

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen  
Abteilung für Molekulare Pathologie  
Abteilungsleiter: Professor Dr. R. Kandolf

**Funktionelle Charakterisierung der Interaktion  
des Hepatitis C Virus Core Proteins mit der  
Hepatitis B Virus Replikation**

Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von  
Peter Philipp Bernstein, geb. Hennig  
aus  
Erfurt

– 2005 –

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter:

Professor Dr. R. Kandolf

2. Berichtstatter:

Professor Dr. G. Jahn

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Die Hepatitis B Virus (HBV) - Infektion . . . . .	10
1.1.1	Epidemiologische Bedeutung der HBV Infektion . . . . .	10
1.1.2	Klinische Bedeutung der HBV Infektion . . . . .	10
1.1.3	Das HBV Genom, HBV Transkripte und HBV Proteine . . . . .	13
1.1.4	Regulation der HBV Transkription . . . . .	16
1.1.5	Der HBV - Replikationszyklus . . . . .	19
1.2	Die Hepatitis C Virus - Infektion (HCV) . . . . .	20
1.2.1	Epidemiologische Bedeutung der HCV-Infektion . . . . .	20
1.2.2	Klinische Bedeutung und Krankheitsverlauf der HCV-Infektion	21
1.2.3	Das HCV Genom und seine Produkte . . . . .	23
1.2.4	Das HCV Core Protein . . . . .	25
1.2.5	Der HCV Replikationszyklus . . . . .	27
1.3	HBV-HCV - Koinfektion . . . . .	30
1.3.1	Epidemiologische Bedeutung . . . . .	30
1.3.2	Klinische Bedeutung und Krankheitsverlauf der HBV-HCV- Koinfektion . . . . .	31
1.3.3	Pathogenese der HBV-HCV-Koinfektion . . . . .	32
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	36
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>38</b>

---

2.1	Medien, Lösungen und Enzyme . . . . .	38
2.1.1	Stammlösungen und Standardpuffer . . . . .	38
2.1.2	Enzyme . . . . .	39
2.1.3	Bakterienmedium, Antibiotika und Bakterien . . . . .	39
2.2	Geräte und Zubehör . . . . .	40
2.3	Vektoren und Plasmide . . . . .	41
2.3.1	Klonierungsvektoren . . . . .	41
2.3.2	Expressionsvektoren . . . . .	41
2.3.3	Reportergenvektoren . . . . .	42
2.3.4	Virale Ausgangsplasmide . . . . .	44
2.4	Oligonukleotide . . . . .	46
2.4.1	Oligonukleotide für Sequenzierungen . . . . .	46
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	47
2.5.1	Material und Reaktionsansatz . . . . .	47
2.5.2	Durchführung . . . . .	47
2.5.3	RNA-Nachweis durch reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) . . . . .	48
2.6	Zellkultur . . . . .	48
2.6.1	Material . . . . .	48
2.6.2	Zellkultur . . . . .	49
2.6.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	49
2.7	Klonierung von Genregionen . . . . .	50
2.7.1	Restriktionsverdau . . . . .	51
2.7.2	Ethanol-fällung der DNA . . . . .	52
2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	52
2.7.4	Isolation der DNA aus dem Gel . . . . .	53
2.7.5	Ligation von Insert- und Vektor-DNA . . . . .	53
2.7.6	Elektroporation von kompetenten Bakterien . . . . .	53
2.7.7	Kultivieren von transformierten Klonen . . . . .	56

