/AD78/R32382V	SV87
Con1/AD78-NR1/2191A	SV110
Con1/AD78-NR1/2191A/2370D	SV87
Con1/AD78-R4/2082L	HCV6311seq

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von NS5A-Fragmenten des HCV-Stammes AD78 in die Plasmide pFK₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET

Untersuchungen natürlicher HCV-Isolate haben gezeigt, dass das HCV-Protein NS5A den Erfolg einer IFN- α /Ribavirin-Therapie beeinflussen kann. Wie NS5A zu einer Resistenz gegen die Therapie beiträgt, ist jedoch auf molekularbiologischer Ebene noch nicht aufgeklärt. Für die vorliegende Arbeit standen HCV-Isolate aus acht Patienten zur Verfügung, die mit demselben HCV-Stamm AD78 infiziert waren und zur Hälfte *Responder*, zur anderen Hälfte *Nonresponder* waren. Die NS5A-Fragmente dieser Isolate wurden in subgenomische HCV-Replikons kloniert, um in Zellkultur den Einfluß des NS5A auf die IFN-Resistenz und andere Eigenschaften des Proteins zu analysieren.

DNA-Fragmente, die die gesamte NS5A-Region abdeckten, wurden mittels RT-PCR und anschließender *nested* PCR aus den Patientenseren amplifiziert (Abb. 3.1). Fragmente der erwarteten Größe von 1432 bp wurden aus einem Agarosegel eluiert. Nach Adenylierung der 3'-Enden dieser PCR-Fragmente wurden sie mit dem Vektor pCR 2.1 TOPO ligiert. Mit den erhaltenen Konstrukten wurden *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert. Nach ÜN-Kultur wurden die Plasmide aus diesen Zellen präpariert und sequenziert, um geeignete Schnittstellen zur Klonierung der NS5A-Fragmente aus AD78-Isolaten in die Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET zu identifizieren. Die Endonukleasen sollten nur einmal in der Nähe der 3'- beziehungsweise der 5'-Enden der NS5A-kodierenden Abschnitte schneiden und die NS5A-Fragmente und Plasmide ansonsten unberührt lassen. In der 5'-Region der NS5A-Nukleotidsequenz der Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET befanden sich die Schnittstellen der Endonukleasen *MluI* (271 bp *downstream* des 5'-NS5A-Anfangs) und *EcoRI* (441 bp *downstream* des 5'-NS5A-Anfangs), die diesen Anforderungen entsprachen (Abb. 8.1). Durch Auswahl dieser Schnittstellen zur Klonierung wurde ein kurzer Abschnitt des Aminoterminus der NS5A-Regionen in den resultierenden Con1/AD78-Konstrukten weiterhin von Con1-Sequenzen und nicht von AD78-Sequenzen kodiert. Die Alternative, weit *upstream* der NS5A-Region zu schneiden, hätte jedoch zur Klonierung von NS4B-Abschnitten auf Basis des AD78-Stammes geführt und mit den erhaltenen Replikons erzielte Ergebnisse hätten nicht eindeutig den NS5A-Proteinen des HCV-Stammes AD78 zugeschrieben werden können. Die *MluI*-Schnittstelle war in sechs von acht AD78-PCR-Fragmenten (R2, R3, R4, NR2, NR3, und NR4) vorhanden und konnte verwendet werden. Da die Sequenzen der Isolate R1 und NR1 die *MluI*-Schnittstelle nicht aufwiesen, wurde hier die 170 nt weiter *downstream* liegende *EcoRI*-Schnittstelle zur Klonierung in entsprechend geschnittene Plasmide verwendet.

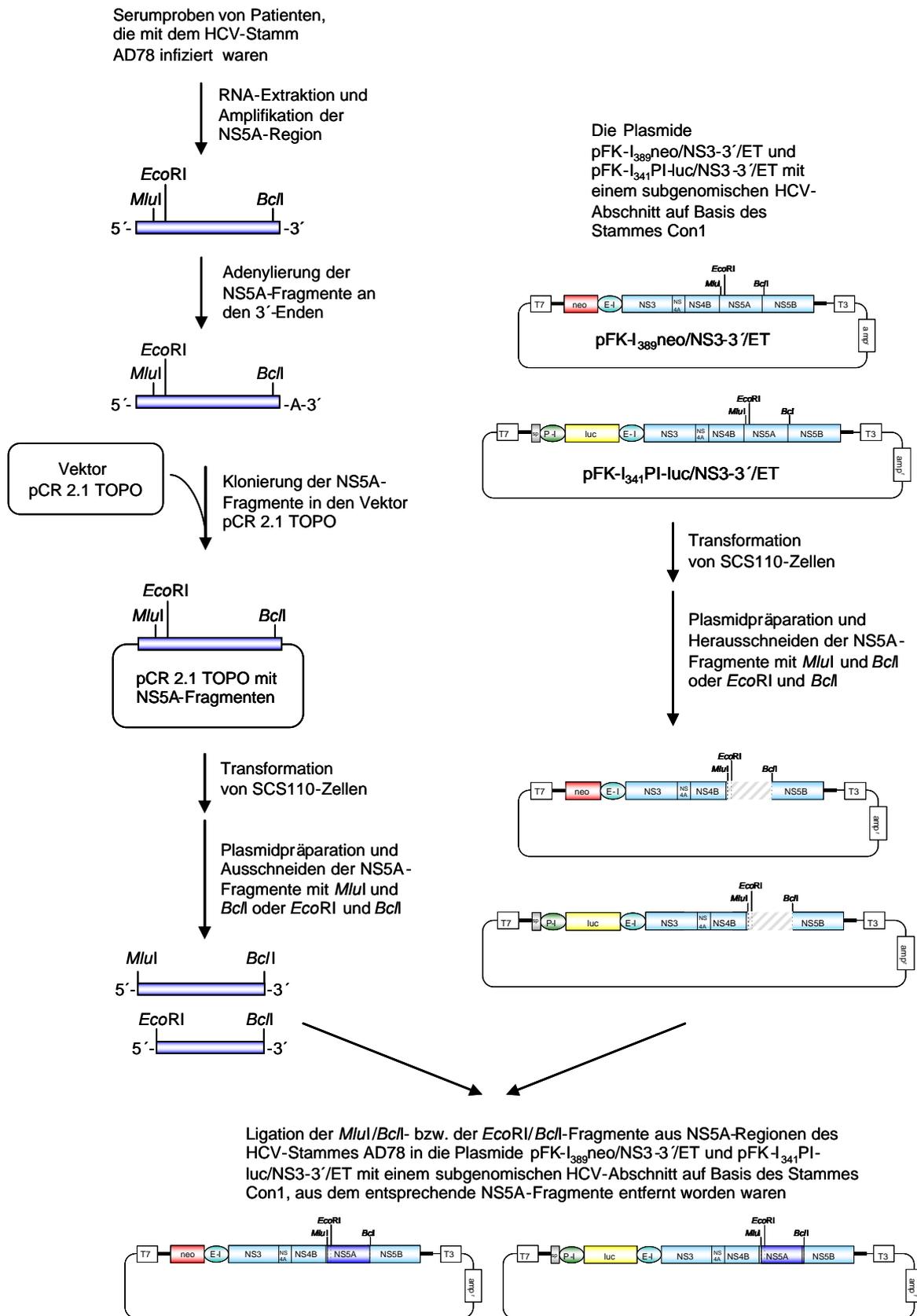


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Klonierung von NS5A-Fragmenten aus HCV-AD78-Isolaten in die Plasmide pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, die einen subgenomischen HCV-Abschnitt auf Basis des Stammes Con1 enthalten.

Nur 29 bp *downstream* des 3'-Endes der NS5A-Region befand sich eine *BclI*-Schnittstelle in den Plasmiden pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, die gleichzeitig in allen acht PCR-Fragmenten des HCV-Stamms AD78 vorkam. Dadurch wurden zwar auch 11 Aminosäuren des NS5B-Proteins aus AD78-Isolaten in die auf Con1-basierenden Plasmide eingebracht, allerdings kam es nur im Fall der Sequenz des Isolates R1 zum Austausch einer Aminosäure (Serin statt Threonin an Position 2424) im Vergleich zur Con1-Sequenz (Abb. 3.2).

Die Endonuklease *BclI* ist nicht in der Lage, DNA-Moleküle mit methylierten Adenosinresten zu schneiden. Daher wurden SCS110-Zellen mit den Plasmiden pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET sowie den pCR 2.1 TOPO-Vektoren, die NS5A-Abschnitte der AD78-Isolate enthielten, transformiert. Diese Zellen sind nicht in der Lage DNA an Adenosinresten zu methylieren. Nach Präparation der Plasmide aus ÜN-Kulturen dieser Transformanden wurden die *MluI/BclI*- und *EcoRI/BclI*-Fragmente aus den Con1-Plasmiden pFK-I₃₈₉neo/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET ausgeschnitten. Nach Auftrennung auf einem Agarosegel wurden die linearisierten Plasmide ohne *MluI/BclI*- und *EcoRI/BclI*-Fragmente ausgeschnitten und eluiert. Außerdem wurden die AD78-NS5A-Fragmente mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *BclI* (R2, R3, R4, NR2, NR3, und NR4) oder *EcoRI* und *BclI* (R1 und NR1) aus den pCR 2.1 TOPO-Vektoren ausgeschnitten und aufgereinigt. Nun wurden die Fragmente in die entsprechend geschnittenen Plasmide ligiert. Die resultierenden chimären Plasmide auf Basis der Plasmide pFKI₃₈₉/NS3-3'/ET und pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET (HCV-Stamm Con1), in denen beinahe die komplette NS5A-Sequenz gegen die NS5A-Sequenz aus Virusisolaten der Patienten R1-4 und NR1-4 ausgetauscht worden waren, wurden wie folgt genannt:

- Con1/AD78-R1, -R2, -R3 oder -R4
- Con1/AD78-NR1, -NR2, -NR3 oder -NR4

Ob Plasmide mit dem Gen für die Neomycinphosphotransferase oder dem Luciferasegen verwendet wurden, wird im Folgenden nicht angegeben, da es sich aus den jeweiligen Versuchen ableitet.

Zur Linearisierung der Plasmide und zur späteren *in vitro*-Transkription von Replikon-RNA wurden große Mengen Plasmid-DNA benötigt. Um diese herzustellen, wurden *E. coli* Max Efficiency DH5 α -Zellen mit den hergestellten Con1/AD78-Konstrukten transformiert. Nach Präparation der Plasmide wurden die NS5A-Abschnitte einschließlich der Restriktionstellen, die zur Ligation verwendet wurden, sequenziert. Alle Fragmente waren korrekt in die Plasmide eingebracht worden. Die NS5A-Sequenzen, die aus den AD78-Isolaten erhalten wurden, unterschieden sich in mindestens 21 Aminosäuren von der Con1-Sequenz, jedoch trat keine Aminosäure ausschließlich in der Gruppe der IFN-Responder oder der Nonresponder auf (Abb. 3.2).

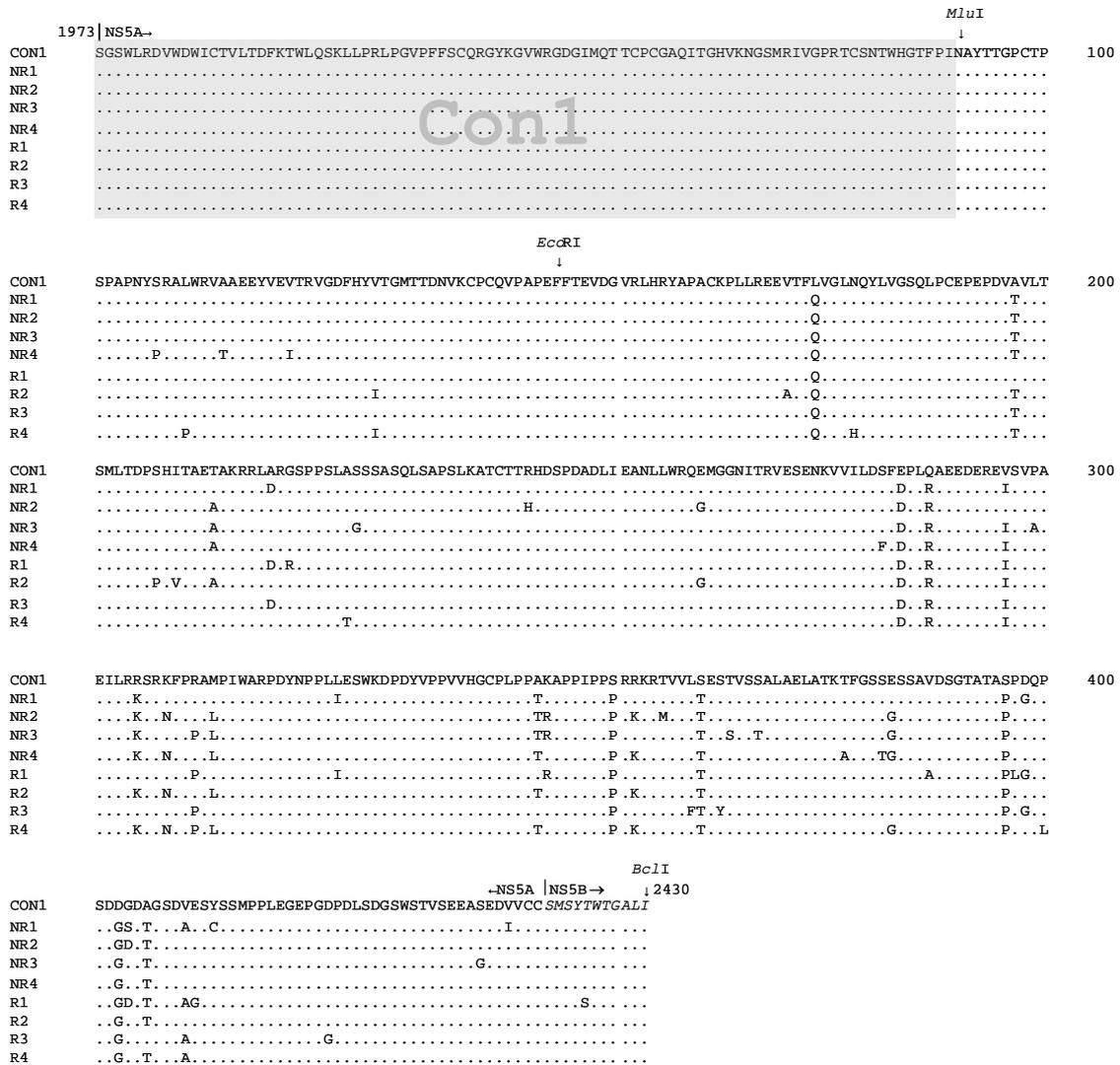


Abb. 3.2 Alignment der Aminosäuresequenzen der NS5A-Regionen und Fragmenten der NS5B-Regionen des Con1-Replikons und der acht HCV-Isolate des Stamms AD78 (R1-4, NR1-4), die in das Con1-Replikon kloniert wurden. Die Aminosäurepositionen 1973 und 2430 bezogen auf das Con1-Isolat mit der NCBI-Zugriffsnummer AJ238799 sind am Anfang und am Ende der Sequenz angegeben. Der grau schattierte Bereich besteht auch bei den AD78-Sequenzen aus der ursprünglichen Con1-Sequenz. Die für die Klonierung benutzten Restriktionschnittstellen sind mit einem Pfeil und den zugehörigen Endonukleasen angegeben.

3.2 Linearisierung und *in vitro*-Transkription von HCV-Replikon-RNA

Um eine *in vitro*-Transkription von Replikon-RNA zu ermöglichen wurden die chimären Con1/AD78-Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *Scal* geschnitten. Die Linearisierung mit *PvuI* führte zu einem Überhang von ca. 700 bp am 3'-Ende der HCV-Sequenz in den Plasmiden. Das Enzym *Scal* schneidet exakt am Ende der 3'-NTR des HCV im Plasmid, so dass ein glattes DNA-Ende ohne überhängende Nukleotide entsteht, was für eine effiziente Replikation des HCV essentiell ist. Das so abgespaltene DNA-Fragment von ca. 700 bp Länge zwischen der *PvuI*- und der *Scal*-Schnittstelle enthält eine zweite *Scal*-Schnittstelle und wird durch *Scal* in zwei Fragmente von 150 und 550 bp geschnitten (Abb. 2.1). Diese Eigenschaft wurde genutzt um eine vollständige Restriktion der Enden der 3'-NTR des HCV zu überprüfen. Nur wenn nach Auftrennung in einem Agarosegel nach der Restriktion mit *Scal* kein 700 bp-Fragment, sondern nur dessen Spaltprodukte von 150 und 550 bp zu erkennen waren, war die Restriktion vollständig und auch die Enden der 3'-NTRs aller Plasmide waren korrekt geschnitten (Abb. 3.3).

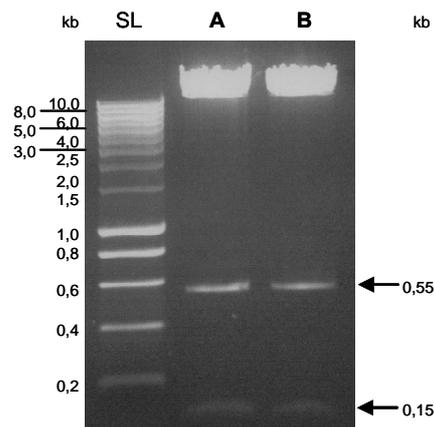


Abb. 3.3 Agarosegelbild von jeweils 2 µg Con1/AD78-Plasmid-DNA mit neo- (A) oder luc-Gen (B) nach Restriktion mit *PvuI* und *Scal*. Beispielhaft sind linearisierte DNA-Moleküle der Con1/AD78-R1-Konstrukte dargestellt. SL: Smart ladder.

Mit der linearisierten Plasmid-DNA als Matrize wurden in einer *in vitro*-Transkription Replikon-RNAs hergestellt. Die RNA-Transkripte wurden zur Kontrolle auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.4). Wie erwartet waren Replikonkonstrukte mit neo-Gen ca. 8 kb groß. Replikons mit luc-Gen waren ca. 8,8 kb groß, da sie die zusätzlich eingeführte Poliovirus-IRES enthielten und das Luciferasegen länger als das neo-Gen ist.

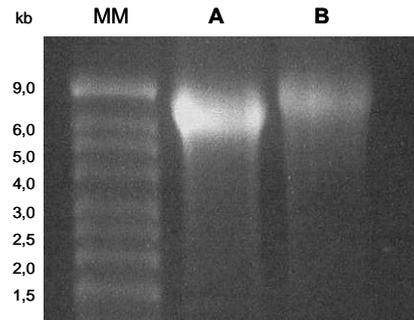


Abb. 3.4 Agarosegelbild von je 5 µg *in vitro*-transkribierter HCV-Replikon-RNA mit neo- (A) oder luc-Gen (B). Beispielhaft sind die beiden RNA-Transkripte der Con1/AD78-R1-Konstrukte dargestellt. MM: RNA Millennium Marker

3.3 Transfektion von HuH7-Zellen mit HCV-Replikon-RNAs, die das Neomycinphosphotransferasegen enthielten

HuH7-Zellen wurden mittels Elektroporation mit *in vitro*-transkribierten HCV-RNA-Replikons, die das neo-Gen enthielten, transfiziert. Durch Zugabe des DMEM-Selektionsmediums mit 500 µg/ml des Antibiotikums G418 nach 24 h wurden Zellen, die nicht transfiziert worden waren oder die Replikation nicht unterstützten, ausselektiert und starben ab. Nur solche Zellen, in denen eine effiziente Replikation der subgenomischen HCV-Moleküle und somit eine Expression der Neomycinphosphotransferase, die Resistenz gegen G418 vermittelt, stattfand, waren in der Lage, zu überleben. Sechs von acht chimären Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 und -NR3) replizierten und Kolonien der HuH7-Zellen konnten sich unter G418-Selektion bilden (Abb. 3.5). Mit den Replikons Con1/AD78-R4 und Con1/AD78-NR4 wurde auch nach wiederholten Transfektionsversuchen keine Koloniebildung beobachtet, woraus geschlossen wurde, dass diese RNA-Moleküle nicht zur autonomen Replikation in HuH7-Zellen fähig waren.

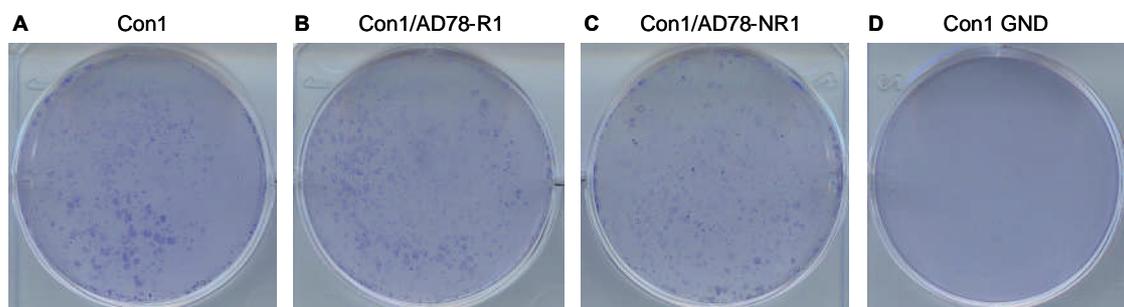


Abb. 3.5 Coomassie Blue-gefärbte 6-wells mit Kolonien von HuH7-Zellen nach Transfektion mit subgenomischen Replikons und Selektion mit 500 µg/ml G418 für 4 Wochen. Beispielhaft sind Platten mit Con1- (A), Con1/AD78-R1- (B) und Con1/AD78-NR1- (C) transfizierten Zellen nach gezeigt. Als Negativkontrolle wurden Huh7-Zellen mit Con1-Replikon-RNA, die das GND-Motiv in der NS5B-RNA-Polymerase enthält und dadurch replikationsunfähig ist, transfiziert (D).