---

2.7.8	DNA-Präparation aus Bakterien („Minipräp“ und „Maxipräp“)	56
2.8	Transfektion eukaryontischer Zellen mit klonierten Konstrukten	56
2.8.1	Material	56
2.8.2	Durchführung der Transfektion	57
2.8.3	HBV-HCV - Kotransfektionsexperimente	57
2.9	Reporterassays zum Messen der HBV-Promotor- und Enhanceraktivitäten	58
2.9.1	Vorbereitung der Zellen für Luciferase- und ONPG- $\beta$ -Galactosidase - Assay	58
2.9.2	Firefly Luciferase-Assay [7, 213]	58
2.9.3	ONPG- $\beta$ -Galactosidase (lacZ) - Assay [86]	59
2.9.4	X-Gal- $\beta$ -Galactosidase - Assay	59
2.9.5	Auswertung der Luciferase-Experimente	60
2.10	RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen	60
2.11	HBV-Virusfällung aus Zellkulturmediumüberstand	61
2.12	DNA-Extraktion aus HBV-Viren	61
2.13	Isolierung intrazellulärer HBV Kapside	62
2.13.1	Benötigte Puffer und Lösungen	62
2.13.2	Immunpräzipitation von HBV Kapsiden	62
2.14	Darstellung der HBV cccDNA	63
2.14.1	Eingesetzte Puffer	64
2.14.2	Hirt-Extraktion zur Isolation episomaler DNA-Moleküle [77]	64
2.15	Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR	64
2.15.1	Das Prinzip der quantitativen PCR	64
2.15.2	Benötigte Materialien für die qPCR	66
2.15.3	Standardisierung	68

---

2.16	Expressionsanalyse durch HCV Core - Proteinnachweis . . . . .	68
2.16.1	Eingesetzte Lösungen und Puffer . . . . .	68
2.16.2	Vorbereitung der Proben . . . . .	69
2.16.3	Auftrennen der Proben mittels SDS-PAGE . . . . .	70
2.16.4	Identifikation des HCV Core Proteins mittels Western Blot-Analyse [185] . . . . .	70
2.17	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	71
2.17.1	Eingesetzte Puffer und Lösungen . . . . .	71
2.17.2	Darstellung von Zellkern und EGFP-HCV Core 1a . . . . .	71
2.17.3	Darstellung von HBV Kapsiden und EGFP-HCV Core 1a . . . . .	72
2.17.4	Mikroskopparameter . . . . .	73
2.18	Gelretardierungs - Analyse (Gelshift, EMSA) . . . . .	73
2.18.1	Eingesetzte Puffer und Lösungen . . . . .	73
2.18.2	Herstellung von Kernextrakten [45] . . . . .	74
2.18.3	Bradford Assay [20] . . . . .	75
2.18.4	Generierung der DNA-Fragmente . . . . .	75
2.18.5	Radioaktive Markierung der PCR-Fragmente . . . . .	76
2.18.6	Hybridisierung von radioaktiven PCR-Fragmenten mit Kernextrakt-Proteinen . . . . .	76
2.18.7	Gelelektrophorese . . . . .	77
2.18.8	Fixierung und Autoradiographie des Gels . . . . .	78
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>79</b>
3.1	Etablierung quantitativer real-time PCR-Systeme zum Nachweis von HBV- und HCV-Nukleinsäuren . . . . .	79
3.1.1	ATP-Synthase 6 quantitative PCR (ATS RT-qPCR) . . . . .	79
3.1.2	HBV Core quantitative PCR (HBV Core qPCR) . . . . .	81

---

3.1.3	pHBV1.5 quantitative PCR (pHBV1.5 qPCR) . . . . .	84
3.1.4	HCV Core quantitative RT-PCR (RT-qPCR) . . . . .	87
3.2	Etablierung von HBV - und HCV - Konstrukten . . . . .	90
3.2.1	HCV Core Konstrukte . . . . .	90
3.2.2	Promotor-kompensierte Kontrollen . . . . .	93
3.2.3	HBV-Reportergenkonstrukte für Luciferase-Reporter-Assays .	96
3.3	Zeitliche Kinetik und Interferenz der Transkription von HBV Core RNA und HCV Core RNA . . . . .	99
3.3.1	Einleitung . . . . .	99
3.3.2	Durchführung . . . . .	99
3.3.3	Ergebnisse . . . . .	99
3.3.4	Diskussion . . . . .	102
3.4	Expressionsnachweis von HCV Core durch Western Blot Analyse . . .	103
3.4.1	Einleitung . . . . .	103
3.4.2	Durchführung . . . . .	103
3.4.3	Ergebnis . . . . .	104
3.5	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	104
3.5.1	Intrazelluläre Lokalisation von HCV Core . . . . .	104
3.5.2	Kolokalisation von HBV und EGFP-HCV Core . . . . .	106
3.6	Untersuchungen zur Interferenz von HCV Core mit CMV-, SV40- und RSV- Promotoren . . . . .	108
3.6.1	Einleitung . . . . .	108
3.6.2	Durchführung der Interferenzuntersuchungen . . . . .	108
3.6.3	Ergebnis der Interferenzuntersuchungen . . . . .	108
3.6.4	Diskussion . . . . .	109
3.7	Messung der HBV Core Promotor und Enhancer Aktivitäten . . . . .	110
3.7.1	Einleitung . . . . .	110