3.4 Nachweis von HCV-Replikon-RNA in transfizierten HuH7-Zellen

Nach der Selektion mit G418 von HuH7-Zellen, in denen die HCV-Replikons replizierten, wurde die HCV-RNA in den Zellen mittels Hybridisierung von spezifischen RNA-Sonden im *Northern Blot*-Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon oder chimäre Con1/AD78-Replikons enthielten, auf einem RNA-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurden mit den radioaktiven Sonden für das Neomycinphosphotransferasegen und die β -Actin-mRNA die jeweilige Ziel-RNA auf den Membranen detektiert. Als Standard dienten definierte Kopienzahlen des HCV-Replikons. Die HCV-RNA war bis zu einer Zahl von 10^7 Molekülen noch nachweisbar (Abb. 3.6). Die Menge an HCV-RNA Molekülen in den transfizierten Zelllinien lag zwischen 1 und 5×10^8 Molekülen in 10 µg Gesamt-RNA. Vergleicht man die Menge an HCV-RNA von Con1/AD78-R2- und Con1/AD78-NR1, so bestehen deutliche Unterschiede, obwohl eine fast gleiche Menge an Gesamt-RNA aufgetragen wurde.

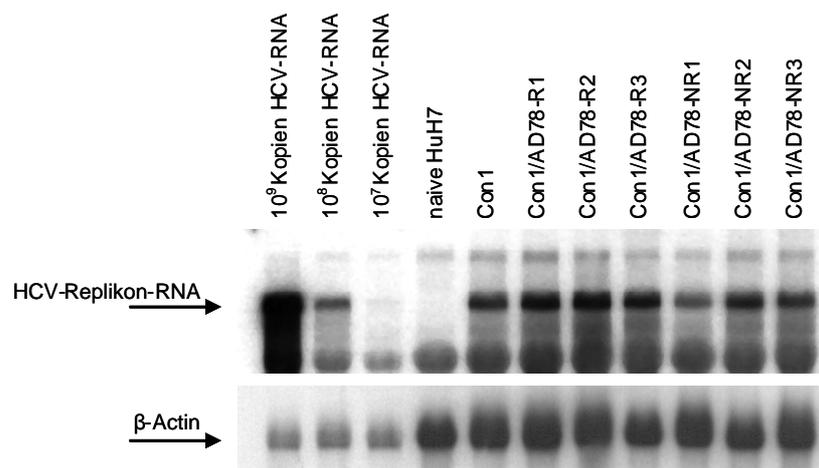


Abb. 3.6 Nachweis von HCV-Replikon-RNA in jeweils 10 µg Gesamt-RNA-Extrakten aus HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon (Con1) oder chimäre Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 oder -NR3) enthielten. Als Negativkontrolle wurde Gesamt-RNA aus naiven HuH7-Zellen, die keine HCV-RNA enthielten, aufgetragen. Die β -Actin-RNA diente als Kontrolle zur Normalisierung für die Menge aufgetragener Gesamt-RNA. Als Standard wurden 10^9 , 10^8 und 10^7 Moleküle des *in vitro*-transkribierten HCV-Con1-Replikons verwendet.

3.5 Nachweis von viralem NS5A-Protein in transfizierten HuH7-Zellen

Auch das nichtstrukturelle HCV-Protein NS5A sollte in den HuH7-Zellen, in denen die chimären HCV-Replikons replizierten, nachgewiesen werden. Dazu wurden Proteinextrakte hergestellt und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die gesamten in der Probe enthaltenen Proteine mit *Coomassie Blue* gefärbt. In allen Proben wurde eine ausreichende Menge Gesamtprotein aufgetrennt (Abb. 3.7). Eine deutliche Bande bei 56 oder 58 kDa, die dem NS5A-Protein zugeordnet werden konnte, war nicht sichtbar.

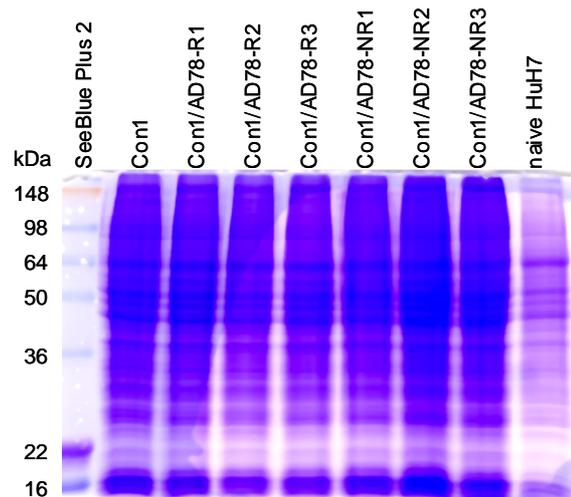


Abb. 3.7 Coomassie Blau-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, auf dem jeweils 20 μ l der Gesamteinextrakte aus HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon (Con1), chimäre Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 oder -NR3) oder keine HCV-RNA (naive HuH7-Zellen) enthielten, aufgetrennt wurden. Als Größenstandard wurden 10 μ l des SeeBlue Plus 2 Markers aufgetrennt.

Daher wurde dieses Protein im *Western Blot*-Verfahren spezifisch nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente dabei Gesamtprotein aus HuH7-Zellen, die das ursprüngliche Con1-Replikon enthielten. Das Con1-NS5A-Protein dieser Zellen wies ein leicht größeres Molekulargewicht von 58 kDa im Vergleich zu den Proteinen aus Zellen, die mit chimären Con1/AD78-Replikons transfiziert waren, auf (Abb. 3.8). In Letzteren hatten die NS5A-Proteine, die alle bis auf einen kurzen N-terminalen Abschnitt von HCV-Sequenzen des Stammes AD78 kodiert wurden, ein Molekulargewicht von nur 56 kDa. Die Negativkontrolle mit Proteinextrakten aus naiven HuH7-Zellen zeigte keine spezifischen NS5A-Bande.

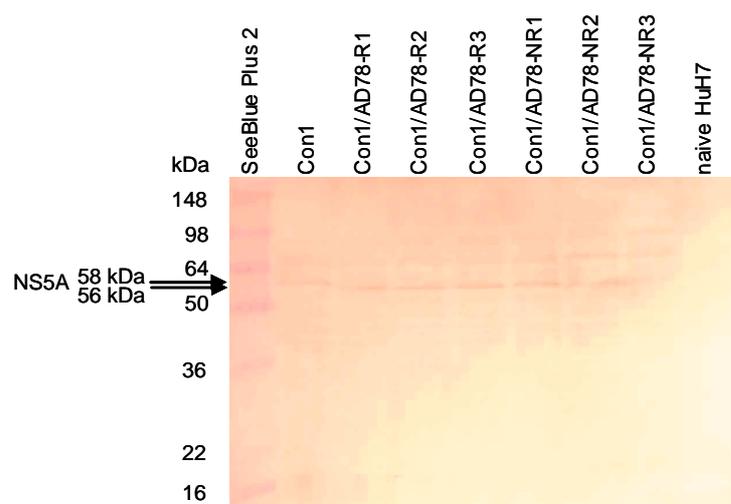


Abb. 3.8 Detektion von NS5A-Protein mit α -NS5A-Antiserum im *Western Blot*-Verfahren. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ l Proteinextrakte aus HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon (Con1) oder chimäre Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 oder -NR3) enthielten. Als Negativkontrolle wurde 20 μ l Proteinextrakt aus naiven HuH7-Zellen, die keine HCV-RNA enthielten, aufgetragen.

3.6 Sequenzbestimmung der NS5A-Region in Replikon-transfizierten HuH7-Zellen nach fünfmonatiger Kultivierung

Nach fünfmonatiger Kultivierung bei ständiger Selektion mit G418 wurde überprüft, ob die Sequenzen der NS5A-Regionen von HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon oder die chimären Con1/AD78-Replikons Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 und -NR3 enthielten, Veränderungen gegenüber den ursprünglich in die Zellen eingebrachten Sequenzen aufwiesen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und DNA-Fragmente, die den NS5A-kodierenden Bereich abdeckten, wurden durch RT-PCR und anschließender *nested* PCR amplifiziert. Die Sequenzierung dieser Fragmente ergab, dass die NS5A-Sequenzen aller Replikons über einen Zeitraum von fünf Monaten stabil geblieben und keine Mutationen aufgetreten waren.

3.7 Untersuchung der Interferon- α -Resistenz der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons

Nach erfolgreicher Etablierung von Zelllinien, die die Replikation der chimären Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 und -NR3) dauerhaft unterstützten, wurde untersucht, ob die verschiedenen NS5A-Varianten aus *Responder*- und *Nonresponder*-Isolaten einen Einfluss auf die Resistenz der Replikation gegen IFN- α hatten.

Dazu wurden transfizierten HuH7-Zellen für 48 h mit IFN- α -Konzentrationen von 0 bis 135 IU/ml behandelt. Danach wurden Zelllysate hergestellt und die Menge der darin enthaltenen Replikonmoleküle wurde durch quantitative *real-time* RT-PCR bestimmt. Außerdem wurde in einem weiteren Aliquot desselben Lysats die Zahl der mRNA-Moleküle für die humane Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (h-G6PDH) bestimmt, die stellvertretend für die Gesamt-RNA steht. Anhand dieser Werte wurde die Menge der Replikonmoleküle mit der Menge der je RT-PCR-Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA abgeglichen.

Bei allen Replikons wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition der Replikation durch IFN- α beobachtet (Abb. 3.9) und die 50%-inhibierenden Konzentrationen (IC_{50}) wurden bestimmt (Tab. 3.1). Die Kinetik der Abnahme der Replikation mit zunehmender IFN-Konzentration war bei allen Replikons vergleichbar und auch die mittleren IC_{50} -Werte lagen nach einer Dreifachbestimmung mit Werten zwischen 5,6 und 14,9 IU/ml IFN- α dicht beieinander.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Werte zu prüfen, wurde am Beispiel der Zelllinie mit dem Replikon Con1/AD78-NR2 nach weiteren drei Wochen Kultivierung erneut die IFN- α -Sensitivität der HCV-RNA bestimmt. Der IC_{50} -Wert lag nun bei $14,3 \pm 3,2$ IU/ml IFN- α und damit 2,6-mal höher als bei der ersten Bestimmung mit dem gleichen Replikon. Daraus wurde geschlossen, dass Abweichungen zwischen IC_{50} -Werten, die kleiner als dreifach waren, keinen signifikanten Unterschied darstellten, sondern lediglich die normale Varianz zwischen zwei unabhängigen Experimenten repräsentierten.

Folglich waren die beobachteten Abweichungen zwischen den IC_{50} -Werten für die Replikons mit NS5A-Sequenzen des HCV-Stamms AD78 von IFN-*Respondern* und solchen mit Sequenzen von *Nonrespondern* nicht signifikant. Auch der IC_{50} -Wert für das Kontrollreplikon, das ausschließlich Con1-Sequenzen enthielt, wies keinen wesentlichen Unterschied zu den Werten für die chimären Con1/AD78-Konstrukte auf.

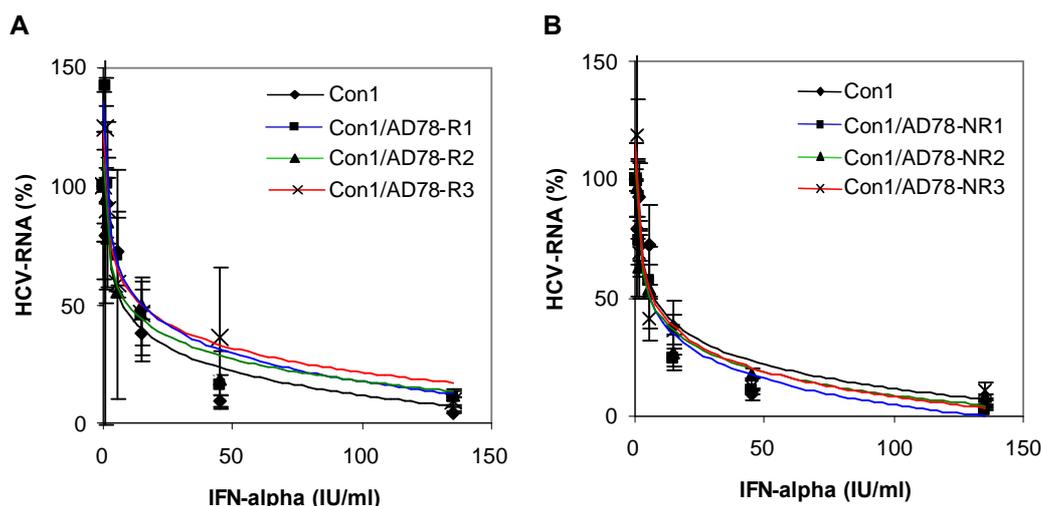


Abb. 3.9 Hemmung der HCV-Replikation durch IFN- α in HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon (Con1) oder chimäre Con1/AD78-Replikons (A: Con1/AD78-R1, -R2, -R3; B: Con1/AD78-NR1, -NR2 oder -NR3) enthielten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung dar.

Tab. 3.1 Die IC_{50} -Werte von IFN- α für HCV-Replikon-RNA in HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon oder chimäre Con1/AD78-Replikons enthielten. Die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung sind mit Standardabweichungen angegeben.

Replikon	Con1	Con1/AD78-R1	Con1/AD78-R2	Con1/AD78-R3	Con1/AD78-NR1	Con1/AD78-NR2	Con1/AD78-NR3
IC_{50} (IU/ml)	$7,4 \pm 2,7$	$14,9 \pm 2,9$	$9,5 \pm 4,1$	$14,4 \pm 8,0$	$5,7 \pm 2,5$	$5,6 \pm 4,8$	$6,7 \pm 1,3$

3.8 Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit niedrigen Interferon- α -Konzentrationen zur Generierung resistenter Varianten der Con1/AD78-HCV-Replikons

Ein Teil der Arbeit mit den dauerhaft transfizierten HuH7-Zellen beschäftigte sich mit der Frage, ob durch Langzeitbehandlung mit IFN- α oder Ribavirin eine Induktion resistenter Mutanten der Replikons erreicht werden konnte. Mit Hilfe dieser neuartigen Varianten könnten Merkmale der HCV-RNA identifiziert werden, die zur Resistenz gegen die kombinierte Therapie mit IFN- α und Ribavirin beitragen.

Im ersten Teil der Langzeitbehandlungs-Experimente wurden HuH7-Zellen, die das Replikon Con1/AD78-NR3 enthielten, bei einer Konzentration von 1 oder 5 IU/ml IFN- α kultiviert. Die Selektion mit G418 wurde währenddessen aufrechterhalten, um Zellen zu selektieren, die die Replikation der HCV-RNA unterstützten. Nach 16 Wochen wurden die Sensitivität der Replikation der HCV-RNA für IFN- α und die 50%-inhibierende Konzentration (IC_{50}) von IFN- α bestimmt. Die Replikons wiesen vor und nach der Langzeitbehandlung bei den zwei Konzentrationen eine ähnliche Sensitivität auf (Abb. 3.10). Die IC_{50} -Werte waren nach einer Dreifachbestimmung $4,7 \pm 1,5$ IU/ml IFN- α nach Inkubation bei 1 IU/ml und $10,8 \pm 2,2$ IU/ml IFN- α nach Inkubation bei 5 IU/ml. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von dem Wert von $6,7 \pm 1,3$ IU/ml IFN- α , der für das Con1/AD78-NR3-Replikon in Zellen ohne IFN-Vorbehandlung bestimmt worden war (Tab. 3.1). Die Behandlung der Zellen mit relativ niedrigen Konzentrationen von IFN- α führte folglich nicht zur Bildung resistenter Varianten des Replikons Con1/AD78-NR3.

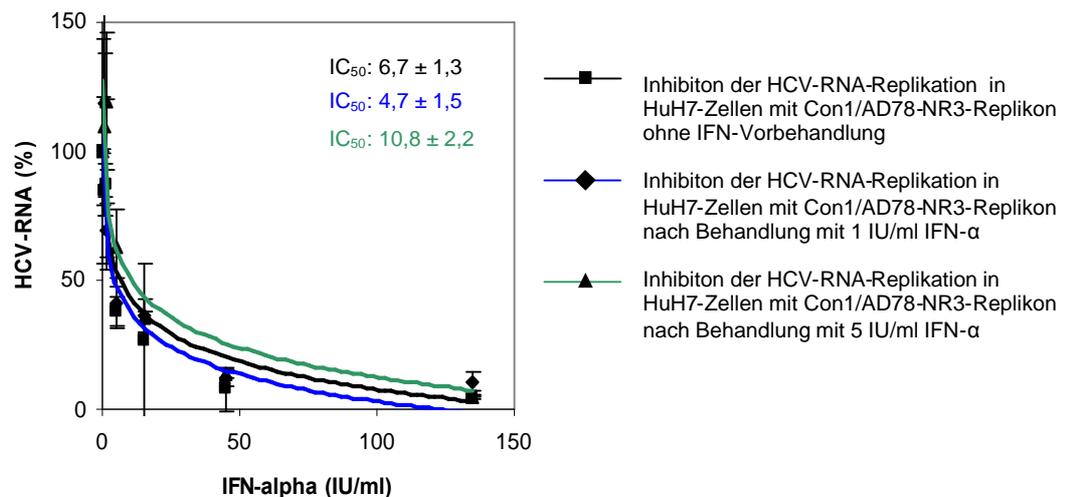


Abb. 3.10 Die Inhibition der RNA-Replikation des Con1/AD78-NR3-Replikons in HuH7-Zellen vor und nach 16-wöchiger Behandlung mit 1 oder 5 IU/ml IFN-α. Die zu den Graphen gehörigen IC₅₀-Werte sind farblich entsprechend dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung.

3.9 Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit steigenden Interferon-α-Konzentrationen

Nachdem durch die Behandlung Replikon-transfizierter Zellen mit niedrigen IFN-α-Konzentrationen keine resistenten HCV-Replikonmoleküle generiert werden konnten, wurden die Zellen mit steigenden IFN-α-Konzentrationen behandelt, um eine schrittweise Anpassung der HCV-RNA an die stärker werdende Wirkung des Cytokins zu ermöglichen. Drei Zelllinien mit den Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 und Con1/AD78-NR3 wurden eingesetzt, um die Chance zu erhöhen, mit einem der Replikons eine resistente Variante zu erhalten. Die Zellen wurden für eine Woche, d. h. zwei Passagen, bei einer Konzentration gehalten, dann wurde die IFN-Konzentration verdoppelt. Ausgehend von 1 IU/ml wurde nach einer Woche auf 2 IU/ml und nach einer weiteren Woche auf 4 IU/ml erhöht, so dass nach sieben Wochen die höchste Konzentration von 128 IU/ml erreicht wurde, welche drei Wochen beibehalten wurde. Alle Zelllinien überlebten diese letzte Konzentration bei gleichzeitiger G418-Selektion ohne dass ein vermindertes Wachstum oder Zellschädigungen beobachtet wurden, obwohl IFN-α die HCV-Replikation effizient inhibiert, wenn es zu einer Konzentration von 128 IU/ml zu Replikon-enthaltenden HuH7-Zellen gegeben wird, die nicht mit IFN-α vorbehandelt wurden (Abb. 3.9). Zwei Erklärungen für diese Beobachtung waren möglich. Erstens konnten die Zellen weiterhin die HCV-Replikation und somit die Expression der Neomycinphosphotransferase unterstützen, da sich IFN-resistente Replikonvarianten gebildet hatten. Zweitens konnte die langfristige IFN-Behandlung zu Veränderungen im Zellphänotyp wie z. B. einer geringeren Expression des IFN-Rezeptors oder Modifikationen des Zellmetabolismus geführt haben, so dass die antiviralen Effekte des Cytokins nicht mehr zur vollen Entfaltung kamen. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden wurde Gesamt-RNA, die auch HCV-Replikon-RNA

enthielt, aus allen drei IFN-resistenten Zelllinien extrahiert und mittels Elektroporation in naive HuH7-Zellen gebracht. Durch G418-Selektion wurden in allen drei Fällen Zellklone etabliert. Die IFN- α -Sensitivität der Replikation der HCV-RNA wurde in einer quantitativen RT-PCR erneut bestimmt. Alle drei Replikons wiesen nach wie vor eine deutliche Sensitivität für die Wirkung des IFN- α auf (Abb. 3.11). Die ermittelten 50%-inhibierenden IFN- α -Konzentrationen zeigten, dass die Replikation der HCV-RNA in HuH7-Zellen, die mit RNA aus IFN-resistenten Zellen transfiziert worden waren, im Vergleich zur Replikation in Zellen ohne IFN-Vorbehandlung nicht resistenter gegen IFN- α war (Tab. 3.2). Das bedeutet, dass die zuvor beobachtete Resistenz der drei untersuchten Zelllinien gegen hohe IFN-Konzentrationen auf Veränderungen der Wirtszellen, jedoch nicht auf die Ausbildung resistenter Replikons zurückzuführen war.