---

3.7.2	Durchführung der vergleichenden Aktivitätsmessung . . . . .	110
3.7.3	Ergebnis der vergleichenden Aktivitätsmessung . . . . .	110
3.7.4	Diskussion der vergleichenden Aktivitätsmessung . . . . .	111
3.8	Einfluß des HCV Core Proteins auf die HBV Core Transkription: Luciferaseexperimente . . . . .	112
3.8.1	Einleitung . . . . .	112
3.8.2	Durchführung der Luciferaseexperimente . . . . .	113
3.8.3	Ergebnisse der Luciferaseexperimente . . . . .	114
3.8.4	Diskussion zu den Luciferaseexperimenten . . . . .	116
3.9	Einfluß von HCV Core auf die HBV Core Transkription: quantitative HBV RNA-Bestimmung . . . . .	117
3.9.1	Einleitung . . . . .	117
3.9.2	Durchführung der HBV RNA - Quantifizierungsexperimente .	117
3.9.3	Ergebnisse der HBV RNA - Quantifizierungsexperimente . . .	118
3.9.4	Diskussion der Experimente zur HBV Core Transkriptionsre- gulation durch HCV Core . . . . .	119
3.10	Bindungsstudien von HCV Core an HBV Core Promotor und Enhancer . . . . .	121
3.10.1	Einleitung . . . . .	121
3.10.2	Durchführung der Bindungsstudien . . . . .	121
3.10.3	Ergebnisse der Bindungsstudien . . . . .	123
3.10.4	Diskussion der Bindungsstudien . . . . .	124
3.11	Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Reifung und Sekretion	128
3.11.1	Einleitung . . . . .	128
3.11.2	Durchführung . . . . .	128
3.11.3	Ergebnisse . . . . .	129
3.11.4	Diskussion . . . . .	132
3.12	Regulation der HBV cccDNA-Homöostase durch das HCV Core Protein	133
3.12.1	Einleitung . . . . .	133



---

3.12.2	Durchführung . . . . .	134
3.12.3	Ergebnis . . . . .	134
3.12.4	Diskussion . . . . .	135
3.13	Auswirkungen des HCV Core Proteins auf die Produktion und Sekretion von HBeAg und HBsAg . . . . .	136
3.13.1	Einleitung . . . . .	136
3.13.2	Durchführung . . . . .	136
3.13.3	Ergebnisse . . . . .	137
3.13.4	Diskussion . . . . .	138
3.14	Berechnung des Ortes der stärksten HBV-Kumulation . . . . .	139
3.14.1	Einleitung . . . . .	139
3.14.2	Durchführung der Berechnung . . . . .	139
3.14.3	Ergebnisse der Kumulationsberechnungen . . . . .	142
3.14.4	Diskussion . . . . .	143
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Schlußfolgerung</b>	<b>145</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>148</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>151</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Die Hepatitis B Virus (HBV) - Infektion

#### 1.1.1 Epidemiologische Bedeutung der HBV Infektion

Mehr als 400 Millionen Menschen sind nach Schätzungen der „World Health Organization (WHO)“ weltweit mit dem Hepatitis B Virus (HBV) chronisch infiziert. Die Prävalenz der chronischen HBV-Infektion schwankt zwischen 0,1% in den westlichen Ländern und 20% in Ländern des fernen Ostens und der Tropen. Von der HBV-Infektion sind - durch größere sexuelle Promiskuität - besonders junge Erwachsene betroffen.