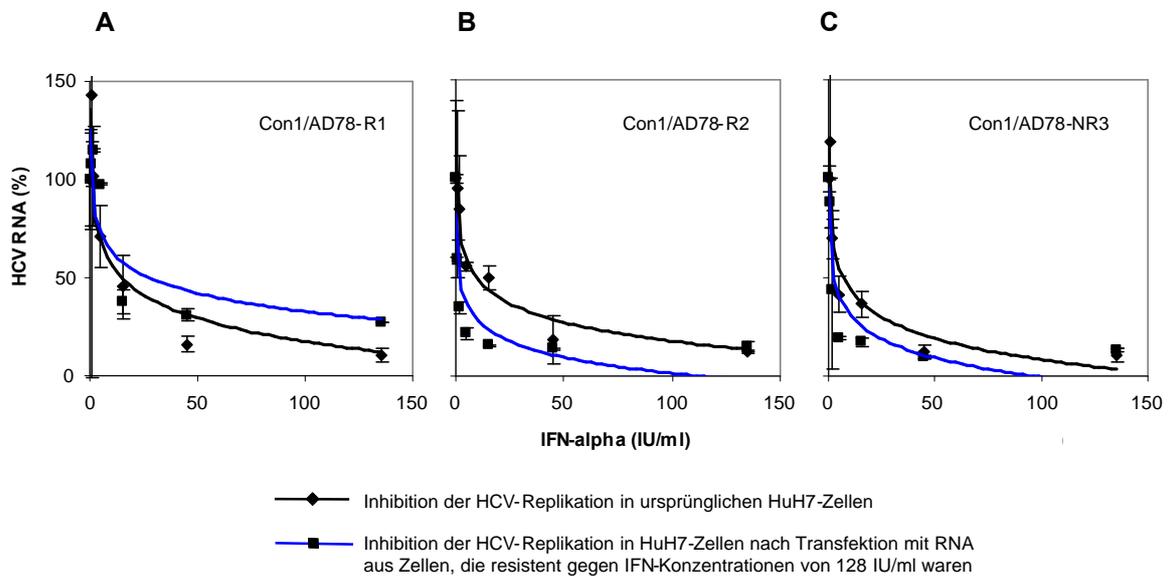


Abb. 3.11 Die Inhibition der Replikation der Replikons Con1/AD78-R1 (A), Con1/AD78-R2 (B) und Con1/AD78-NR3 (C) in HuH7-Zellen ohne Vorbehandlung mit IFN- α (schwarze Linie). Außerdem ist die Inhibition entsprechender Replikons dargestellt, nachdem Zellen 10 Wochen mit steigenden IFN- α -Konzentrationen (1-128 IU/ml) behandelt wurden und Gesamt-RNA aus resistenten Zellen extrahiert und in naive HuH7-Zellen eingebracht worden war (blaue Linie). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung dar.

Tab. 3.2 Die IC_{50} -Werte von IFN- α für die RNA-Replikation der Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 und Con1/AD78-NR3 in HuH7-Zellen ohne Vorbehandlung mit IFN- α und nach 10-wöchiger Behandlung mit steigenden IFN- α -Konzentrationen (1-128 IU/ml), RNA-Extraktion und Transfektion naiver HuH7-Zellen mit RNA aus resistenten Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichungen.

Replikon	Con1/AD78-R1		Con1/AD78-R2		Con1/AD78-NR3	
	ohne Vorbehandlung	nach Langzeitbehandlung mit IFN- α und Einbringen in naive HuH7-Zellen	ohne Vorbehandlung	nach Langzeitbehandlung mit IFN- α und Einbringen in naive HuH7-Zellen	ohne Vorbehandlung	nach Langzeitbehandlung mit IFN- α und Einbringen in naive HuH7-Zellen
IC_{50} (IU/ml)	14,9 \pm 2,9	27,6 \pm 8,2	9,5 \pm 4,1	1,5 \pm 0,8	6,7 \pm 1,3	2,5 \pm 1,2

3.10 Untersuchungen zur Expression der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors, IFNAR 1 und IFNAR 2, in IFN-resistenten Zelllinien

Ein möglicher zellulärer Faktor, der zur Ausbildung einer Resistenz gegen IFN- α führen kann, ist eine verminderte oder fehlerhafte Expression des Typ I-IFN-Rezeptors. Daher wurden sowohl die mRNA-Mengen der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors als auch deren Sequenzen in den drei Zelllinien, die die Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 oder Con1/AD78-NR3 enthielten und resistent gegen eine IFN-Konzentration von 128 IU/ml waren, untersucht und mit denen unbehandelter Zellen verglichen.

3.10.1 Bestimmung der mRNA-Mengen der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors

Die Mengen der mRNAs von IFNAR 1 und 2 in den drei IFN-resistenten Zelllinien wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und mit jenen in entsprechenden Kontrollzellen ohne IFN-Behandlung verglichen. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, so dass eine verminderte Translation der IFN-Rezeptorgene nicht der zelluläre Faktor war, der zu der beobachteten Resistenz der HCV-RNA-Replikation gegen IFN- α war (Abb. 3.12).

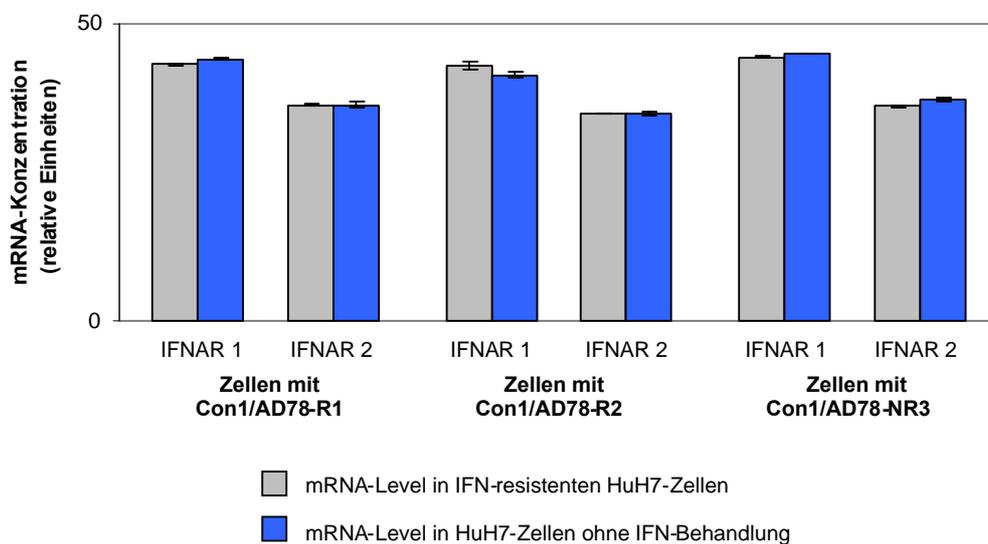


Abb. 3.12 Die mRNA-Konzentrationen der beiden Ketten IFNAR 1 und 2 des Typ I-IFN-Rezeptors in drei Zelllinien, die die Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 oder Con1/AD78-NR3 enthielten und resistent gegen eine IFN-Konzentration von 128 IU/ml waren, sowie in Kontrollzellen ohne IFN- α -Behandlung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung dar.

3.10.2 Amplifikation und Sequenzierung der beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors

Ebenso wie eine geringere Expression der Rezeptoren konnten auch Mutationen in den IFN-Rezeptoren IFN-resistenter Zelllinien die Funktion der Rezeptoren und folglich die Wirkung des IFN- α einschränken. Daher wurde Gesamt-RNA aus den drei unbehandelten und den drei IFN-resistenten Zelllinien, die die Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 oder Con1/AD78-NR3 enthielten, isoliert und die kodierenden Sequenzen von IFNAR 1 und 2 mittels *nested* RT-PCR amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden sequenziert und sowohl miteinander als auch mit bekannten Sequenzen aus der NCBI-Nukleotid-Datenbank verglichen.

3.10.2.1 Amplifikation und Sequenzierung von IFNAR 1

Die Amplifikation der kodierenden Sequenzen von IFNAR 1 ergab bei den drei Zelllinien, die die Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 oder Con1/AD78-NR3 enthielten, vor und nach IFN-Behandlung Banden der erwarteten Größe von 1642 nt. Der Vergleich der Sequenzen der Rezeptorkette IFNAR 1 vor und nach IFN-Behandlung der Zellen sowie mit einer bekannten IFNAR 1-Nukleotidsequenz mit der NCBI-Zugriffsnummer NM000874 zeigte, dass weder Mutationen noch Deletionen als Folge der IFN-Behandlung aufgetreten waren.

3.10.2.2 Amplifikation und Sequenzierung von IFNAR 2

Die Amplifikation der kodierenden Sequenz für die Rezeptorkette IFNAR 2 mittels herkömmlicher PCR lieferte bei den drei Zelllinien mit den Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 und Con1/AD78-NR3 ohne IFN-Behandlung gleich große Banden der erwarteten Größe von 1039 nt. Nach IFN-Behandlung trat nur bei der Zelllinie, die das Replikon Con1/AD78-R2 enthielt, ein solche starke DNA-Bande auf (Abb. 3.13 A). Bei den anderen beiden Zelllinien wurden nur mehrere schwache und zu kurze Fragmente amplifiziert. Die Erklärung hierfür konnte entweder sein, dass Deletionen vorlagen oder dass die PCR zu unspezifisch war. Um zu prüfen, ob die PCR-Reaktion fehlerhaft war, wurde mit den gleichen Primern eine *nested* RT-PCR mit einem *touchdown*-Programm statt einem herkömmlichen PCR-Programm durchgeführt und tatsächlich führte diese Methode bei allen drei Zelllinien zu Banden der erwarteten Größe (Abb. 3.13 B). Der Sequenzvergleich der IFNAR 2-Sequenzen vor und nach IFN-Behandlung untereinander sowie mit einer bekannten Nukleotidsequenz mit der NCBI-Zugriffsnummer BC021825 zeigte wie zuvor bei IFNAR 1, dass in diesem Bereich keine Mutationen oder Deletionen in Folge der Behandlung mit steigenden IFN- α -Konzentrationen aufgetreten waren. Somit waren solche Veränderungen in den beiden Ketten des Typ I-IFN-Rezeptors nicht der Grund für die beobachtete zellvermittelte Resistenz gegen die Wirkung des IFN- α .

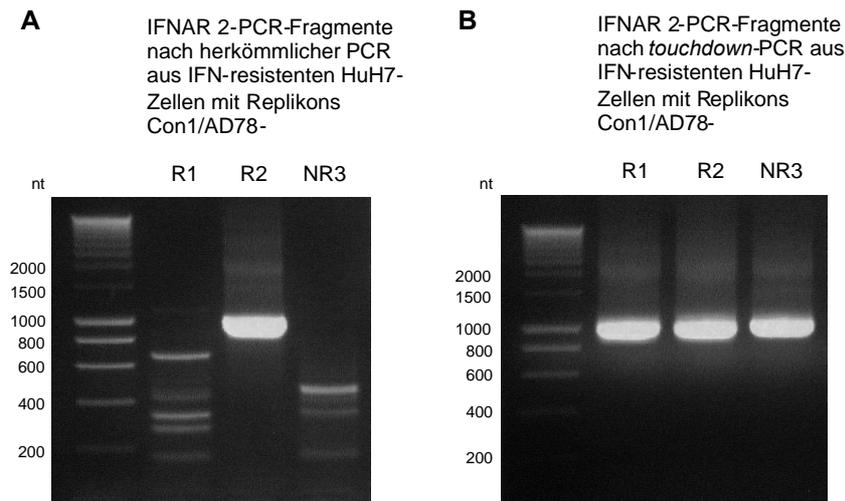


Abb. 3.13 Die PCR-Fragmente der IFN-Rezeptorkette IFNAR 2 nach nested RT-PCR mit Gesamt-RNA aus unbehandelten HuH7-Zellen (A) sowie nach Amplifikation mittels herkömmlicher *nested* RT-PCR (B) oder *touchdown-nested*-RT-PCR (C) mit Gesamt-RNA aus HuH7-Zellen, die die Replikons Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R2 oder Con1/AD78-NR3 enthielten und resistent gegen eine IFN-Konzentration von 128 IU/ml waren.

3.11 Untersuchung der Ribavirin-Resistenz der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons

Entsprechend den Tests zur Interferonresistenz der chimären Replikons wurde untersucht, ob die verschiedenen Varianten des NS5A-Proteins aus *Responder*- und *Nonresponder*-Isolaten die Ribavirinresistenz der HCV-Replikation beeinflussten.

Dazu wurden HuH7-Zellen, in denen die Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -NR1, -NR2 und -NR3) dauerhaft replizierten, mit verschiedenen RBV-Konzentrationen von 0 bis 400 μ M behandelt. Nach 48 h wurden Zelllysate hergestellt und die Menge der Replikonmoleküle durch quantitative *real-time* RT-PCR bestimmt. Ein Abgleich der Menge der Replikonmoleküle mit der Menge der je Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA über die Zahl der mRNA-Moleküle für die humane Glucose-6-Phosphatdehydrogenase war hier nicht möglich, da RBV die Expression dieser Moleküle inhibierte. Daher wurde die metabolische Aktivität vitaler Zellen in einem parallelen WST-1-Verfahren bestimmt. Bei keiner der RBV-behandelten Zelllinien wurde nach 48 h ein wesentlicher Unterschied in der Anzahl lebender Zellen zwischen den verwendeten Konzentrationen festgestellt. So konnte eine Abnahme von Replikon-RNA als Folge eines Einflusses des RBV auf den allgemeinen Stoffwechsel der Zellen ausgeschlossen werden.

Die Kinetik der Abnahme der Replikation mit zunehmender RBV-Konzentration war bei allen Replikons ähnlich (Abb. 3.14). Die mittleren IC_{50} -Werte variierten zwischen 137,0 und 378,8 μ M RBV (Tab. 3.3). Um die Reproduzierbarkeit dieser Werte zu prüfen, wurde am Beispiel der Zelllinie mit dem Replikon Con1/AD78-R3 nach weiteren drei Wochen Kultivierung erneut die RBV-Sensitivität der HCV-RNA bestimmt. Der IC_{50} -Wert lag nun bei $283,6 \pm 50,1$ μ M RBV und damit 2,1-mal höher als bei der ersten Bestimmung mit dem gleichen Replikon. Daraus wurde geschlossen, dass Abweichungen zwischen IC_{50} -Werten, die kleiner als dreifach waren, keinen signifikanten Unterschied darstellten, sondern lediglich die normale Varianz zwischen zwei unabhängigen Experimenten repräsentierten.

Wie bei der IFN-Sensitivität wurden somit auch bei der RBV-Sensitivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC_{50} -Werten der Replikons mit NS5A-Sequenzen des HCV-Stamms AD78 untereinander sowie zum IC_{50} -Wert des Kontrollreplikons, das ausschließlich Con1-Sequenzen enthielt, beobachtet.

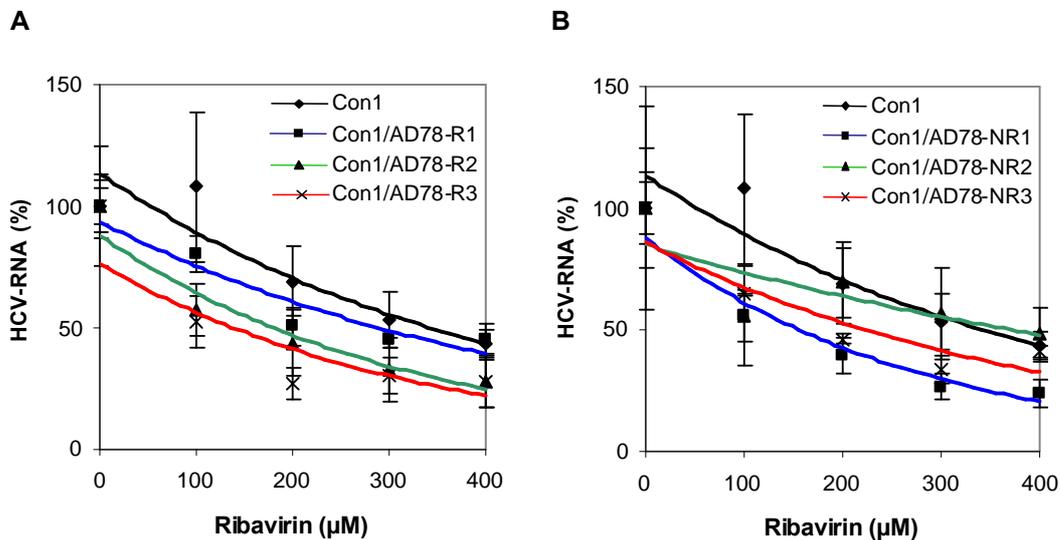


Abb. 3.14 Hemmung der HCV-Replikation durch Ribavirin in HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon (Con1) oder chimäre Con1/AD78-Replikons (A: Con1/AD78-R1, -R2, -R3; B: Con1/AD78-NR1, -NR2 oder -NR3) enthielten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung dar.

Tab. 3.3 Die IC_{50} -Werte von Ribavirin für die HCV-Replikation in HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon oder chimäre Con1/AD78-Replikons enthielten. Angegeben sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichungen.

Replikon	Con1	Con1/AD78-R1	Con1/AD78-R2	Con1/AD78-R3	Con1/AD78-NR1	Con1/AD78-NR2	Con1/AD78-NR3
IC_{50} (μ M)	341,0 \pm 63,1	284,8 \pm 100,3	176,7 \pm 43,1	137,0 \pm 87,1	220,5 \pm 35,7	378,8 \pm 178,5	225,5 \pm 4,5

3.12 Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit niedrigen Ribavirin-Konzentrationen zur Generierung resistenter Varianten der Con1/AD78-HCV-Replikons

Neben der Langzeitbehandlung mit IFN- α wurden HuH7-Zellen, die die Replikation der Con1/AD78-Replikons dauerhaft unterstützten, mehrere Wochen mit verschiedenen Ribavirin-Konzentrationen behandelt, um RBV-resistente Varianten der Replikon-RNAs zu erhalten. Zuerst wurden HuH7-Zellen, die das Replikon Con1/AD78-NR3 enthielten, 16 Wochen lang bei relativ niedrigen Konzentrationen von 10 oder 50 μ M RBV kultiviert. Die Selektion mit G418 wurde währenddessen aufrechterhalten, um Zellen zu selektieren, die die Replikation der HCV-RNA unterstützten. Nach Beendigung der Kultivierung wurde in einer quantitativen RT-PCR die Sensitivität der Replikon-RNA für RBV gemessen und die 50%-inhibierenden Konzentrationen von RBV wurden bestimmt (Abb. 3.15). Diese waren nach einer Dreifachbestimmung 157,3 \pm 18,3 μ M RBV nach Inkubation bei 10 μ M und 201,0 \pm 36,3 μ M RBV nach Inkubation bei 50 μ M. Diese Werte lagen ohne signifikante Unterschiede unterhalb des Wertes von 225,5 \pm 4,5 μ M RBV (Tab. 3.3), der mit Con1/AD78-NR3-enthaltenden Zellen ohne

RBV-Vorbehandlung bestimmt worden war. Die Behandlung der Zellen mit relativ niedrigen Konzentrationen von RBV führte folglich nicht zur Bildung resistenter Varianten des Replikons Con1/AD78-NR3.

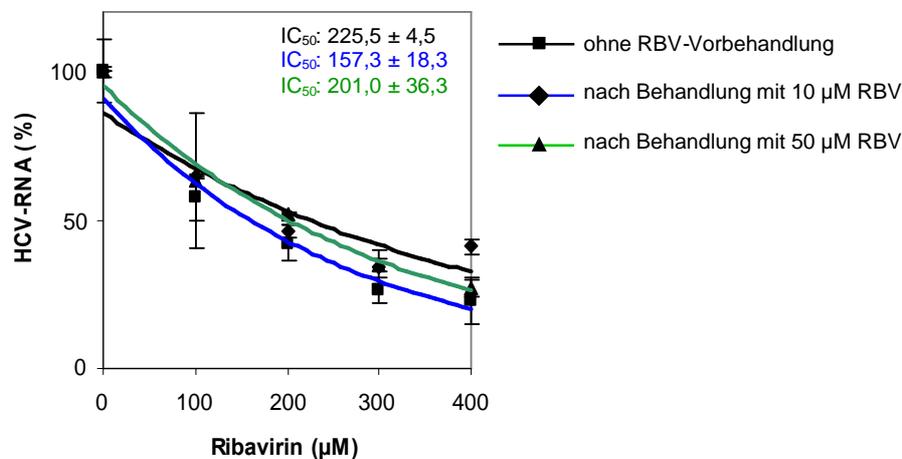


Abb. 3.15 Die Inhibition der RNA-Replikation des Con1/AD78-NR3-Replikons in HuH7-Zellen vor und nach 16-wöchiger Behandlung mit 10 oder 50 µM RBV. Die zu den Graphen gehörigen IC_{50} -Werte sind farblich entsprechend dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung.

3.13 Langzeitbehandlung von transfizierten HuH7-Zellen mit einer hohen Ribavirin-Konzentration

Ein weiterer Versuch, RBV-resistente Varianten der HCV-RNA zu erhalten, bestand darin, HuH7-Zellen, in denen verschiedene chimäre Con1/AD78-Replikons dauerhaft replizierten, mehrere Wochen mit der relativ hohen Ribavirin-Konzentration von 300 µM zu behandeln, die die HCV-Replikation nach 48 h effektiv hemmt (Abb. 3.14). Behandelt wurden Zelllinien, die die Replikons Con1/AD78-NR1, Con1/AD78-NR2 und Con1/AD78-R2 enthielten. Schon nach wenigen Tagen wiesen die Zelllinien mit den Replikons Con1/AD78-NR2 und Con1/AD78-R2 deutlich schlechteres Wachstum und viele tote Zellen auf und nach zwei Wochen waren alle Zellen abgestorben. Nur die Zellen, in denen das Replikon Con1/AD78-NR1 replizierte, überlebten ohne Schaden die gleichzeitige Inkubation mit 300 µM RBV und G418. Nach neun Wochen wurde die Sensitivität der HCV-Replikon-RNA dieser Zelllinie mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und es zeigte sich, dass die Replikation sogar resistent gegen eine noch höhere RBV-Konzentration von 400 µM (Abb. 3.16) war. Um zu prüfen ob diese Resistenz auf die Bildung resistenter HCV-RNA oder eine Selektion RBV-resistenter Zellen zurückzuführen war, wurde Gesamt-RNA aus den „RBV-resistenten“ Zellen extrahiert und mittels Elektroporation in naive HuH7-Zellen eingebracht. Nach G418-Selektion wurde die Sensitivität der HCV-Replikation in der neu etablierten Zelllinie bestimmt (Abb. 3.16). Der ermittelte IC_{50} -Wert von $209,3 \pm 1,6$ µM lag ohne signifikanten Unterschied unterhalb des Wertes $220,5 \pm 35,7$ µM, der mit Con1/AD78-NR1-enthaltenden HuH7-Zellen ohne RBV-Vorbehandlung ermittelt worden war (Tab. 3.3). Daher war die beobachtete RBV-Resistenz der Con1/AD78-NR1-enthaltenden Zellen, die bei 300 µM RBV überlebten, auf eine Selektion RBV-resistenter Zellen zurückzuführen, jedoch nicht auf die Bildung RBV-resistenter Varianten des HCV-Replikons.