Bedingt durch die Kontamination von Blutprodukten mit dem HBV vor der Zeit wirkungsvoller Screening-Maßnahmen (ab 1970) und der Ära hochsensitiver PCR-Testung (ab 1990) war in bestimmten Risikogruppen (z.B. Mehrfachtransfundierte und Leukämie-Patienten) mit einer erhöhten Prävalenz der HBV-Infektion zu rechnen. Durch „Needle Sharing“ und sexuelle Promiskuität kommt es auch heute noch bei Drogenabhängigen und Gefängnisinsassen häufiger zur HBV-Infektion [21, 18, 40].

#### 1.1.2 Klinische Bedeutung der HBV Infektion

##### 1.1.2.1 Übertragungswege der HBV Infektion

Die Infektion mit dem HBV erfolgt durch den Kontakt mit Körperflüssigkeiten über die Schleimhäute und Mikroläsionen der Haut. Feten können durch diaplazentare Transmission des HBV von der Mutter oder durch Integration des HBV Genoms in

das Chromatin der Spermien auch vom Vater bereits intrauterin mit HBV infiziert werden [97, 227, 6, 80].

### 1.1.2.2 Die akute Hepatitis B

Nach der Infektion mit dem HBV folgt in der Regel eine Inkubationszeit von 4-12 Wochen. Die darauf einsetzende akute Infektionsphase, deren Dauer etwa 2-12 Wochen beträgt, kann in ihrer klinischen Ausprägung schwer und ikterisch oder relativ symptomarm und anikterisch sein. Im weiteren Verlauf kann es zu folgenden Endzuständen oder Krankheitsbildern kommen:

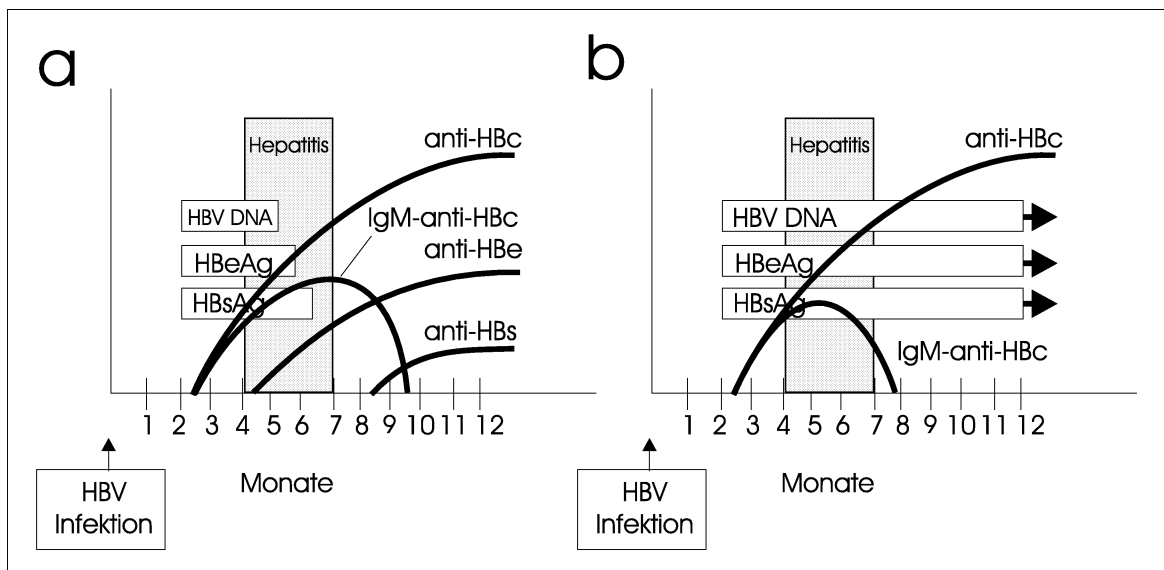
- Ausheilung und vollständige Elimination des HBV (80-90% der HBV-Infizierten, siehe Abb. 1.1a)
- fulminante Hepatitis mit häufig letalem Ausgang (0,5-1% der HBV-Infizierten)
- Übergang in die chronische Hepatitis B