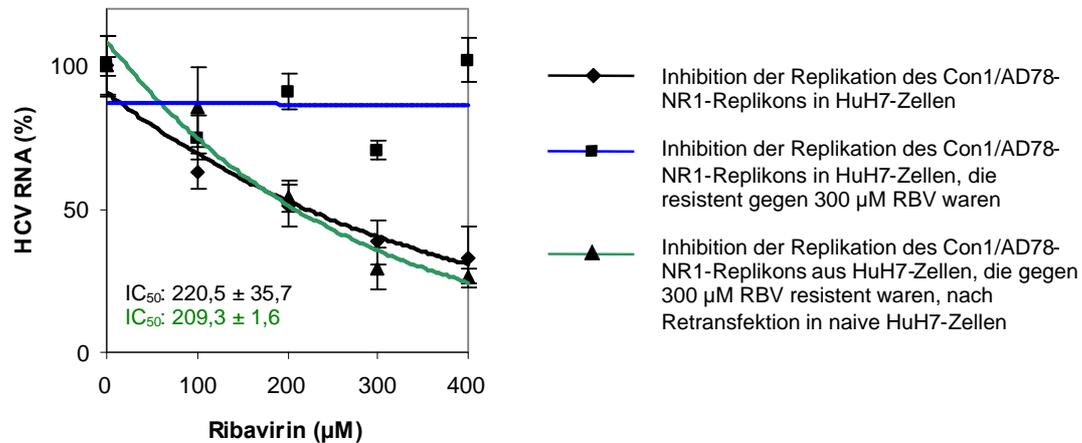


Abb. 3.16 Die Inhibition der RNA-Replikation des Con1/AD78-NR1-Replikons in HuH7-Zellen vor (schwarze Linie) und nach (blaue Linie) 9-wöchiger Behandlung mit 300 µM RBV. Außerdem wurde RNA aus Zellen, die resistent gegen eine RBV-Konzentration von 300 µM waren, isoliert, erneut in naive HuH7-Zellen eingebracht und die Hemmung der HCV-Replikation gemessen (grüne Linie). Die zu den Graphen gehörigen IC₅₀-Werte sind farblich entsprechend dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen nach einer Dreifachbestimmung.

3.14 Bestimmung der apoptoseinduzierenden Wirkung von TNF-α auf HuH7-Zellen, die chimäre Con1/AD78-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten enthielten

Mit den Zelllinien, die chimäre HCV-Replikonmoleküle enthielten, wurde getestet, ob NS5A die durch TNF-α ausgelöste Apoptose inhibiert, wenn es in physiologischen intrazellulären Konzentrationen vorliegt. Zudem wurden die verschiedenen Varianten der NS5A-Region auf einen unterschiedlich stark inhibierenden Einfluss auf die Apoptose untersucht.

Dazu wurden naive HuH7-Zelllinien ohne Replikons als Kontrolle und Zelllinien, in denen subgenomische HCV-RNAs replizierten, mit verschiedenen TNF-α-Konzentrationen behandelt. Die Lebendzellrate als Maß für die Zahl der Zellen, die in den Prozess des programmierten Zelltods eingetreten waren, wurde in einem WST-1-Assay bestimmt. Die apoptoseauslösende Wirkung von TNF-α war in naiven HuH7-Zellen deutlich geringer als in Zellen, in denen subgenomische HCV-RNA-Moleküle replizierten (Abb. 3.17). Innerhalb der Gruppe der Replikon-enthaltenden Zelllinien bestanden geringe Unterschiede in der apoptotischen Wirkung des TNF-α. Generell war eine leichte Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch TNF-α zu beobachten.

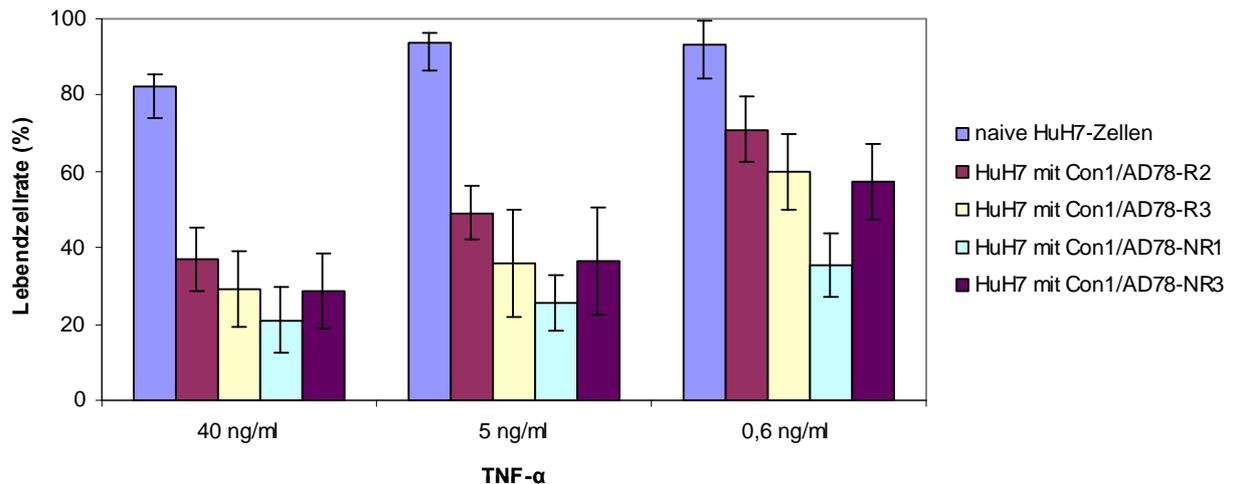


Abb. 3.17 Die apoptoseinduzierende Wirkung verschiedener TNF- α -Konzentrationen auf naive HuH7-Zellen und HuH7-Zellen, die chimäre Con1/AD78-Replikons mit verschiedenen NS5A-Proteinen enthielten. Zur Bestimmung der Lebendzellrate wurde ein WST-1-Assay durchgeführt. Eine 100%ige Lebendzellrate wurde mit Zelllinien ohne TNF- α -Behandlung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente mit Standardabweichungen.

3.15 Bestimmung der Replikationspotentiale der chimären Con1/AD78-HCV-Replikons

Das nichtstrukturelle Protein NS5A ist ein wichtiger Bestandteil des Replikationskomplexes des HCV und Mutationen des NS5A-Proteins können großen Einfluß auf die Replikation des Virus haben (1.5). Ein besseres Verständnis der HCV-Replikation und der Rolle von NS5A in diesem Prozess wird bei der Entwicklung effektiverer Therapien gegen HCV-Infektionen hilfreich sein.

Um neue Merkmale von NS5A mit Bedeutung für die Replikationsfähigkeit des HCV zu identifizieren, wurde eine Reihe von Replikonkonstrukten verwendet, die das Luciferasegen enthielten. Diese Replikons basierten auf Varianten des Plasmids pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET, in denen wie zuvor bei den pFKI₃₈₉/NS3-3'/ET-Chimären im subgenomischen HCV-Fragment die NS5A-Region des Con1-HCV-Stamms gegen entsprechende NS5A-Abschnitte des HCV-Stammes AD78 ausgetauscht worden war. Die klonierten NS5A-Fragmente wurden aus Virusisolaten von acht Patientinnen amplifiziert, die alle mit dem gleichen Material infiziert wurden, das mit dem HCV-Stamm AD78 kontaminiert war. Vier der Patientinnen waren *Responder* (R1–R4), die vier anderen waren *Nonresponder* (NR1–NR4).

HuH7-Zellen wurden mittels Elektroporation mit *in vitro*-transkribierten RNA-Replikons transfiziert. Nach 4, 24, 48 und 72 h wurde die Luciferaseaktivität, die proportional zur Replikation ist, gemessen. Als Positivkontrolle diente das ursprüngliche Con1-Replikon (Con1) auf Basis des Plasmids pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET. Als Negativkontrolle wurde das Replikon Con1/GND verwendet, das mit dem Plasmid pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET/GND als Matrize hergestellt wurde. Dieses ist bis auf eine GND-Mutation in der NS5B-Polymerase identisch mit dem Con1-Replikon. Allerdings ist es durch die Mutation nicht in der Lage zu replizieren. Die verschiedenen chimären Replikons zeigten unterschiedliche Replikationsfähigkeiten (Abb. 3.18).

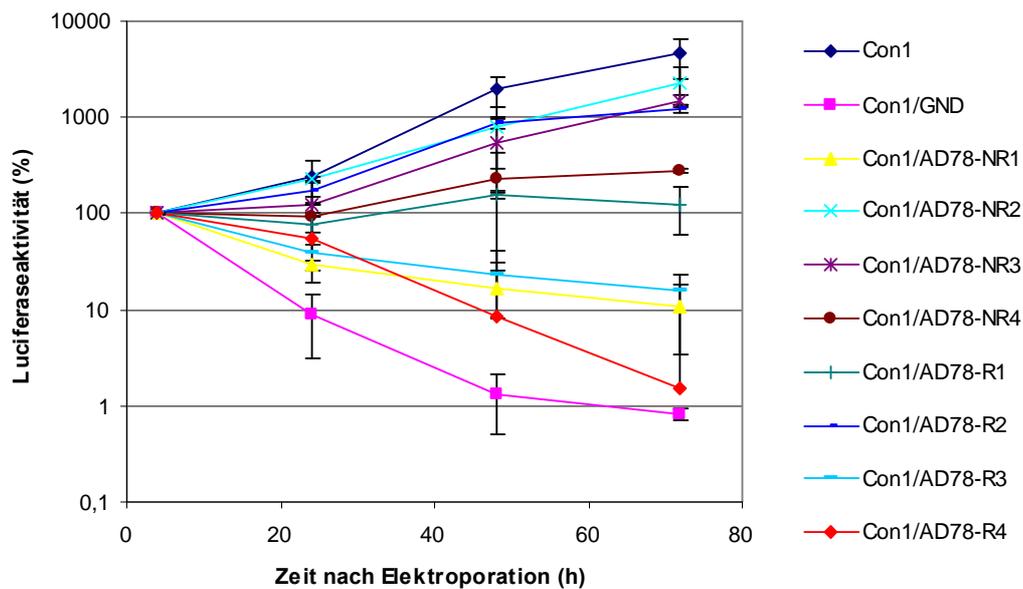


Abb. 3.18 Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Con1-Replikons (Con1) oder chimärer Con1/AD78-Replikons (Con1/AD78-R1, -R2, -R3, -R4, -NR1, -NR2, -NR3, -NR4) im transienten Luciferasetest. Als Negativkontrolle wurde die replikationsunfähige Variante von Con1 mit der GND-Mutation in der NS5B-Polymerase verwendet (Con1/GND). Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Einige replizierten beinahe so stark wie das Con1-Ursprungsreplikons (Con1/AD78-NR2, -NR3, -R2) und es kam zu einem deutlichen Anstieg der Luciferaseaktivität in den ersten 72 h nach der Elektroporation. Andere subgenomische HCV-RNAs zeigten keinen deutlichen Anstieg (Con1/AD78-NR4, -R1) oder einen mehr oder weniger schnellen Abfall der Luciferaseaktivität (Con1/AD78-R3, -NR1, -R4).

3.16 Identifizierung und Untersuchung von Aminosäuremutationen in der NS5A-Region der Con1/AD78-HCV-Replikons mit möglichem Einfluss auf die Replikationsfähigkeit

Die Replikons, die verschieden stark replizierten, unterschieden sich nur in der Sequenz der NS5A-Region. Daher wurde nach Eigenschaften des NS5A-Proteins gesucht, die Einfluss auf die Replikation des HCV haben konnten. Dazu wurden in einem *Alignment* die Aminosäuresequenzen der verschiedenen NS5A-Varianten verglichen und Aminosäuren, die nur in relativ gut oder schlecht replizierenden Replikons vorkamen, wurden identifiziert (Abb. 3.19). Um den Einfluss einzelner oder mehrerer Aminosäuren auf die Replikation verschiedener subgenomischer HCV-RNAs zu untersuchen, wurden durch sequenzspezifische Mutagenese Mutationen in die Plasmide eingebracht. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Mit den veränderten Plasmiden als Matrize wurden Replikon-RNA-Transkripte hergestellt. Mit diesen Replikons wurden HuH7-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität wurde bestimmt.

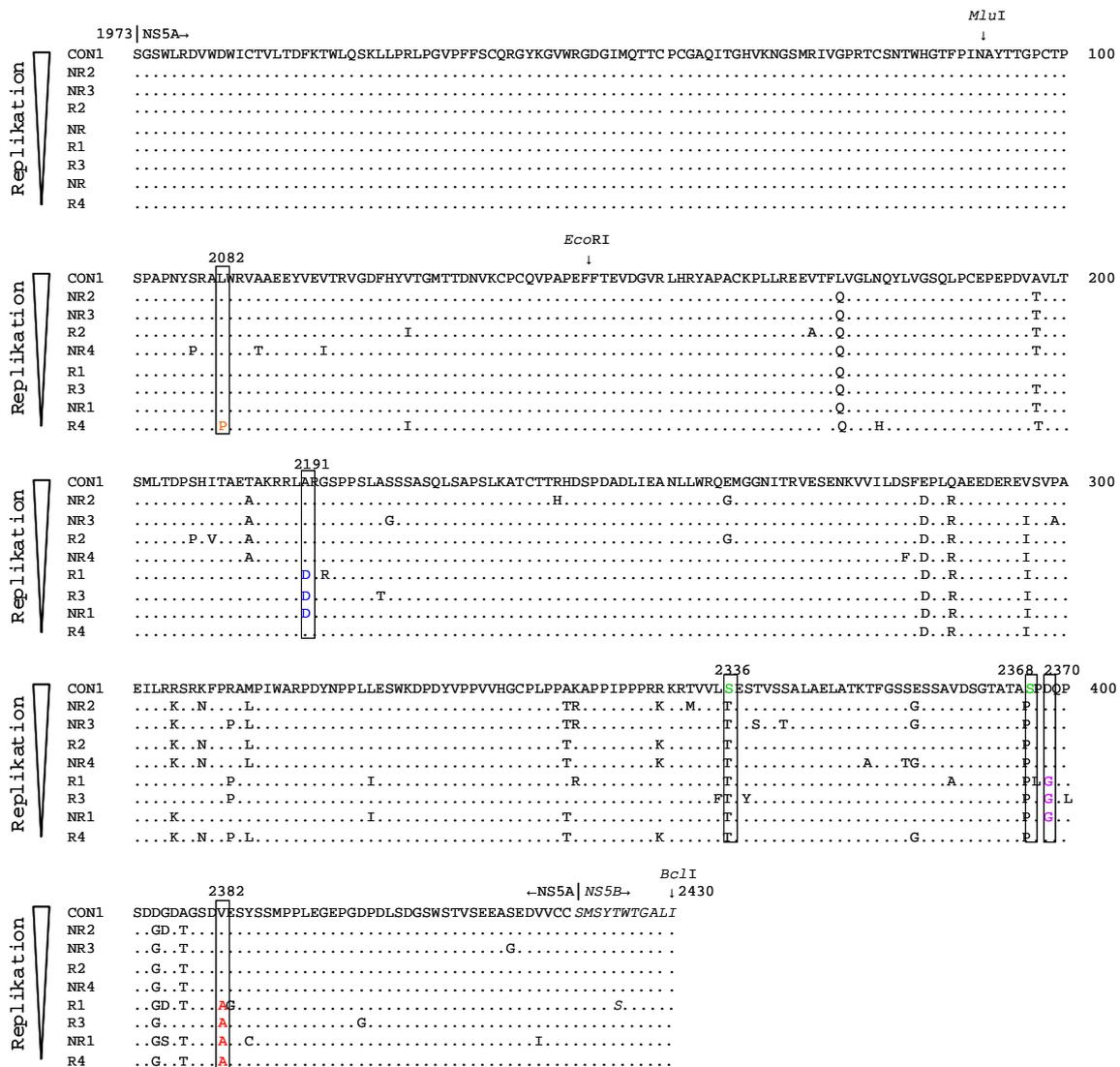


Abb. 3.19 Alignment der Aminosäuresequenzen der NS5A-Regionen und Fragmenten der NS5B-Regionen des Con1-Replikons und der acht HCV-Isolate des Stamms AD78 (R1-4, NR1-4), die in das Con1-Replikon kloniert wurden. Die Aminosäurepositionen 1973 und 2430 bezogen auf das Con1-Isolat mit der NCBI-Zugriffsnummer AJ238799 sind am Anfang und am Ende der Sequenz angegeben. Die für die Klonierung benutzten Restriktionschnittstellen sind mit einem Pfeil und den zugehörigen Endonukleasen angegeben. Die Sequenzen sind nach der Fähigkeit ihrer Replikons zu replizieren von oben nach unten angeordnet, so dass oben die am besten replizierende steht. Aminosäureaustausche, deren Einfluss auf die Replikationsfähigkeit untersucht wurde, sind umrahmt und farbig dargestellt (orange: 2082P, blau: 2191D, lila: 2370G, rot: 2382A). Mögliche Phosphorylierungsstellen an Serinresten, die nur in der Con1-Sequenz vorkommen, sind umrahmt und grün eingefärbt (2336S und 2368S).

3.16.1 Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutation an Position 2382 auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons

Am eindeutigsten schien ein negativer Einfluss der Aminosäure Alanin an Position 2382 (Abb. 3.19) auf die Replikationsfähigkeit des HCV, da diese ausschließlich in NS5A-Sequenzen vorkam, die schlecht bis gar nicht replizierten. Daher wurde durch sequenzspezifische Mutagenese im ursprünglichen Con1-Plasmid pFK-I₃₄₁PI-luc/NS3-3'/ET ein Valin statt des Alanins an Position 2382 eingeführt, um zu prüfen, ob durch Einbringen dieser einzelnen Aminosäure die Replikation des Con1-Replikons gehemmt wurde. Außerdem wurde im Replikon Con1/AD78-R3, das nicht effizient replizierte, die Aminosäure Alanin an gleicher Position gegen Valin ausgetauscht, um zu testen, ob

umgekehrt die Fähigkeit zu replizieren wiederhergestellt werden konnte. Die RNA-Transkripte der manipulierten Plasmide Con1/2382A und Con1/AD78-R3/2382V und unveränderte Kontrollreplikons wurden in HuH7-Zellen eingebracht und die Luciferaseaktivität wurde bestimmt. Die Mutation 2382A führte im Con1-Replikon zu keiner wesentlichen Veränderung der Replikationsfähigkeit (Abb. 3.20, Tab. 3.4). Durch Einführen der Aminosäure Valin an Position 2382 konnte die Replikationsfähigkeit des Replikon Con1/AD78-R3 nicht wiederhergestellt werden. Die untersuchte Mutation an Position 2382 hatte folglich keinen Einfluss auf die Replikation.

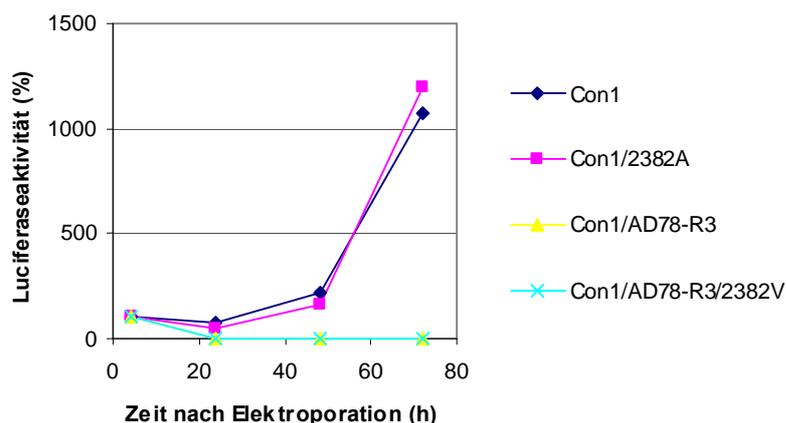


Abb. 3.20 Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Con1-Replikons (Con1), des Con1-Replikons mit einem eingeführten Aminosäureaustausch (Con1/2382A) oder chimärer Con1/AD78-Replikons ohne (Con1/AD78-R3) und mit Aminosäureaustausch (Con1/AD78-R3/2382V) im transienten Luciferasetest.

Tab. 3.4 Übersicht aller durch sequenzspezifische Mutagenese veränderter Replikons und zugehöriger Ursprungsplasmide. Die Stärke der ursprünglichen Replikationen und der Replikationen mit Mutationen sind angegeben (+, -, ++).

Abschnitt	Replikon	Mutationen	Replikation
3.16.1	Con1	-	+
	Con1	2382A	+
	Con1/AD78-R3	-	-
	Con1/AD78-R3	2382V	-
3.16.2	Con1	-	+
	Con1	2191D	+
	Con1	2370G	+
3.16.3	Con1	-	+
	Con1	2191D + 2370G	-
	Con1/AD78-NR1	-	-
	Con1/AD78-NR1	2191A + 2370D	-
3.16.4	Con1	-	+
	Con1	2082P	-
	Con1/AD78-R4	-	-
	Con1/AD78-R4	2082L	+
3.17	Con1	-	+
	Con1	2368P	++
	Con1	2336T	++
	Con1	2368P + 2336T	++

3.16.2 Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutationen an den Positionen 2191 und 2370 auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons

Zwei weitere Mutationen wurden identifiziert, die in drei von vier der schlecht replizierenden Konstrukte vorkamen (Abb. 3.19). Diese waren die Mutationen 2191D und 2370G in Con1/AD78-R1, Con1/AD78-R4 und Con1/AD78-NR1. Die beiden Mutationen wurden durch sequenzspezifische Mutagenese einzeln in das ursprüngliche Con1-Replikon eingeführt.

Von den so hergestellten Plasmiden wurden die Replikons Con1/2191D und Con1/2370G transkribiert und HuH7-Zellen wurden damit transfiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität ergab, dass die beiden Mutationen einzeln keinen Einfluss auf die Replikation hatten (Abb. 3.21, Tab. 3.4).

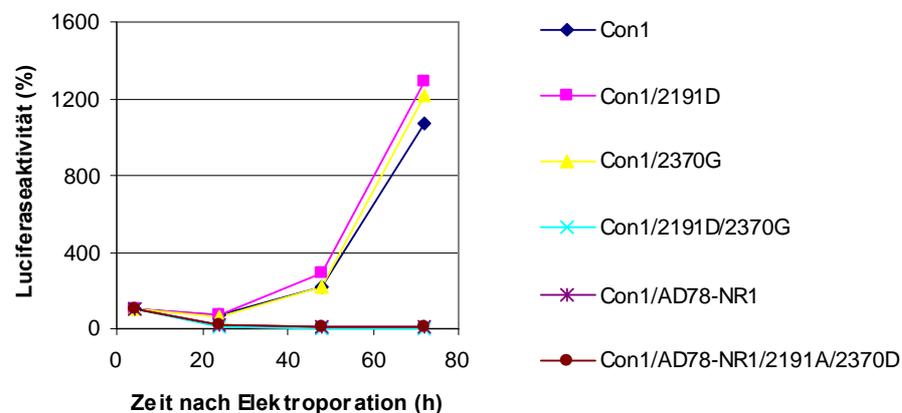


Abb. 3.21 Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Con1-Replikons (Con1), des Con1-Replikons mit verschiedenen Aminosäuremutationen (Con1/2191D, Con1/2370G, Con1/2191D/2370G) oder chimärer Con1/AD78-Replikons ohne (Con1/AD78-NR1) und mit Aminosäuremutationen (Con1/AD78-NR1/2191A/2370D) im transienten Luciferasetest.

3.16.3 Kombinationen der Aminosäuremutationen an den Positionen 2191, 2370 und 2382 und ihr Einfluss auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons

Es bestand weiterhin die Möglichkeit, dass Mutationen erst in Kombination miteinander ihre günstigen oder negativen Einflüsse entfalten, wenn sie z. B. gemeinsam zu einer bestimmten Konformationsänderung eines Proteins führen. Daher wurde in der HCV Sequence Database nach Kombinationen der Mutationen 2382A, 2191D und 2370G, die in schlecht replizierenden HCV-Replikons vorwiegend auftraten, in 99 natürlich vorkommenden Isolaten des HCV Genotyps 1b gesucht. Bei diesen 99 Sequenzen wurden nur solche berücksichtigt, die sich nicht stark ähnelten oder epidemiologisch verwandt waren. Die Kombination der Mutationen 2191D und 2370G war die seltenste. Sie trat ausschließlich in der Consensussequenz des HCV-Stammes AD78 (NCBI-Zugriffsnummer AJ132996) auf, also in dem gleichen Stamm, dem die hier untersuchten NS5A-Fragmente angehörten. Das deutete darauf hin, dass das HCV nur in der Lage ist zu replizieren, wenn sich diese Kombination von Aminosäuren im Kontext der gesamten AD78-Sequenz befindet. In der HCV-Sequenz eines anderen Stammes könnten die beiden Mutationen jedoch die Replikation verhindern. Um das zu überprüfen, wurden die Mutationen 2191D und 2370G in Kombination miteinander in das Con1-Plasmid eingeführt und die Replikation des mutierten Replikons

Con1/2191D/2370G in HuH7-Zellen bestimmt. Tatsächlich replizierte die so manipulierte subgenomische HCV-RNA nicht mehr in HuH7-Zellen (Abb. 3.21, Tab. 3.4). Um zu testen, ob auch umgekehrt die Replikationsfähigkeit durch Aminosäureaustausch an diesen beiden Positionen wiederhergestellt werden konnte, wurden die Mutationen 2191A und 2370D in das Replikon Con1/AD78-NR1 eingeführt. Allerdings konnte auch das resultierende Replikonkonstrukt Con1/AD78-NR1/2191A/2370D nicht replizieren (Abb. 3.21).

Die Replikation der Con1-Positivkontrolle war in den Experimenten mit den veränderten Replikons (Abb. 3.20; Abb. 3.21) schwächer als im vorhergehenden Experiment (Abb. 3.18). Daher wurden hier keine logarithmischen, sondern lineare Auftragungen der Luciferaseaktivität gewählt. Diese Schwankungen traten auch in weiteren Versuchen auf (Abb. 3.22; Abb. 3.23). Da aber immer das Con1-Replikon eingesetzt wurde, konnten alle Ergebnisse in Relation zur Positivkontrolle betrachtet werden.

3.16.4 Untersuchung des Einflusses der Aminosäuremutation an der Position 2082 in der NS5A-Region auf die Replikationsfähigkeit von HCV-Replikons

Das NS5A-Fragment aus dem Isolat R4 nahm eine außergewöhnliche Stellung innerhalb der untersuchten NS5A-Sequenzen des AD78-Stammes ein. Die Mutationen 2191D und 2370G, die in den drei anderen schlecht replizierenden HCV-RNA-Molekülen auftraten und deren negativer Einfluss auf die Replikation des Con1-Replikons gezeigt wurde, kamen in der R4-NS5A-Sequenz nicht vor (Abb. 3.19). Dennoch zeigte das chimäre Con1/AD78-R4-Replikon die schwächste Replikation aller untersuchten Konstrukte (Abb. 3.18). Daher wurde nach einzigartigen Sequenzmerkmalen im R4-NS5A-Abschnitt gesucht, die für die Inhibition der Replikation verantwortlich sein konnten. Zwei Mutationen, 2082P und 2152H wurden identifiziert, die nur in der R4-Sequenz vorkamen. Die Aminosäure Histidin an Position 2152 kam in drei von 99 NS5A-Sequenzen des Genotyps 1b in der HCV Sequence Database vor. Das Prolin an Position 2082 war hingegen nicht in natürlich vorkommenden Isolaten des HCV Genotyps 1b vertreten, was darauf hindeutete, dass diese Mutation tatsächlich die HCV-Replikation blockiert. Daraufhin wurde die Mutation 2082P in das Con1-Replikon und umgekehrt die Mutation 2082L in das Replikon Con1/AD78-R4 eingeführt und die mutierten Replikons Con1/2082P und Con1/AD78-R4/2082L wurden im Luciferasetest auf ihre Replikationsfähigkeit untersucht. Tatsächlich war das Con1-Replikons mit der Mutation 2082P nicht mehr in der Lage zu replizieren. Das Replikon Con1/AD78-R4 hingegen konnte mit der 2082L-Mutation ähnlich stark wie das ursprüngliche Con1-Replikon replizieren (Abb. 3.22, Tab. 3.4).

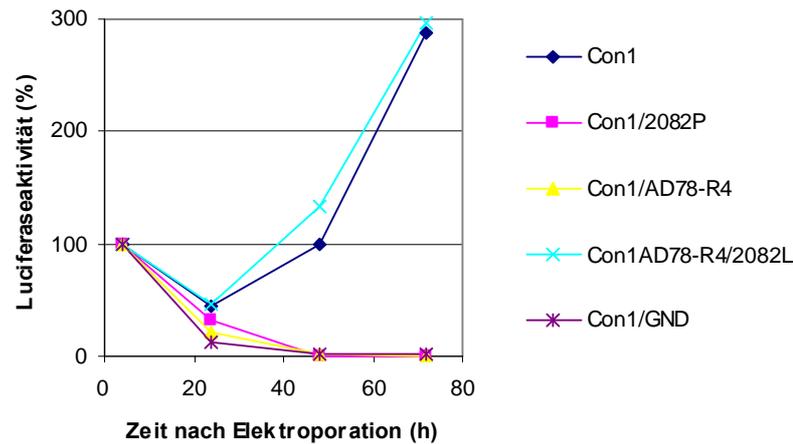


Abb. 3.22 Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Con1-Replikons (Con1), des Con1-Replikons mit einer Aminosäuremutation (Con1/2082P) und chimärer Con1/AD78-Replikons ohne und mit Aminosäuremutation (Con1/AD78-R4 und Con1/AD78-R4/2082L) im transienten Luciferasetest.

3.17 Untersuchung von Aminosäuremutationen in der NS5A-Region der Con1/AD78-HCV-Replikons mit potentiellm Einfluss auf die Hyperphosphorylierung

Zwei Formen des NS5A-Proteins, p56 mit 56 kDa Molekulargewicht und dessen hyperphosphorylierte Form p58 mit 58 kDa Molekulargewicht, sind bekannt. Durch vermehrte Bildung der p56-Form wird die Replikation des HCV begünstigt (1.6). Im *Western Blot*-Verfahren wurde gezeigt, dass das NS5A-Protein in HuH7-Zellen, die das Con1-Replikon enthielten, vorwiegend eine Größe von 58 kDa aufwies, während die NS5A-Proteine aus Zellen, die chimäre Con1/AD78-Replikons enthielten, 56 kDa groß waren (Abb. 3.8). Es bestand die Möglichkeit, dass diese Größenunterschiede durch Phosphorylierungen an Serinresten des Con1-NS5A-Proteins hervorgerufen wurden. In der Con1-NS5A-Sequenz befanden sich zwei Serinreste, die nur hier, nicht jedoch in den NS5A-Sequenzen aus AD78-Isolaten vorkamen. Diese konnten für die Hyperphosphorylierung und die Bildung der p58-Form des Con1-Proteins verantwortlich sein und somit auch die Replikation beeinflussen.

Daher wurden die Mutationen 2368P und 2336T einzeln und in Kombination in das Con1-Replikon eingeführt und so potentielle Hyperphosphorylierungsstellen an Serinresten eliminiert. Im Luciferaseassay wurde die Stärke der Replikation der RNA-Transkripte Con1/2368P, Con1/2336T und Con1/2368P/2336T bestimmt. Die Entfernung möglicher Hyperphosphorylierungsstellen im NS5A-Protein führte tatsächlich zu einer reproduzierbaren Steigerung der Replikation des Con1-Replikons (Abb. 3.23, Tab. 3.4).

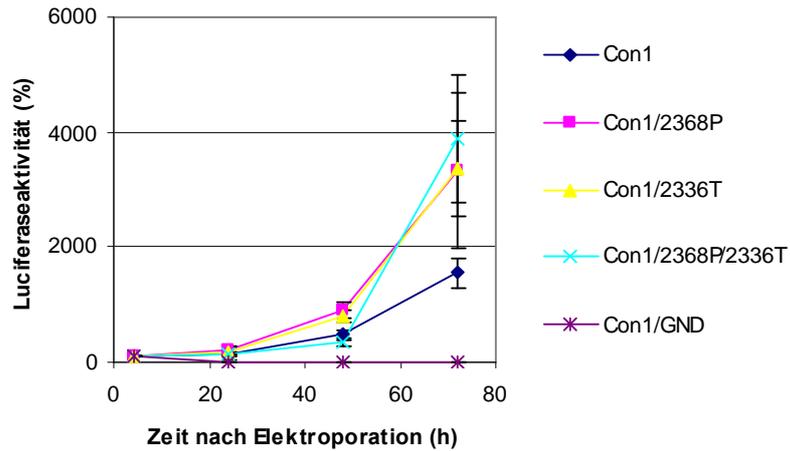


Abb. 3.23 Bestimmung der Replikationsfähigkeit des Con1-Replikons (Con1), des Con1-Replikons mit Aminosäuremutationen (Con1/2368P, Con1/2336T und Con1/2368P/2336T) und der Negativkontrolle Con1/GND im transienten Luciferasetest. Mittelwerte mit Standardabweichungen zweier Experimente sind dargestellt.

Dabei war die Eliminierung jedes einzelnen Serinrestes ausreichend, um diesen Effekt zu erzielen. Die Kombination beider Mutationen resultierte ebenfalls in einer stärkeren Replikation im Vergleich zum ursprünglichen Con1-Replikon, allerdings wurde kein synergistischer Effekt der Replikationssteigerung durch beide Mutationen im Vergleich zu den einzelnen Mutationen beobachtet.

4 Diskussion

4.1 Virusisolate des HCV-Stammes AD78 und das subgenomische HCV-Replikon zur Analyse verschiedener Eigenschaften des nichtstrukturellen HCV-Proteins NS5A

Eine Vielzahl von Studien hat sich mit dem Einfluss viraler Faktoren auf den Ausgang der Therapie einer HCV-Infektion mit Interferon- α und Ribavirin beschäftigt. Dabei wurde nach Analyse der Sequenzen natürlicher HCV-Isolate aus *Responder*- und *Nonresponder*-Patienten ein Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg und der Sequenz eines Bereiches des HCV-Proteins NS5A beschrieben (1.14). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des NS5A-Proteins für die Resistenz des HCV gegen IFN- α und Ribavirin erstmals anhand eng verwandter Varianten des Proteins untersucht. Dazu standen acht HCV-Isolate aus Patienten zur Verfügung, die mit demselben HCV-Stamm AD78 infiziert waren (Dittmann et al., 1991; Wiese et al., 2000). Vier dieser Patienten waren *Nonresponder* (NR1-NR4), die vier anderen *Responder* (R1-R4). Zwischen den einzelnen NS5A-Sequenzen, die aus den Patientenisolaten amplifiziert wurden, bestand zwischen 94,8% und 97,8% Homologie. Die Verwendung der verwandten NS5A-Proteine sollte den Vergleich der Sequenzen und die Identifizierung relevanter Aminosäurereste erleichtern. Zusätzlich konnten bestimmte Charakteristika der verschiedenen NS5A-Varianten, zum Beispiel ihr Einfluss auf die IFN-Resistenz, mit den Phänotypen der Patienten (*Responder* oder *Nonresponder*) in Relation gebracht werden.

Aus den Seren der acht Patienten wurden die verschiedenen NS5A-Fragmente amplifiziert und in ein HCV-Replikon kloniert. Dieses erst kürzlich entwickelte Replikon bietet gegenüber Systemen, bei denen einzelne HCV-Proteine mit Hilfe von Plasmiden in Hepatomzellen überexprimiert werden, den Vorteil, dass die nichtstrukturellen HCV-Proteine in physiologischeren Konzentrationen exprimiert werden und so eher eine natürliche HCV-Infektion widerspiegelt wird. Zusätzlich liegen die nichtstrukturellen Proteine des HCV, die ihre Funktion häufig nur im Komplex miteinander erfüllen, gleichzeitig in den Wirtszellen vor. So sind zum Beispiel die nichtstrukturellen Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B gemeinsam an der Bildung des Replikationskomplexes des HCV beteiligt (Appel et al., 2005; Gosert et al., 2003; Penin et al., 2004). Durch die Klonierung der Reihe von NS5A-Fragmenten in das Replikon konnte das Protein NS5A im gleichbleibenden Kontext der weiteren nichtstrukturellen HCV-Proteine gesondert betrachtet werden.

Die Replikation des verwendeten subgenomischen HCV-RNAs auf Basis des Stammes Con1 war bereits durch sogenannte adaptive Mutationen an die Bedingungen in HuH7-Zellen angepasst. Diese Aminosäuremutationen verstärken die Replikation der subgenomischen HCV-Moleküle bis zu 200-fach (Lohmann et al., 2003). In das Con1-Replikon als Grundgerüst wurden Fragmente des NS5A-Proteins vom HCV-Stamm AD78 kloniert. Da die adaptiven Mutationen des Con1-Replikons außerhalb der NS5A-Region lagen, sollte es auch die Insertion der fremden NS5A-Abschnitte tolerieren und weiterhin in der Lage sein zu replizieren, zumal der AD78-Stamm wie der Con1-Stamm

dem HCV-Subtyp 1b angehört. Tatsächlich waren sechs der acht Replikonstrukte, die NS5A-Fragmente des Stammes AD78 enthielten, in der Lage zu replizieren. In den etablierten Zelllinien konnte sowohl die RNA des subgenomischen HCV-Replikons als auch das exprimierte NS5A-Protein nachgewiesen werden.

4.2 Die Bedeutung des NS5A-Proteins für die Resistenz des HCV gegen IFN- α

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Einfluss des NS5A-Proteins auf die IFN-Resistenz des HCV anhand einer Reihe von Replikons auf Basis des HCV-Stammes Con1 untersucht, die NS5A-Fragmente des Stammes AD78 aus *Responder* und *Nonresponder*-Isolaten enthielten. Dazu wurden Zelllinien verwendet, in denen die chimären HCV-Replikons durch Verwendung eines Selektionsmarkers dauerhaft replizierten. Man hätte erwarten können, dass die langfristige Kultivierung dieser HuH7-Zellen zu Mutationen in der NS5A-Region führte, durch die sich die Replikation der HCV-RNA an die intrazellulären Bedingungen anpasste. Solche Mutationen hätten die Eigenschaften der verschiedenen Replikons verändern können. Alle NS5A-Sequenzen waren jedoch nach der Transfektion der Zellen identisch zur vorherrschenden Sequenz der ursprünglichen HCV-Isolate und blieben über einen Zeitraum von fünf Monaten stabil. Dieses Ergebnis bestätigt eine ähnliche Untersuchung, bei der die Sequenz eines ebenfalls auf dem Con1-Stamm basierenden Replikons mit der adaptiven Mutation K2040 über einen Zeitraum von sechzehn Monaten unverändert blieb (Sumpter et al., 2004). Somit enthielten die untersuchten NS5A-Proteine immer noch die ursprünglichen Sequenzen, die auch in den jeweiligen Patienten vorherrschend vorlagen, und mit den Replikons erzielte Ergebnisse konnten weiterhin mit den Phänotypen der Patienten in Verbindung gebracht werden.

Die Bestimmung der IFN- α -Resistenz der Replikation von sechs Replikons, die in der Lage waren in HuH7-Zellen zu replizieren, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen chimären Con1/AD78-Replikons und zwischen den Gruppen der Replikons mit NS5A-Fragmenten von *Respondern* und *Nonrespondern*. Auch zum ursprünglichen Con1-Replikon bestand keine wesentliche Abweichung in der IFN-Resistenz, obwohl sich die NS5A-Sequenzen des AD78-Stammes in mindestens 21 Aminosäurepositionen von der Sequenz des Con1-NS5A-Proteins unterschieden, das heißt zu 94,3% bis 95,4% homolog zur Con1-Sequenz waren. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das NS5A-Protein in HuH7-Zellen nicht diejenige virale Komponente ist, die wesentlich die Resistenz der HCV-Replikation gegen IFN- α bestimmt, da Replikons mit NS5A-Sequenzen aus *Responder*- und *Nonresponder*-Patienten eine ähnliche IFN-Sensitivität aufwiesen. In Studien, bei denen das NS5A-Protein in Zellen überexprimiert wurde, wurde bereits eine Interaktion des NS5A-Proteins mit der PKR, durch die die IFN-Antwort gehemmt wird, festgestellt (1.14). Möglicherweise nimmt NS5A auch während einer HCV-Infektion über diesen Mechanismus Einfluss auf die IFN-Antwort. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass bei einer Proteinexpression, die eher den natürlichen Bedingungen entspricht, der Einfluss des NS5A-Proteins gering ist.

Zur korrekten Interpretation des Ergebnisses muss man auch bedenken, dass nicht feststeht, ob die vier Virusisolate, die aus NR-Patienten gewonnen wurden, tatsächlich IFN-resistente Virusvarianten darstellten, die in der Quasispecies vorkamen, mit der die Patienten infiziert worden waren, oder die als Folge der IFN-Therapie selektiert worden waren. Der beobachtete Misserfolg der Therapie konnte

auch durch Wirtsfaktoren begründet gewesen sein (Gao et al., 2004). Möglicherweise konnten daher auch NS5A-Proteine, die auf *Nonresponder*-Isolate zurückzuführen waren, keine Resistenz gegen IFN- α vermitteln, was aber nicht ausschließt, dass es resistente NS5A-Varianten geben kann.

Hinzu kommt noch, dass die verwendeten HuH7-Zellen möglicherweise nicht die adäquaten Bedingungen lieferten, damit sich die biologischen Eigenschaften aller HCV-Proteine entfalten konnten und z. B. das NS5A-Protein den antiviralen Effekten des IFN erfolgreich entgegenwirken konnte. Daher würde es sehr zur Klärung der Rolle des NS5A-Proteins in der IFN-Resistenz des HCV beitragen, wenn die hier durchgeführte Untersuchung auf andere Zelllinien ausgeweitet würde.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das NS5A-Protein seine Eigenschaft, die IFN-Antwort zu beeinflussen, erst auf Ebene des Organismus' entfaltet. Es wurde bereits gezeigt, dass NS5A die Expression von Interleukin 8 (IL-8) induzieren kann (Polyak et al., 2001). Dieses Cytokin entfaltet seine Wirkung erst im Zusammenspiel mit Zellen des Immunsystems im gesamten Organismus, wodurch die antiviralen Effekte von IFN- α inhibiert werden. Sollte die IL-8-Induktion durch NS5A ein entscheidender Mechanismus sein, mit dem das HCV der antiviralen Wirkung des IFN entgeht, so würde das auch den scheinbaren Widerspruch des hier auf zellulärer Ebene erzielten Ergebnisses zu einer kürzlich publizierten Metaanalyse erklären, die einen Zusammenhang zwischen der NS5A-Sequenz natürlicher HCV-Isolate und dem Ausgang der IFN-Therapie postulierte (Schinkel et al., 2004).

Ein entscheidender Schritt, um die Abläufe einer HCV-Infektion und die Entwicklung der IFN-Resistenz des HCV in seiner Gesamtheit zu verstehen, ist mit der Entwicklung eines Zellkultursystems gelungen, in dem gesamtgenomische HCV-Moleküle replizieren und es zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln kommt (1.7). Dieses System eröffnet auch neue Perspektiven zur Erforschung von Eigenschaften des NS5A-Proteins einschließlich seines potentiellen Beitrags zur IFN-Resistenz des HCV.

4.3 Generierung IFN- α -resistenter Con1/AD78-HCV-Replikons

Um den Einfluss des NS5A-Proteins auf die IFN-Resistenz weiter zu untersuchen, wurde versucht, resistente Varianten der chimären Con1/AD78-Replikons, die verschiedene NS5A-Bereiche enthielten, zu generieren. Dazu wurden HuH7-Zellen, die mit den Replikons transfiziert waren, über einen Zeitraum von mehreren Wochen mit verschiedenen IFN- α -Konzentrationen behandelt. Gleichzeitig wurden durch G418-Behandlung Zellen selektiert, in denen die HCV-RNA-Moleküle replizierten.

Relativ niedrige IFN-Konzentrationen führten nicht zur Bildung IFN-resistenter Varianten der HCV-Replikons. Vermutlich waren die verwendeten Konzentrationen zu niedrig um einen Selektionsdruck auszuüben, der Mutationen in der Replikon-RNA zur Aufrechterhaltung der Replikation erforderte.

Weiterhin wurden drei Zelllinien mit steigenden IFN-Konzentrationen behandelt, so dass am Ende der Behandlung eine Konzentration von 128 IU/ml erreicht wurde. Bei dieser relativ hohen Konzentration wurde die Replikation der HCV-RNA effizient gehemmt wird, wenn sie direkt zu den Zelllinien ohne IFN-Vorbehandlung gegeben wurde, dennoch überlebten alle drei Zelllinien. Es blieb aber offen, ob tatsächlich die Replikation der viralen RNA resistent gegen IFN- α geworden war oder ob eine Resistenz auf Ebene der Wirtszellen vorlag. Durch Retransfektionsexperimente, bei denen naive

HuH7-Zellen mit Gesamt-RNA einschließlich Replikon-RNA aus den IFN-resistenten Zellen transfiziert wurden, und anschließender Resistenzbestimmung wurde jedoch gezeigt, dass die Replikation der HCV-RNA unverändert sensitiv für die Wirkung von IFN- α war. Folglich war das beobachtete Überleben der HuH7-Zellen auf eine Resistenz der Zellen gegen IFN- α zurückzuführen.

Ein möglicher zellulärer Faktor, der die IFN- α -Antwort beeinflussen kann, ist der Typ I-IFN-Rezeptor (1.11). Sowohl eine geringere mRNA-Expression der beiden Ketten IFNAR 1 und IFNAR 2 des Rezeptors als auch Mutationen oder Deletionen im IFN-Rezeptor würden die antiviralen Effekte, die durch das Interferon ausgelöst werden, einschränken. Allerdings wurde gezeigt, dass in den IFN-resistenten Zelllinien mit HCV-Replikons keine Veränderungen der mRNA-Levels oder Mutationen des IFN-Rezeptors vorlagen. Verkürzte PCR-Fragmente, die zunächst auf Deletionen hindeuteten, stellten sich nach Optimierung der PCR-Bedingungen als Artefakte heraus. Das erklärt möglicherweise den Widerspruch zu einer Studie, in der Deletionen im IFN-Rezeptor nach IFN-Langzeitbehandlung von Replikon-enthaltenden Zellen beobachtet wurden (Naka et al., 2005). Außerdem wurde in der erwähnten Studie eine höhere Konzentration von 400 IU/ml IFN- α verwendet, was eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Experimente liefern könnte. Das Ergebnis in der vorliegenden Arbeit legt nahe, dass Veränderungen anderer zellulärer Faktoren oder Signalübertragungswege die beobachtete Resistenz replikonenthaltender HuH7-Zellen vermitteln. So zeigte zum Beispiel kürzlich eine Studie, dass die Langzeitbehandlung von Hepatomzellen mit IFN- α zur Selektion von Zellen mit verändertem Jak-STAT-Signalübertragungsweg führen kann (Zhu et al., 2005).

Auch anderen Forschungsgruppen gelang es nicht, mit subgenomischen HCV-RNA-Molekülen, die auf Sequenzen des HCV-Stammes Con1 basierten, und unter leicht veränderten Bedingungen, wie anderen IFN- α -Konzentrationen oder Behandlungszeiträumen, IFN-resistente Varianten des HCV-Replikons herzustellen (Guo et al., 2001; 2003; Naka et al., 2005). Die hier erzielten Ergebnisse bestätigen die in diesen Studien gemachten Beobachtungen. Allerdings bedeutet das nicht, dass auch Replikons mit Sequenzen anderer HCV-Stämme oder Genotypen nicht resistent gegen IFN- α sind bzw. keine Resistenz ausbilden können. So gelang zum Beispiel während der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen die Etablierung eines subgenomischen Replikons mit dem HCV-Abschnitt von der NS3-Region bis zum 3'-Ende, der aus Sequenzen des AD78-Stammes bestand. Dieses Replikon replizierte sowohl in HuH7-Zellen als auch in der myeloleukämischen Zelllinie L-41. Die Replikation dieses Replikons war in beiden Zelllinien resistent gegen die antivirale Wirkung von IFN- α , ohne dass die Wirtszelllinien mit IFN- α vorbehandelt worden waren (unveröffentlichte Ergebnisse, Oniangue-Ndza, C., Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen).

Weiterhin muss man bedenken, dass möglicherweise nur bei Expression aller HCV-Proteine einschließlich der strukturellen Proteine Mechanismen in Gang gesetzt werden, die zur Resistenz gegen die durch IFN- α ausgelösten antiviralen Effekte führen, oder diese Mechanismen erst auf der Ebene des gesamten Organismus greifen. Daher wird die Entwicklung eines Zellkultursystems, in dem gesamtgenomische HCV-Moleküle replizieren und infektiöse Partikel gebildet werden (Wakita et al., 2005; Lindenbach et al., 2005; Zhong et al., 2005) eine komplettere Analyse der Abläufe während einer HCV-Infektion erlauben und auch zur Aufklärung der Hintergründe der IFN-Resistenz beitragen.

4.4 Der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Ribavirin-Resistenz des HCV

Ribavirin (RBV) wird HCV-Patienten in Kombination mit IFN- α verabreicht und erhöht die Erfolgsquoten gegenüber einer IFN-Monotherapie (McHutchinson et al., 1998; Poynard et al., 1998). Daher würde auch eine Resistenz gegen die antivirale Wirkung des RBV zum Misserfolg der Kombinationstherapie gegen eine HCV-Infektion beitragen. Um zu erklären wie das NS5A-Protein die Wirkung des RBV beeinflussen kann, muss man zunächst die Wirkungsweise des RBV verstehen. Das RBV hemmt die HCV-RNA-Polymerase NS5B (Maag et al., 2001) und ein fehlerhafter Einbau des RBV durch die NS5B-Polymerase in neu synthetisierte Virusgenome führt zu einer Quasispezies, die nicht mehr zur Replikation fähig ist (Contreras et al., 2002). Für das NS5A-Protein ist wiederum bekannt, dass es mit der NS5B-Polymerase interagiert (Shirota et al., 2002) und so ihre Genauigkeit erhöht (Shimakami et al., 2004). Auf ähnliche Weise könnte die Bindung des NS5A-Proteins an NS5B auch bewirken, dass die Inhibition der Polymeraseaktivität verhindert wird oder RBV nicht mehr fälschlicherweise als Substrat der NS5B-Polymerase verwendet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss mehrerer eng verwandter NS5A-Proteine auf die RBV-Resistenz des HCV untersucht. Dazu wurde mit der etablierten Reihe von Zelllinien, die die chimären Con1/AD78-Replikons mit verschiedenen NS5A-Varianten enthielten, die Resistenz der Replikation der HCV-RNA gegen RBV bestimmt. Alle Replikonkonstrukte wiesen eine ähnliche konzentrationsabhängige Sensitivität der Replikation gegen RBV auf. Auch hier galt wie bei der Resistenzbestimmung mit IFN- α , dass das NS5A-Protein möglicherweise nicht die virale Determinante ist, die die Resistenz gegen RBV bestimmt. Weiterhin muss man bedenken, dass mit einem subgenomischen HCV-Replikon gearbeitet wurde, das Sequenzen zweier HCV-Stämme des Genotyps 1b enthielt. Es ist durchaus möglich, dass HCV-Sequenzen anderer HCV-Stämme oder Genotypen RBV-Resistenz aufweisen oder dass erst bei einer Expression aller HCV-Proteine ein Mechanismus greift, der die antivirale Wirkung des RBV hemmt.

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Zellkulturen, die mit HCV-Replikons transfiziert waren, unter dem Einfluss von RBV die Aminosäuremutation Gly2376Ser in der NS5A-Region auftrat, die eine Resistenz der Zellkultur gegen RBV vermittelte (Pfeiffer und Kirkegaard, 2005). Diese Mutation war auch in dem NS5A-Fragment des hier verwendeten Replikons Con1/AD78-NR1 enthalten. Die Replikation dieses Replikons wies jedoch wie die anderen HCV-RNA-Konstrukte keine Resistenz gegen RBV auf. So konnte als wesentliche Ergänzung zu der oben erwähnten Studie gezeigt werden, dass die Mutation Gly2376Ser zwar eine zelluläre Resistenz gegen RBV, jedoch keine Resistenz der Virusreplikation gegen RBV vermitteln kann.

4.5 RBV-Langzeitbehandlung von HuH7-Zellen zur Generierung resistenter Replikonvarianten

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde versucht durch die Langzeitbehandlung replikontransfizierter Zelllinien RBV-resistente Varianten der chimären Con1/AD78-Replikons zu generieren, um anhand dieser RNA-Moleküle Eigenschaften des NS5A-Proteins mit Bedeutung für die RBV-Resistenz zu identifizieren.

Die Inkubation bei relativ niedrigen RBV-Konzentrationen führte wie bei relativ niedrigen IFN-Konzentrationen nicht zur Bildung resistenter Varianten der HCV-Replikons. Vermutlich waren auch

hier die verwendeten Konzentrationen zu niedrig um einen Selektionsdruck auszuüben, der Mutationen in der Replikon-RNA erforderte.

Die Behandlung mit einer relativ hohen RBV-Konzentration überlebte nur eine von vier Zelllinien ohne wesentliche Beeinträchtigung im Wachstum, während alle anderen Zelllinien nach wenigen Tagen abgestorben waren. Diese Zelllinie enthielt das Replikon mit der Aminosäure Serin an Position 2376 des NS5A-Proteins. Für diese Mutation wurde bereits gezeigt, dass sie zu einem geringen Maße zum Überleben der Wirtszelle bei Inkubation mit RBV beitrug (Pfeiffer und Kirkegaard, 2005). Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Mutation auch in der Sequenz eines natürlichen Isolats des HCV-Stammes AD78 zur Resistenz beiträgt und nicht nur unter experimentellen Bedingungen in Zellkultur auftritt.

In der erwähnten Studie wurde jedoch nicht untersucht, ob sich die Resistenz auf zellulärer Ebene ausgebildet hatte oder ob die Replikation der HCV-RNA resistent gegen RBV geworden war. Um dies zu analysieren, wurden naive HuH7-Zellen mit Gesamt-RNA aus der RBV-resistenten Zelllinie transfiziert. Die Replikation der HCV-RNA war danach wieder sensitiv für die antivirale Wirkung des RBV. Das zuvor beobachtete Überleben der HuH7-Zellen war also auf die Bildung einer zellulären Resistenz zurückzuführen, die auch die subgenomische HCV-RNA gegen die Wirkung des RBV abschirmte. Obwohl also die Replikation der HCV-RNA selber nicht resistent gegen RBV war, schien die spezielle Variante des NS5A-Proteins es der Wirtszelle zu ermöglichen, eine RBV-Resistenz auszubilden. Der genaue Mechanismus, der die Grundlage für diese Eigenschaft des NS5A-Proteins bildet, bleibt allerdings unbekannt und seine Erforschung stellt eine große Herausforderung dar, wenn man bedenkt, dass dem NS5A-Protein eine Vielzahl von Eigenschaften und Interaktionspartnern zugeschrieben wird (Macdonald und Harris, 2004).

Zusammenfassend ist es nicht gelungen RBV-resistente Varianten von subgenomischen HCV-Replikons herzustellen. Dennoch war das virale Protein NS5A an der Ausbildung einer zellulären Resistenz in Zellkultur beteiligt. Die klinische Relevanz dieser Eigenschaft für die Entwicklung einer Resistenz gegen die HCV-Therapie bleibt allerdings zweifelhaft, da die Mutation, die die RBV-Resistenz vermittelte außer in der hier verwendeten AD78-Sequenz nur noch einmal in einem natürlich vorkommenden Isolat des HCV-Stammes MD34 vom Genotyp 1b gefunden wurde (Nagayama et al., 2000; NCBI-Zugriffsnummer AF208024). Außerdem wurde in dem durchgeführten Experiment mit einer RBV-Konzentration von 300 μM gearbeitet, wohingegen während der Kombinationstherapie von HCV-Patienten mit IFN- α und RBV lediglich eine RBV-Plasmakonzentration von ca. 15 μM erreicht wird (Jen et al., 2000).

4.6 Der Einfluss von HCV-Replikons mit verschiedenen NS5A-Fragmenten in HuH7-Zellen auf die TNF- α -induzierte Apoptose

Die Apoptose ist ein Prozess, bei dem ein programmierter Zelltod eingeleitet wird, um zum Beispiel virusinfizierte Zellen zu eliminieren. Sie wird unter anderem durch den Tumornekrosefaktor TNF- α ausgelöst (1.7). Für das NS5A-Protein des HCV ist bekannt, dass es bei Überexpression in Hepatomzellen durch Interaktion mit dem Adaptorprotein TRADD des durch TNF- α ausgelösten

Signaltransduktionsweges die Apoptose hemmen kann (Ghosh et al., 2000; Chung et al., 2003; Miyasaka et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde die apoptoseinduzierende Wirkung des TNF- α auf HuH7-Zellen, die mit subgenomischen HCV-Replikons transfiziert waren, untersucht. Dabei wurden Replikons verwendet, die verschiedene NS5A-Fragmente enthielten. So konnte erstens der antiapoptotische Effekt des NS5A-Proteins untersucht werden, wenn es in physiologischeren Konzentrationen in den Zellen vorlag und es zudem im Kontext mit anderen nichtstrukturellen Proteinen des HCV exprimiert wurde. Zweitens konnte ein möglicher Unterschied in der apoptosehemmenden Wirkung verschiedener NS5A-Varianten untersucht werden.

Nach Stimulation mit TNF- α war die Lebendzellrate als Maß für die Apoptose bei den replikoninfizierten Zellen deutlich geringer als bei den naiven HuH7-Zellen. Vermutlich waren Zellen mit Replikons anfälliger für die durch TNF- α ausgelöste Induktion des Zelltods, da hier wie bei einer natürlichen Infektion HCV-RNA replizierte und virale Proteine exprimiert wurden. So wurde möglicherweise ein antiapoptotischer Effekt des NS5A-Proteins überdeckt. Allerdings zeigten die transfizierten Zelllinien, deren Replikons sich nur in der NS5A-Region unterschieden, nach der TNF- α -Behandlung leichte Unterschiede in der Lebendzellrate. Das könnte darauf hindeuten, dass die verschiedenen NS5A-Proteine eine unterschiedlich hemmende Wirkung auf die apoptoseinduzierende Wirkung des TNF- α hatten und NS5A durchaus zu einem gewissen Maß die Apoptose inhibiert. Diese Eigenschaft des NS5A könnte ein unterstützender Baustein in der Reihe von Mechanismen sein, durch die das HCV der Immunantwort entgeht und im Wirt überdauert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Abweichungen in der Lebendzellrate auf veränderte Phänotypen der Wirtszelllinien nach mehreren Monaten der Kultivierung zurückzuführen waren und daher die antiapoptotische Wirkung des NS5A-Proteins bei physiologischer intrazellulärer Expression sowohl in replikontransfizierten HuH7-Zellen als auch während einer natürlichen HCV-Infektion zu vernachlässigen ist.

4.7 Identifizierung von Aminosäuren des NS5A-Proteins mit Bedeutung für die Replikation des HCV

Das NS5A-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Replikation des HCV. Es ist zusammen mit weiteren nichtstrukturellen HCV-Proteinen und der viralen RNA an einer speziellen cytoplasmatischen Membranstruktur lokalisiert (Egger et al., 2002; Mottola et al., 2002). Hier interagiert es mit anderen nichtstrukturellen HCV-Proteinen (Lin et al., 1997; Shirota et al., 2002) und bildet den Replikationskomplex des HCV, der die Replikation des Virusgenoms katalysiert (Gosert et al., 2003). Die große Bedeutung des NS5A-Proteins für die Replikation des HCV wird dadurch unterstrichen, dass Aminosäuremutationen in der NS5A-Region die Replikation der HCV-RNA bis zu 20.000-fach erhöhen können (Blight et al., 2001; Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001).

In einem Teil der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Reihe der chimären Con1/AD78 HCV-Replikons der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Replikation untersucht. Um die Replikationspotentiale der verschiedenen Konstrukte bestimmen zu können, wurde mit Replikons gearbeitet, die ein Luciferasegen enthielten. Nach der Transfektion der Replikon-RNA in HuH7-Zellen

startete die Replikation und proportional dazu die Expression der Luciferase. Dieses Enzym setzt ein Substrat um, wobei Licht emittiert wird, welches stellvertretend für die Replikation gemessen wird.

Die chimären Replikons mit verschiedenen NS5A-Bereichen replizierten unterschiedlich stark. Einige replizierten beinahe im gleichen Maße wie das ursprüngliche Con1-Replikon, andere waren nicht mehr in der Lage zu replizieren. HuH7-Zellen, die mit dem Replikon Con1/AD78-R4 transfiziert waren, welches im Luciferaseassay die geringste Replikation aufwies, waren auch mit dem entsprechenden Replikon mit Selektionsmarker nicht in der Lage, Kolonien bei G418-Selektion zu bilden. Die Replikation der Luciferase-Replikons Con1/AD78-R3 und Con1/AD78-NR1 ließ stetig nach, dennoch konnten nach Transfektion mit den entsprechenden Neo-Konstrukten HuH7-Zelllinien etabliert werden, die dauerhaft die subgenomische HCV-RNA enthielten. Folglich hemmte der Einfluss der NS5A-Fragmente des AD78-Stammes im Con1-Kontext der Replikons zwar die Replikation, sie konnte jedoch auf einem niedrigen Niveau aufrechterhalten werden. Scheinbar erfolgte im Laufe der Kultivierung der HuH7-Zellen eine Anpassung der Replikation an die intrazellulären Bedingungen, da die Mengen der verschiedenen Replikon-RNAs in den Zellen vergleichbar waren. Diese Anpassung fand aber nicht auf der Ebene der Aminosäuresequenz des NS5A-Proteins statt, da die Sequenzen stabil blieben. Das Replikon Con1/AD78-NR4 zeigte zwar im Luciferaseassay eine leicht steigende Replikation, dennoch waren HuH7-Zellen nach Transfektion mit dem entsprechenden RNA-Konstrukt, das das Neomycinphosphotransferasegen enthielt, nicht zur Koloniebildung fähig. Vermutlich liegt die Erklärung hierfür in Schwierigkeiten während der Selektion der HuH7-Zellen, die mit dem Neo-Replikon transfiziert worden waren.

Die enge Verwandtschaft der verwendeten NS5A-Sequenzen, die aus dem gleichen Isolat, das heißt aus einer einzigen Quasispezies hervorgegangen waren, erlaubte die Identifikation von Sequenzunterschieden des NS5A-Proteins mit Bedeutung für die Replikation. An einigen Positionen von NS5A traten bestimmte Aminosäuren vorwiegend in den schlechter replizierenden Replikonkonstrukten auf. Um den Einfluss dieser Mutationen genauer zu untersuchen, wurden sie in das am besten replizierende ursprüngliche Con1-Replikon eingeführt. Die Messung der Replikationspotentiale resultierender Replikons zeigte, dass die Mutationen 2382A, 2191D und 2370G einzeln keinen Einfluss auf die Replikation hatten. Allerdings wurde die Replikation des Con1-Replikons durch die Mutationen 2191D und 2370G in Kombination miteinander vollständig ausgeschaltet. Umgekehrt konnte jedoch die Replikation eines Replikons mit einer NS5A-Sequenz des AD78-Stammes, das zunächst die beiden Mutationen 2191D und 2370G enthielt, durch Einführung der in der Con1-Sequenz an diesen Positionen vorhandenen Aminosäuren nicht wiederhergestellt werden.

Ein weiteres Replikon, das nicht zur Replikation fähig war, nahm eine außergewöhnliche Stellung innerhalb der chimären Replikonkonstrukte ein, da dessen NS5A-Abschnitt nicht die beiden Mutationen 2191D und 2370G enthielt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass andere Sequenzmerkmale dieses NS5A-Proteins die Replikation verhinderten. Zwei Aminosäuremutationen, 2082P und 2152H, wurden gefunden, die ausschließlich in der NS5A-Sequenz dieser NS5A-Variante auftraten. Somit kam ein negativer Einfluss dieser Mutationen auf die Replikation in Frage. Eine der beiden Mutationen, 2082P, kommt nicht in natürlich vorkommenden HCV-Isolaten des Genotyps 1b vor, was darauf hindeutete, dass diese Mutation sich tatsächlich negativ auf die HCV-Replikation

auswirkt. Daher wurde die Aminosäure Prolin an die NS5A-Position 2082 in das Con1-Replikon eingebracht. Das resultierende Replikon war tatsächlich nicht mehr in der Lage zu replizieren. Umgekehrt konnte die Fähigkeit zu replizieren des chimären Con1/AD78-Replikons mit der 2082P-Mutation durch Einführung der in der Con1-Sequenz an dieser Position vorkommenden Aminosäure Leucin wiederhergestellt werden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine einzelne Aminosäuremutation einen erheblichen Einfluss auf die Replikation des subgenomische HCV-Replikons haben kann (Blight et al., 2001; Krieger et al., 2001; Lohmann et al., 2001).

Eine Bedeutung der drei hier identifizierten Aminosäuremutationen innerhalb von NS5A-Sequenzen des HCV-Subtypes 1b für die Replikation wurde bisher nicht beschrieben. Um eine Erklärung für ihren Einfluss auf die Replikation des HCV zu finden, wurde untersucht, ob sich die Mutationen in funktionell wichtigen Regionen des NS5A-Proteins befinden. Die Mutation an Aminosäureposition 2082 liegt innerhalb eines 57 Aminosäuren langen Abschnitts des NS5A-Proteins, der für die Bindung mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase NS5B des HCV verantwortlich ist (Shirota et al., 2002). Die Interaktion der beiden Proteine ist kritisch für die Replikation des HCV (Shimakami et al., 2004). Diese Beobachtungen zusammen mit dem hier erzielten Ergebnis legen nahe, dass die Aminosäure Prolin statt Leucin an der Position 2082 die Bindung der beiden HCV-Proteine so verändert, dass die Replikation verhindert wird. Allerdings ist die klinische Bedeutung dieser Mutation fraglich, da die Aminosäure Prolin an dieser Position in natürlichen Isolaten des HCV Genotyps 1b nicht vorkommt. Vermutlich trat die 2082P-Mutation in der verwendeten AD78-Sequenz nur aufgrund einer fehlerhaften Amplifikation des NS5A-Fragments aus dem Patientenserum auf, da das Virus auch im Patienten replikationsinkompetent gewesen wäre.

Die Aminosäureposition 2191, die in Kombination mit der Position 2370 die Replikation beeinflusste, liegt nur fünf Aminosäurereste entfernt von einer Region, in der sich mehrere Serinreste befinden. An diesen Serinresten wird ein Teil der intrazellulär exprimierten NS5A-Proteine hyperphosphoryliert (Abb. 1.2). Eine große Menge der hyperphosphorylierten Form des NS5A-Proteins hemmt wiederum die Replikation (Neddermann et al., 2004). Ein Einfluss der Aminosäuremutation an Position 2191 auf die Replikation wurde nur in Zusammenhang mit einer Mutation an Position 2370 beobachtet. Da beide Positionen 179 Aminosäuren auseinander liegen, bestehen möglicherweise zwischen ihnen Interaktionen auf Ebene der Sekundär- oder Tertiärstruktur, die die Hyperphosphorylierung des NS5A-Proteins an Serinresten in der Nähe der Position 2191 und als Folge davon auch die Replikation des HCV beeinflussen können. Auch die Relevanz der Kombination dieser beiden Mutationen ist vermutlich für die Klinik eher gering, da sie ausschließlich im HCV-Stamm AD78 auftritt.

Zusammenfassend betonen die erzielten Ergebnisse dennoch die große Bedeutung des NS5A-Proteins für die Replikation des HCV. Zukünftige Untersuchungen von Veränderungen an den drei beschriebenen Positionen könnten auch häufiger auftretende Mutationen aus natürlichen Isolaten mit der Replikationsfähigkeit des HCV in Verbindung bringen. Außerdem können die hier identifizierten Mutationen im NS5A-Protein, die die Replikationsfähigkeit vollständig zerstören, bei der Entwicklung eines attenuierten viralen HCV-Impfstoffes hilfreich sein.

4.8 Identifizierung neuer potentieller Hyperphosphorylierungsstellen des NS5A-Proteins

Das NS5A-Protein liegt in zwei Formen vor, der basal phosphorylierten p56-Form und der hyperphosphorylierten p58-Form. Die Hyperphosphorylierung findet an mehreren Serinresten im zentralen Bereich des Proteins statt (Tanji et al., 1995). Interessanterweise betreffen adaptive Mutationen, die die Replikation subgenomischer HCV-Moleküle in Zellkultur verbessern, unter anderem eben jene Serinreste im zentralen Bereich des NS5A-Proteins, an denen es hyperphosphoryliert wird (Blight et al., 2000). Durch die adaptiven Mutationen wird die Bildung der p58-Form des NS5A-Proteins reduziert. Diese Beobachtung legt nahe, dass die hyperphosphorylierte Form des NS5A-Proteins für die Replikation nicht benötigt wird und sie sogar einschränkt.

Obwohl es nicht Hauptthema dieser Arbeit war, fiel auf, dass der überwiegende Teil des Con1-NS5A-Proteins ein größeres Molekulargewicht aufwies als die NS5A-Varianten des Stammes AD78. Bei den zwei unterschiedlichen Größen konnte es sich um die beiden Formen p56 und p58 handeln und somit lag die Con1-Version des NS5A möglicherweise in hyperphosphorylierter Form vor. Dennoch replizierte das Con1-Replikon ähnlich stark wie gut replizierende chimäre AD78/Con1-Replikonkonstrukte. Eine Reduzierung der hyperphosphorylierten Form des NS5A-Proteins hätte die Replikation des Con1-Replikons jedoch noch steigern können. In der Con1-Sequenz wurden zwei Serinreste identifiziert, die nur hier, nicht jedoch in den AD78-Sequenzen gefunden wurden. Daher kamen diese als potentielle Hyperphosphorylierungsstellen in Frage. Der Austausch der Serinreste in der Con1-Sequenz durch in der AD78-Sequenz vorkommende Aminosäuren führte zu einer stärkeren Replikation des Con1-Replikons in HuH7-Zellen. Möglicherweise waren also durch den Austausch der Serinreste tatsächlich Hyperphosphorylierungsstellen entfernt worden und durch eine Verringerung der Menge an p58-Form des NS5A-Proteins die Replikation des HCV-Replikons verstärkt worden. Die beiden hier analysierten Serinreste an den Positionen 2336 und 2370 lagen 132 bzw. 166 Aminosäuren entfernt von dem schon bekannten Bereich des NS5A-Proteins, in dem die Hyperphosphorylierung stattfindet (Macdonald und Harris, 2004) und wurden bislang noch nicht im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des NS5A-Proteins erwähnt.

Allerdings war die Expression des NS5A-Proteins in den für diese Experimente transfizierten HuH7-Zellen zu gering um das NS5A-Protein im *Western-Blot*-Verfahren nachzuweisen. Ein geringeres Molekulargewicht der NS5A-Varianten nach Austausch der Serinreste muss mittels eines Replikonsystems mit höherer Proteinexpression noch gezeigt werden. Dies würde bestätigen, dass es sich bei den Serinresten an den Positionen 2336 und 2370 um neu identifizierte Hyperphosphorylierungsstellen des NS5A-Proteins handelt, die wichtig für die Regulation der Replikation des HCV sind und in der Entwicklung eines attenuierten viralen HCV-Impfstoffes Verwendung finden könnten.

5 Zusammenfassung

Seit kurzem ist es möglich das Hepatitis C Virus in Zellkulturen zu vermehren. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Interferon- α die Replikation des Virus *in vitro* effektiv hemmen kann. Dennoch sprechen *in vivo* nicht alle Patienten, die mit dem HCV infiziert sind, auf eine Therapie mit IFN- α in Kombination mit Ribavirin an. Dabei ist unklar, ob Wirts- oder Virusfaktoren für diese Art der Resistenz verantwortlich sind. Ein potentieller viraler Faktor, für den ein Einfluss auf den Therapieerfolg postuliert wurde, ist das HCV-Protein NS5A. Um diese Hypothese auf molekularer Ebene zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiger methodischer Ansatz gewählt. Dazu standen Seren von acht Patienten zur Verfügung, die mit dem gleichen Isolat des HCV-Stammes AD78 infiziert worden waren. Diese Patienten waren nach Interferon/Ribavirin-Kombinationstherapie zur Hälfte *Responder* und zur anderen Hälfte *Nonresponder*. Um Eigenschaften der NS5A-Proteine in Zellkultur untersuchen zu können, wurden die NS5A-Sequenzen aus den Patientenserum amplifiziert und in ein subgenomisches HCV-Replikon auf Basis des HCV-Stammes Con1 kloniert, das autonom in HuH7-Zellen repliziert. So entstanden chimäre Replikons mit eng verwandten NS5A-Sequenzen des Stammes AD78 im Kontext der nichtstrukturellen HCV-Proteine des Stammes Con1. Wenn das NS5A-Protein der virale Faktor wäre, der *in vivo* zur Resistenz des HCV gegen IFN- α führt, sollten die Replikons mit NS5A-Fragmenten aus Isolaten von *Nonrespondern* auch *in vitro* resistent sein.

Das Replikonsystem bot gegenüber Systemen, bei denen einzelne HCV-Proteine in Zellen überexprimiert werden, den Vorteil, dass die nichtstrukturellen HCV-Proteine in physiologischeren Konzentrationen exprimiert wurden und ihre Funktionen im Komplex miteinander erfüllen konnten, so dass eine natürliche Infektion widergespiegelt wurde. Im Replikon war ein Neomycinphosphotransferasegen enthalten, mit dessen Hilfe Zellen selektiert wurden, die die Replikation unterstützten. Sechs der acht Replikonkonstrukte replizierten in HuH7-Zellen und sowohl HCV-RNAs als auch die viralen NS5A-Proteine konnten in den Zellen nachgewiesen werden. Um die Resistenz der Replikons gegen IFN- α zu bestimmen, wurden die etablierten Zelllinien mit IFN- α behandelt und der Einfluss auf die Replikation durch Messung der intrazellulären HCV-RNA-Mengen bestimmt. Es wurde jedoch eine konzentrationsabhängige Inhibition der Replikation aller Replikons ohne einen signifikanten Unterschied zwischen solchen mit NS5A-Fragmenten aus *Responder*- oder *Nonresponder*-Patienten beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass das NS5A-Protein nicht der virale Faktor ist, der zur Resistenz des HCV gegen IFN- α führt. In einem entsprechenden Ansatz wurde die Resistenz der Replikons gegen Ribavirin bestimmt und auch hier wurde eine Inhibition der Replikation aller HCV-RNAs ohne signifikante Unterschiede festgestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob man *in vitro* IFN-resistente Varianten der Replikons generieren kann und welche Mutationen zu einer solchen Resistenz beitragen. Dazu wurden die transfizierten Zelllinien für einen Zeitraum von mehreren Wochen mit unterschiedlichen

IFN-Konzentrationen behandelt. Tatsächlich waren einige Zelllinien bei gleichzeitiger Selektion für die Replikon-RNA in der Lage, auch unter hohen IFN-Konzentrationen zu überleben. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass Veränderungen der Wirtszelllinien, nicht aber resistente Varianten der HCV-Replikons zu dieser Resistenz führten.

Auf entsprechende Weise wurde versucht, durch Langzeitbehandlung eine Ribavirinresistenz der Replikons zu induzieren. Ein Überleben der Zellen unter einer hohen Ribavirinkonzentrationen wurde nur beobachtet, wenn die Zellen mit einer Variante des HCV-Replikons transfiziert waren, die eine bestimmte Aminosäuremutation in der NS5A-Region enthielt. Diese Mutation veränderte jedoch nicht die Sensitivität des Replikons selbst gegenüber Ribavirin. Dennoch zeigte dieses Ergebnis, dass das NS5A-Protein die HuH7-Zellen bei der Ausbildung einer zellulären Resistenz gegen Ribavirin unterstützen kann.

Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit einer potentiellen antiapoptotischen Funktion des NS5A-Proteins. Zelllinien, in denen verschiedene chimäre HCV-RNAs replizierten, wiesen nach der Behandlung mit TNF- α , einem apoptoseauslösenden Cytokin, geringe Unterschiede in der Überlebensrate auf. Es blieb aber offen, ob dieser Effekt tatsächlich auf das NS5A-Protein oder auf Eigenschaften der Zelllinien zurückzuführen war.

Im letzten Abschnitt wurde der Einfluss des NS5A-Proteins auf die Replikation des HCV untersucht. Auch hierzu wurde die Reihe der chimären Con1/AD78-Replikons verwendet. Allerdings enthielten sie statt des Selektionsgens ein Luciferasegen, so dass die Stärke der Replikation dieser Konstrukte in HuH7-Zellen unmittelbar nach der Transfektion bestimmt werden konnte. Die subgenomischen HCV-RNAs wiesen unterschiedliche Replikationsfähigkeiten auf. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen NS5A-Fragmente wurden Mutationen identifiziert, die nach Einbringen in bestimmte Replikon-Konstrukte die Fähigkeit zu replizieren blockieren oder wiederherstellen konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass das Entfernen neu entdeckter potentieller Hyperphosphorylierungsstellen im NS5A-Protein zu einer erhöhten Replikation führte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des NS5A-Proteins für die Replikation des HCV und können in Zukunft wichtige Informationen zur Entwicklung replikationsinhibierender Medikamente liefern.

6 Literatur

Ali, S., Pellerin, C., Lamarre, D., Kukulj, G., 2004. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol.* 78 (1), 491-501.

Appel, N., Herian, U., Bartenschlager, R., 2005. Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A. *J Virol.* 79 (2), 896-909.

Appel, N., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., 2005. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* 79 (5), 3187-3194.

Asabe, S. I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., Shimotohno, K., 1997. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol.* 71 (1), 790-796.

Banner, B. F., Allan, C., Savas, L., Baker, S., Barnard, G., Bonkovsky, H. L., 1997. Inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Virchows Arch.* 431 (3), 181-187.

Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H., 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol.* 68 (8), 5045-5055.

Bartenschlager, R., Lohmann, V., 2000. Replication of hepatitis C virus. *J Gen. Virol.* 81, 1631-1648.

Baumert, T. F., Ito, S., Wong, D. T., Liang, T. J., 1998. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol.* 72 (5), 3827-3836.

Behrens, S. E., Grassmann, C. W., Thiel, H. J., Meyers, G., Tautz, N., 1998. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *J Virol.* 72 (3), 2364-2372.

Behrens, S. E., Tomei, L., De Francesco, R., 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15 (1), 12-22.

Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., Rice, C.M., 2000. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 290, 1972-1975.

Blight, K. J., McKeating, J. A., Marcotrigiano, J., Rice, C. M., 2003. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol.* 77 (5), 3181-3190.

Blight, K. J., McKeating, J. A., Rice, C. M., 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 76 (24), 13001-13014.

Bowen, G. B., Walker, C., M., 2005. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436, 946-952.

Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J. A., Blum, H. E., Penin, F., Moradpour, D., 2002. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 277 (10), 8130-8139.

Brass, V., Moradpour, D., Blum, H. E., 2006. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *Int. J. Med. Sci.*, 3 (2), 29-34.

- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H., Lemon, S. M., 1992. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res.* 20, 5041-5045.
- Brown, R. S. Jr., 2005. Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436, 973-978.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J., 2002. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol.* 76 (8), 3720-3730.
- Chang, J., Yang, S. H., Cho, Y. G., Hwang, S. B., Hahn, Y. S., Sung, Y. C., 1998. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol.* 72 (4), 3060-3065.
- Chayama, K., Tsubota, A., Kobayashi, M., Okamoto, K., Hashimoto, M., Miyano, Y., Koike, H., Kobayashi, M., Koida, I., Arase, Y., Saitoh, S., Suzuki, Y., Murashima, N., Ikeda, K., Kumada, H., 1997. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 25 (3), 745-749.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., Houghton, M., 1989. Isolation of a c-DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
- Chung, Y. L., Sheu, M. L., Yen, S. H., 2003. Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 107 (1), 65-73.
- Chung, Y. M., Park, K. J., Choi, S. Y., Hwang, S. B., Lee, S. Y., 2001. Hepatitis C virus core protein potentiates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 284 (1), 15-79.
- Contreras, A. M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V., Chung, R. T., 2002. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol.* 76 (17), 8505-8517.
- Crotty, S., Cameron, C., Andino, R., 2002. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med.* 80 (2), 86-95.
- Dash, S., Prabhu, R., Hazari, S., Bastian, F., Garry, R., Zou, W., Haque, S., Joshi, V., Regenstein, F. G., Thung, S. N., 2005. Interferons alpha, beta, gamma each inhibit hepatitis C virus replication at the level of internal ribosome entry site-mediated translation. *Liver Int.* 25 (3), 580-594.
- De Francesco, R., Migliaccio, G., 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436, 953-960.
- De Francesco, R., Neddermann, P., Tomei, L., Steinkuhler, C., Gallinari, P., Folgori, A., 2000. Biochemical and immunologic properties of the nonstructural proteins of the hepatitis C virus: implications for development of antiviral agents and vaccines. *Semin Liver Dis.* 20 (1), 69-83.
- Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., Dubuisson, J., 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol.* 71 (1), 697-704.
- De Lucas, S., Bartolome, J., Carreno, V., 2005. Hepatitis C virus core protein down-regulates transcription of interferon-induced antiviral genes. *J Infect Dis.* 191 (1), 93-99.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M. P., Schuster, C., 2003. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* 77 (9), 5401-5414.
- Dittmann, S., Roggendorf, M., Durkop, J., Wiese, M., Lorbeer, B., Deinhardt, F., 1991. Long-term persistence of hepatitis C virus antibodies in a single source outbreak. *J. Hepatol.* 13 (3), 323-327.

- Eckart, M. R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M., Choo, Q. L., 1993. The hepatitis C virus encodes a serine protease involved in processing of the putative nonstructural proteins from the viral polyprotein precursor. *Biochem Biophys Res Commun.* 192 (2), 399-406.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Muratami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marmo, F., Sato, C., 1995. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 96 (1), 224-230.
- Evans, M. J., Rice, C. M., Goff, S. P., 2004. Phosphorylation of hepatitis C virus non-structural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *PNAS* 101, 13038-13043.
- Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R., 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol.* 68 (6), 3753-3760.
- Feld, J. J., Hoofnagle, J. H., 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 18; 436 (7053), 967-972.
- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R. Jr., Ikeda, M., Lemon, S. M., Gale, M. Jr., 2003. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300 (5622), 1145-1148.
- Frese, M., Barth, K., Kaul, A., Lohmann, V., Schwarzle, V., Bartenschlager, R., 2003. Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *J Gen Virol.* 84 (5), 1253-1259.
- Frese, M., Pietschmann, T., Moradpour, D., Haller, O., Bartenschlager, R., 2001. Interferon- α inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J. Gen. Virol.* 82 (4), 723-733.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R., 2001. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J. Virol.* 75 (24), 12047-12057.
- Gale, M. Jr., Blakely, C. M., Kwieciszewski, B., Tan, S. L., Dossett, M., Tang, N. M., Korth, M. J., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Katze, M. G., 1998. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol.* 18 (9), 5208-5218.
- Gale, M. Jr., Foy, E. M., 2005. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* 18; 436 (7053), 939-945.
- Gale, M. Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R., Katze, M. G., 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230 (2), 217-227.
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., Lai, M. M. C., 2004. Interactions between viral non-structural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.* 78, 3480-3488.
- Gao, B., Hong, F., Radaeva, S., 2004. Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C virus. *Hepatology* 39 (4), 880-890.
- Geiss, G. K., Carter, V. S., He, Y., Kwieciszewski, B. K., Holzman, T., Korth, M. J., Lazaro, C. A., Fausto, N., Bumgarner, R. E., Katze, M. G., 2003. Gene expression profiling of the cellular transcriptional network regulated by alpha/beta interferon and its partial attenuation by the hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Virol.* 77 (11), 6367-6375.
- Ghosh, A. K., Majumder, M., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., Ray, R. B., 2000. Hepatitis C virus NS5A protein protects against TNF- α mediated apoptotic cell death. *Virus Res.* 67 (2), 173-178.
- Girard, S., Shalhoub, P., Lescure, P., Sabile, A., Misek, D. E., Hanash, S., Brechot, C., Beretta, L., 2002. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology* 295 (2), 272-283.

- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., Moradpour, D., 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J. Virol.* 77, 5487-5492.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., Rice, C. M., 1993. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22), 10583-10587.
- Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., Rowlands, D. J., 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535 (1-3), 34-38.
- Guo, J.T., Bichko, V., Seeger, C., 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* 75 (18), 8516-8523.
- Guo, J. T., Zhu, Q., Seeger, C., 2003. Cytopathic and noncytopathic interferon responses in cells expressing hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol.* 77 (20), 10769-10779.
- Guo, J. T., Sohn, J. A., Zhu, Q., Seeger, C., 2004. Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology.* 20; 325 (1), 71-81.
- He, Y., Katze, M.G., 2002. To interfere and to anti-interfere: the interplay between hepatitis C virus and interferon. *Viral Immunol.*, 15 (1), 95-119.
- Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K., 1993. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol.* 67 (8), 4665-4675.
- Hofgärtner, W. T., Polyak, S. J., Sullivan, D. G., Carithers, R. L. Jr., Gretch, D. R., 1997. Mutations in the NS5A gene of hepatitis C virus in North American patients infected with HCV genotype 1a or 1b. *J Med Virol.* 53 (2), 118-126.
- Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y., Jones, E. A., 1986. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med.* 315 (25), 1575-1578.
- Houghton, M., Abrignani, S., 2005. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436, 961-966.
- Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H. G., Rice, C. M., Blum, H. E., Moradpour D., 2001. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 284 (1), 70-81.
- Hultgren, C., Milich, D. R., Weiland, O., Sallberg, M., 1998. The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol.* 79, 2381-2391.
- Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y., Padmanabhan, R., 1996. Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene* 182 (1-2), 203-211.
- Jen, J. F., Glue, P., Gupta, S., Zambas, D., Hajian, G., 2000. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit.* 22 (5), 555-565.
- Joo, M., Hahn, Y. S., Kwon, M., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., 2005. Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkkappaB kinase beta. *J Virol.* 79 (12), 7648-7657.
- Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Asabe, S., Kimura, K., Shimotohno, K., 1994. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 205 (1), 320-326.

- Kato, N., Yoshida, H., Kioko Ono-Nita, S., Kato, J., Goto, T., Otsuka, M., Lan, K., Matsushima, K., Shiratori, Y., Omata, M., 2000. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 32 (2), 405-412.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125 (6), 1808-1817.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Mizokami, M., Wakita, T., 2005. Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *J Virol.* 79 (1), 592-596.
- Krieger, N., Lohmann, V., Bartenschlager, R., 2001. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J. Virol.* 75 (10), 4614-4624.
- Koch, J. O., Bartenschlager, R., 1999. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol.* 73 (9), 7138-7146.
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., Rice, C. M., 1996. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol.* 70 (6), 3363-3371.
- Lanford, R. E., Guerra, B., Lee, H., Averett, D. R., Pfeiffer, B., Chavez, D., Notvall, L., Bigger, C., 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol.* 77 (2), 1092-1104.
- Lin, W., Choe, W. H., Hiasa, Y., Kamegaya, Y., Blackard, J. T., Schmidt, E. V., Chung, R. T., 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 128 (4), 1034-1041.
- Lin, C., Wu, J. W., Hsiao, K., Su, M. S., 1997. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol.* 71 (9), 6465-6471.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., Rice, C. M., 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 22, 623-626.
- Lohmann, V., Hoffmann, S., Herian, U., Penin, F., Bartenschlager, R., 2003. Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* 77 (5), 3007-3019.
- Lohmann, V., Körner, F., Dobierzewska, A., Bartenschlager, R., 2001. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaption. *J. Virol* 75, 1437-1449.
- Lohmann, V., Körner, F., Herian, U., Bartenschlager, R., 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol.* 71 (11), 8416-8428.
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J-O., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R., 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110-113.
- Lu, M., Wiese, M., Roggendorf, M., 1999. Selection of genetic variants of the 5' noncoding region of hepatitis C virus occurs only in patients responding to interferon alpha therapy. *J Med Virol.* 59 (2), 146-153.
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z., Cameron, C. E., 2001. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem.* 276 (49), 46094-46098.
- Macdonald, A., Harris, M., 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* 85 (9), 2485-2502.

- Maekawa, S., Enomoto, N., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Ueda, E., Kohashi, T., Watanabe, H., Chen, C.-H., Yamashiro, T., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Nakagawa, M., Sato, C., Watanabe, M., 2004. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee.infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in HuH7 cells. *J Viral Hepatitis* 11, 394-403.
- Majumder, M., Ghosh, A. K., Steele, R., Zhou, X. Y., Phillips, N. J., Ray, R., Ray, R. B., 2002. Hepatitis C virus NS5A protein impairs TNF-mediated hepatic apoptosis but not by an anti-Fas antibody, in transgenic mice. *Virology* 294, 94-105.
- Matsumoto, M., Hsieh, T. Y., Zhu, N., VanArsdale, T., Hwang, S. B., Jeng, K.S., Gorbalenya, A. E., Lo, S. Y., Ou, J. H., Ware, C. F., Lai, M. M., 1997. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol.* 71 (2), 1301-1309.
- Miyasaka, Y., Enomoto, N., Kurosaki, M., Sakamoto, N., Kanazawa, N., Kohashi, T., Ueda, E., Maekawa, S., Watanabe, H., Izumi, N., Sato, C., Watanabe, M., 2003. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in Hu7-cells. *J. Inf. Dis.* 188, 1537-1544.
- Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E., Bienz, K., 2003. Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex. *Antiviral Res.* 60 (2), 103-109.
- Moradpour, D., Kary, P., Rice, C. M., Blum, H. E., 1998. Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology* 28 (1), 192-201.
- Morishima, C., Musey, L., Elizaga, M., Gaba, K., Allison, M., Carithers, R.L., Gretch, D.R., McElrath, M.J., 2003. Hepatitis C virus-specific cytolytic T cell responses after viral therapy. *Clin. Immunol.* 108 (1), 211-220.
- Naka, K., Takemoto, K., Abe, K., Dansako, H., Ikeda, M., Shimotohno, K., Kato, N., 2005. Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors. *J. Gen. Virol.* 86 (10), 2787-2792.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J., 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42 (9), 3858-3863.
- Namba, K., Naka, K., Dansako, H., Nozaki, A., Ikeda M., Shiratori, Y., Shimotohno, K., Kato, N., 2004. Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (1), 299-309.
- Neddermann, P., Clementi, A., De Francesco, R., 1999. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein. *J Virol.* 73 (12), 9984-9991.
- Neddermann, P., Quintavalle, M., Di Pietro, C., Clementi, A., Cerretani, M., Altamura, S., Bartholomew, L., De Francesco, R., 2004. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol.* 78 (23), 13306-13314.
- Pavio, N., Lai, M.M.C., 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J. Biosci.* 28 (3), 287-304.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Frainais, P. O., Bouvier, M., Soulier, A., Pellerin, M., Dhumeaux, D., 1999. Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. *J Virol.* 73 (8), 6490-6499.
- Pawlotsky, J., Germanidis, G., 1999. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J. Viral Hepat.* 6 (5), 343-356.

- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H. E., Bartenschlager, R., Moradpour, D., 2004. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem.* 279 (39), 40835-40843.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.M., 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology.* 39 (1), 5-19.
- Pfeiffer, J. K., Kirkegaard, K., 2005. Ribavirin Resistance in Hepatitis C Virus Replicon-Containing Cell Lines Conferred by Changes in the Cell Line or Mutations in the Replicon RNA. *J. Virol.* 79(4), 2346-2355.
- Podevin, P., Sabile, A., Gajardo, R., Delhem, N., Abadie, A., Lozach, P. Y., Beretta, L., Brechot, C., 2001. Expression of hepatitis C virus NS5A natural mutants in a hepatocytic cell line inhibits the antiviral effect of interferon in a PKR-independent manner. *Hepatology* 33 (6), 1503-1511.
- Polyak, S.J., Khabar, K.S., Paschal, D.M., Ezelle, H.J., Duverlie, G., Barber, G.N., Levy, D.E., Mukaida, N., Gretch, D.R., 2001. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* 75 (13), 6095-6106.
- Polyak, S. J., McArdle, S., Liu, S. L., Sullivan, D. G., Chung, M., Hofgartner, W. T., Carithers, R. L. Jr., McMahon, B. J., Mullins, J. I., Corey, L., Gretch, D. R., 1998. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *J Virol.* 72 (5), 4288-4296.
- Poynard, T., Yuen, M. F., Ratziu, V., Lai, C. L., 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362, 2095-2100.
- Reyes, G. R., 2002. The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus Pathogenesis. *J Biomed Sci* 9, 187-197.
- Saiz, J. C., Lopez-Labrador, F. X., Ampurdanes, S., Dopazo, J., Forns, X., Sanchez-Tapias, J. M., Rodes, J., 1998. The prognostic relevance of the nonstructural 5A gene interferon sensitivity determining region is different in infections with genotype 1b and 3a isolates of hepatitis C virus. *J Infect Dis.* 177 (4), 839-847.
- Samuel, C. E., 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 14 (4), 778-809.
- Schinkel, J., Spoon, W.J., Kroes, A.C., 2004. Meta-analysis of mutations in the NS5a gene and hepatitis C virus resistance to interferon therapy: uniting discordant conclusions. *Antivir. Ther.* 9 (2), 275-286.
- Shepard, C. W., Finelli, L., Alter, M.J., 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 5 (9), 558-567.
- Shimakami, T., Hijikata, M., Luo, H., Ma, Y. Y., Kaneko, S., Shimotohno, K., Murakami, S., 2004. Effect of interaction between hepatitis C Virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus replication with the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* 78, 2738-2748.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., Murakami, S., 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem.* 277 (13), 11149-11155.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., Widell, A., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42 (4), 962-973.
- Sintchak, M. D., Nimmegern, E., 2000. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology* 47, 163-184.
- Sumpter, R., Wang, C., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., 2004. Viral evolution and interferon resistance of hepatitis C virus RNA replication in a cell culture model. *J. Virol.* 78 (21), 11591-11604.

- Tan, S. L., Katze, M. G., 1999. The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J Interferon Cytokine Res.* 19 (6), 543-554.
- Tan, S. L., Nakao, H., He, Y., Vijaysri, S., Neddermann, P., Jacobs, B. L., Mayer, B. J., Katze, M. G., 1999. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10), 5533-5538.
- Tanabe, Y., Sakamoto, N., Enomoto, N., Kurosaki, M., Ueda, E., Maekawa, S., Yamashiro, T., Nakagawa, M., Chen, C. H., Kanazawa, N., Kakinuma, S., Watanabe, M., 2004. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha. *J Infect Dis.* 189 (7), 1129-1139.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Shimotohno, K., 1995. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 215 (2), 744-749.
- Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., Shimotohno, K., 1996. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol.* 70 (5), 3307-3312.
- Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, S., 1995. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded non-structural protein NS5A. *J. Virol.*, 69, 3980-3986.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N., Lai, M. M., 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285 (5424), 107-110.
- Tellinghuisen, T. L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A. E., Rice, C. M., 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 48576-49587.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A., 1992. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 66 (3), 1476-1483.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T. J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 (7), 791-796.
- Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A., 1993. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol.* 67 (6), 3338-3344.
- Wiese, M., Berr, F., Lafrenz, M., Porst, H., Oesen, U., 2000. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*, 32 (1), 91-96.
- Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P., Prieto, J., 1998. Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology* 244 (2), 513-520.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J., Ou, J., 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* 20 (14), 3840-3848.
- Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yorihuri, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T., Date, T., 1996. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* 223 (1), 255-261.
- Yanagi, M., St Claire, M., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J., 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (5), 2291-2295.
- Young, K.-C., Lindsay, K. L., Lee, K.-J., Liu, W.-C., He, J.-W., Milstein, S. L., Lai, M. M. C., 2003. Identification of a Ribavirin-Resistant NS5B Mutation of Hepatitis C Virus During Ribavirin Monotherapy. *Hepatology* 38 (4), 869-878.

Zeuzem, S., Lee, J. H., Roth, W. K., 1997. Mutations in the nonstructural 5A gene of European hepatitis C virus isolates and response to interferon alfa. *Hepatology* 25 (3), 740-744.

Zeuzem, S., 2004. Standardtherapie der akuten und chronischen Hepatitis C. *Z Gastroenterol*, 42, 714-719.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard S. L., Wakita, T., Chisari, F. V., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (26), 9294-9299.

Zhu, H., Nelson D. R., Crawford, J. M., Liu, C., 2005. Defective Jak-Stat activation in hepatoma cells is associated with hepatitis C viral IFN-alpha resistance. *J Interferon Cytokine Res*. 25 (9), 528-39.

Zhu, Q., Guo, J.-T., Seeger, C., 2003. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 77 (17), 9204-9210.

7 Abkürzungen

³² P-UTP	Uridin 5'-($\alpha^{32}\text{P}$)-Triphosphat
3'-NTR, 5'-NTR	3'- bzw. 5'-nichttranslatierte Region
Abb.	Abbildung
ADAR	Adenosindeaminase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BVDV	<i>bovine viral diarrhoea virus</i>
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde
h-G6PDH	humane Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
HCV	Hepatitis C Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
h-VAP-A	humanes Vesikel-assoziiertes Membranprotein-assoziiertes Protein A
IC ₅₀	50%-inhibierende Konzentration
IFN- α	Interferon- α
IFNAR 1 und 2	Interferon- α -Rezeptorkette 1 und 2
IMP	Inosinmonophosphat

IMPDH	Inosinmonophosphatdehydrogenase
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ISDR	Interferonsensitivitätsbestimmende Region
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISGF-3	Interferon-stimulierter Genfaktor 3
ISRE	Interferon-stimuliertes Antwortelement
IRF-9	Interferon-regulatorischer Faktor 9
IU	Internationale Einheiten
Jak	Januskinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M	molar
mM	millimolar
μ M	mikromolar
μ F	Mikrofaraday
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NF κ B	<i>nuclear factor</i> κ B
nmol	Nanomol
NR	<i>Non-responder</i>
nt	Nukleotide
OAS	Oligoadenylatsynthase
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PePHD	PKR-eIF2 α -Phosphorylierungsdomäne
PKR	Proteinkinase R
pmol	Pikomol
R	<i>Responder</i>
RBV	Ribavirin
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfanat
sec	Sekunden
SSC	<i>standard sodium citrate</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRADD	<i>tumor necrosis factor receptor associated death domain</i>
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

8 Anhang

8.1 Nukleotidsequenzen der verwendeten NS5A-Regionen

	6258	
CON1	TCCGGCTCGTGGCTAAGAGATGTTTGGGATTGGATATGCACGGTGTGACTGATTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTCCTGCCGCGATTGCCGGGAG	100
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	
CON1	TCCCCTTCTTCTCATGTCAACGTGGGTACAAGGGAGTCTGGCGGGGCGACGGCATCATGCAAACCACCTGCCCATGTGGAGCACAGATCACCGGACATGT	200
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	
CON1	GAAAAACGGTTCCATGAGGATCGTGGGGCCTAGGACCTGTAGTAACACGTGGCATGGAACATTCCCATTACCGGTACACCCACGGGCCCTGCACGCC	300
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	
CON1	TCCCCGGCGCAAATTATTCTAGGGCGCTGTGGCGGGTGGCTGCTGAGGAGTACGTGGAGGTTACGCGGGTGGGGATTCCACTACGTGACGGGCATGA	400
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	
CON1	CCACTGAC AACGTAAAGTGCCCGTGTCAAGTTCGGCCCCCBAATTCITTCACAGAAGTGGATGGGGTGCAGGTGCACAGGTACGCTCCAGCGTGCAAACC	500
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	
CON1	CCTCCTACGGGAGGAGGTACATTCCTGGTCGGGCTCAATCAATACCTGGTGGGTCACAGCTCCCATGCGAGCCCGAACCGGACGTAGCAGTGCTCACT	600
NR1	
NR2	
NR3	
NR4	
R1	
R2	
R3	
R4	

CON1	TCCATGCTCACCGACCCCTCCACATTACGGCGGAGACGGCTAAGCGTAGGCTGGCCAGGGGATCTCCCCCTCCTTGGCCAGCTCATCAGCTAGCCAGC	700
NR1A..A..A.....C..T..A.....G...T.....C.....T.....T...T	
NR2A..A..G.....T.....G.....C.....T.....T...T	
NR3T.....A..A..G.....A..G.....C...TG...T.....T...T	
NR4T.....C..A..A..G.....T.....G.....C.....T.....T...T	
R1C..A..A.....T..A..A..G.....C.....T.....T...T	
R2C...G...A..A..G.....T.....G.....C.....T.....T...T	
R3A..A.....T..A..G.....C..A.....T.....T...T	
R4A..A.....T...T...G.....C.....T.....T...T	
CON1	TGTCTGCGCCTTCCTTGAAGGCAACATGCACTACCCGTCATGACTCCCCGGAGCGCTGACCTCATCGAGGCCAACCTCCTGTGGCGGCAGGAGATGGGCGG	800
NR1G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
NR2G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
NR3G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
NR4G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
R1G.....T.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
R2G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
R3G.....A.....A..T...T.....T.....A.....G.....	
R4G.....A.....A.....A.....A.....	
CON1	GAACATCACCCGCTGGAGTCCAGAAAATAAGGTAGTAATTTTGGACTCTTTTCGAGCCGCTCCAAGCGGAGGAGGATGAGAGGGAAGTATCCGTTCCGGCG	900
NR1G.....C.....T.....G.....A.....C.....	
NR2G.....C.....C.....T.....T..GG.....A.....CG.....	
NR3G.....G.....C.....T.....T.....T..G.....A.....C.....	
NR4G.....G.....C.....T.....T.....T..G.....A.....C.....	
R1G.....G.....C.....T.....G..G.....A.....C.....	
R2G.....G.....C.....T.....T..G.....C.....A.....C.....	
R3G.....C.....C.....T.....T..G.....A.....C.....	
R4G.....C.....T.....T..G.....A.....C.....	
CON1	GAGATCCTGCGGAGGTCAGAAATTCCTCGAGCGATGCCCATATGGGCACGCCCGGATTACAACCTCCACTGTTAGAGTCTGGAAGGACCCGGACT	1000
NR1AA.....G..T...G.....G.....A.....A.....	
NR2AA.....T.....G...C.....G.....T.....A.....	
NR3AA.....C..CG...T.....A.....A.....	
NR4AA.....T.....C..G...C.....G.....T.....A.....	
R1A.....G...C..CG...A..G.....A.....A.....	
R2AA.....T.....C..T...C.....G.....G.....A.....	
R3A.....G...C..CG...A.....A.....A.....	
R4AA.....T.....C..CG...C.....G.....G.....A.....	
CON1	ACGTCCTCCAGTGGTACACGGGTGTCATTGCGCGCTGCCAAGGCCCTCCGATACCACCTCCACGAGGAAGAGGACGGTTGCTCCTCAGAAATCTAC	1100
NR1T.....G.....AA..G.....T.....A..CA.....A..C.....C.....AA.....	
NR2C..C.....G.....C..G.....A..A..G..T.....A.....A..AA.....T.....T..AA.....C..G	
NR3C..C.....C.....C.....A..A..G.....C.....G.....T..AA.....C..G	
NR4C..C.....C.....A.....A.....A.....A.....A.....T..AA.....C..G	
R1G.....G.....C.....C.....G.....A..C.....T..AA.....C..G	
R2C.....C.....C.....A..A.....A.....A.....AA.....T..AA.....C..G	
R3G.....G.....C.....A..C.....A..A..C.....A.....T..TA.....AC..	
R4C..C.....C.....A.....A.....A.....AA.....T..A.....C..	
CON1	CGTGTCTTCTGCCTTGGCGGAGCTCGCCACAAAGACCTTCGGCAGCTCCGAATCGTCGGCCGTCGACAGCGGCACGGCAACGGCCTCTCCTGACCAGCCC	1200
NR1	T.....C.....A.....T.....T.....T.....A.....C.....TC.....G.....T	
NR2A.....A.....T.....A.....T.....G.....T.....A..G..C..TC.....	
NR3	T.....CA.....A.....T.....G.....G.....T.....C..TC.....	
NR4	T.....A.....A.....G.....T.....A..GG.....T.....A..G..C..TC.....	
R1A.....A.....T.....G.....C.....T.....A..G..T..TC.....T..G.....T	
R2	T.....A.....A.....G.....G.....A.....A.....A.....G..T..C.....T	
R3	T.....A.....A.....T.....G.....G.....C.....C.....G.....TT	
R4A.....A.....T.....G.....G.....T.....G..C..TC.....	
CON1	TCCGACGACGGCGACGCGGGATCCGACGTTGAGTCTACTCCTCCATGCCCCCCCTTGAGGGGGAGCCGGGGATCCCGA TCTCAGCGACGGGCTTTGGT	1300
NR1GTA.....A..A..G.....C.....GT.....T.....A.....C..T.....	
NR2G..A.....A..A..G.....G.....T.....A.....C.....	
NR3G..T.....A..A.....T.....A.....C.....	
NR4T.....G.....A..A.....T.....T.....C.....	
R1GT..A.....A..A..G.....C..G.....T.....C.....C.....	
R2T..G.....A..A.....T.....A.....C.....C.....	
R3GT.....A..G.....C.....T.....GC.....	
R4G.....A..A.....C.....T.....C.....	
CON1	CTACCGTAAGCGAGGAGGCTAGTGAGGACGTCGTCTGCTGCTGC	7598
NR1C.....A.....	
NR2T.....C.....T.....	
NR3C.....A.....G.....T.....	
NR4C.....C.....	
R1T.....C.....	
R2C.....C.....	
R3C.....C.....	
R4C.....T.....	

Abb. 8.1 Alignment der Nukleotidsequenzen der NS5A-Regionen aus den Replikons Con1, Con1/AD78-NR1-4 und Con1/AD78-R1-4. Die Schnittstellen der Endonukleasen *MluI* und *EcoRI* sind umrandet. In den Sequenzen NR2-4 und R2-4 sind bis zur *MluI*-Schnittstelle Con1-Sequenzen enthalten. In den Sequenzen NR1 und R1 erstrecken sich die Con1-Sequenzen bis zur *EcoRI*-Schnittstelle. Die Nukleotidpositionen an Anfang und Ende der Sequenzen beziehen sich auf die Con1-Sequenz mit der NCBI-Zugriffsnummer AJ238799.

Publikation

Ein Teil dieser Arbeit wurde in der virologischen Fachzeitschrift *Virology* veröffentlicht:

Aus dem Siepen, M., Lohmann, V., Wiese, M., Ross, S., Roggendorf, M., Viazov, S., 2005. Nonstructural protein 5A does not contribute to the resistance of hepatitis C virus replication to interferon alpha in cell culture. *Virology* 336 (2), 131-136.

Dank

Herrn Prof. Dr. M. Roggendorf danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Institut durchzuführen, für die wissenschaftliche Begleitung und für die hilfreichen Ideen und Ratschläge.

Herrn Dr. S. Viazov danke ich für die sowohl freundschaftliche als auch intensive Betreuung, die hervorragende Unterstützung in allen experimentellen Fragen und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. R. Bartenschlager danke ich für die Bereitstellung von Zelllinien und Antikörpern.

Herrn Dr. V. Lohmann danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Transfektion von Zellen und beim Northern Blot.

Herrn Prof. Dr. H. Esche und Herrn Prof. Dr. R. Küppers danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Wiese danke ich für die Bereitstellung der Patientenseren.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Viazov, insbesondere Frau Tanja Groß, Frau Yvonne Pietsch, Frau Marija Mihailova und Herrn Cesar Oniangue-Ndza danke ich für die gute Zusammenarbeit und den Spaß, den wir miteinander hatten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Essens für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie für die immerwährende Unterstützung bedanken.

Das größte Dankeschön geht an meine Freundin Anja – für alles.

Lebenslauf

Name	Marc aus dem Siepen
Adresse	Brunostr. 7 45130 Essen 0201 79 87 99 66 ausdemsiepen@gmx.net
Geburtsdatum	08. März 1975
Geburtsort	Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

09/1985 – 05/1994	Gymnasium Broich in Mülheim an der Ruhr; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
-------------------	--

Zivildienst

08/1994 – 09/1995	Altenpflege im Theodor-Fliedner-Werk Mülheim an der Ruhr
-------------------	--

Studium

10/1995 – 01/2003	Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart Abschluss: „Diplom-Biologe (technisch orientiert)“
-------------------	---

Beruflicher Werdegang

04/2003 – 04/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen (Promotion)
-------------------	---

Seit 04/2006	Scientific Officer bei der NewLab BioQuality AG, Erkrath, Abteilung Forschung und Entwicklung
--------------	--

Essen, den 20.11.2006

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Bedeutung des NS5A-Proteins des Hepatitis C Virus für die Resistenz gegen Interferon- α und Ribavirin“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Marc aus dem Siepen befürworte.

Essen, 20.11.2006

(Prof. Dr. M. Roggendorf)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 20.11.2006

(Marc aus dem Siepen)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 20.11.2006

(Marc aus dem Siepen)