### 1.1.2.3 Die chronische Hepatitis B

Etwa 6 Monate nach der akuten Infektion sind bei 5-10% der HBV-Infizierten die serologischen Parameter der aktiven HBV-Infektion (persistierende HBV DNA, HBe-Ag, HBsAg sowie fehlende Antikörperproduktion anti-HBe, anti-HBs, siehe Abb. 1.1b) als Indikator für einen chronischen Verlauf noch nachweisbar. Bei Neugeborenen kann es nach stattgefundenener vertikaler Transmission (diaplazentare Übertragung) in 90% zu chronischen Verläufen kommen [171].

Die Chronifizierung der akuten HBV-Infektion kann einerseits durch unzureichende Elimination des Virus durch das Immunsystem, andererseits durch das Auftreten von HBV-„Escape“-Mutanten (Veränderung der Antigenität) erklärt werden [201, 202, 19, 66].

Der klinische Verlauf der chronischen Hepatitis B wird eingeteilt in eine chronisch-persistierende oder eine chronisch-aggressive (fortschreitende und komplikationsträchtigere) Form. Komplikationen bei der chronischen Hepatitis B Infektion sind die Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom (HCC)[48]. Die Wahrscheinlichkeit der Manifestation dieser Komplikationen wird durch zusätzliche Infektionen (z.B. mit dem Hepatitis C Virus (HCV) oder dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV)), Alkoholabusus oder Immunsuppression erhöht [160, 199, 66].



**Abbildung 1.1:** Verlauf des klinischen Erscheinungsbildes und der serologischen Parameter HBeAg, HBsAg, anti-HBc, anti-HBe und anti-HBs bei einer akuten (a) und einer chronischen (b) HBV-Infektion. *Aus [37]*

#### 1.1.2.4 Diagnose der HBV-Infektion

Die HBV-Infektion und ihre Stadien lassen sich serologisch mittels Enzym-gekoppelter Antikörper-Untersuchungen (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA) gegen die viralen Proteine HBs-Ag und HBe-Ag und durch den Nachweis von HBe-, HBs- und HBe- Antikörpern diagnostizieren. In Fällen, bei denen diese serologischen Untersuchungen nicht sensitiv genug sind, ermöglichen hochsensitive molekularbiologische Methoden den Nachweis von HBV DNA. Mittels der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) kann man einen sensitiven, qualitativen und quantitativen Nachweis der aktiven HBV Infektion führen, obwohl diese HBsAg- oder HBeAg-negativ serologisch stumm verläuft [143, 2, 118, 129, 26].

#### 1.1.2.5 Therapie und Prophylaxe der HBV-Infektion

Die symptomatische Therapie der akuten und chronischen HBV-Hepatitis besteht in leberschonendem Verhalten wie Bettruhe, Alkohol- und Medikamentenkarenz. Kurativ kommt bei akuten Hepatitiden Interferon- (IFN-)  $\alpha$  und bei der chronischen Verlaufsform zusätzlich Polyethylenglykoliertes (PEG) IFN- $\alpha$  und das Nukleosidanalogen Lamivudin zum Einsatz [63, 203].

Die IFN-Therapie der chronischen Hepatitis B wird über eine Dauer von 20-24

Wochen durchgeführt. Ihr Erfolg ist abhängig von definierten Interferon-Prognosefaktoren (Konzentration der HBV DNA, Alter des Patienten, Immunsuppression, Existenz der HBV prä-Core Mutante, Stadium der Leberzirrhose) und resultiert in etwa 30-40% der Fälle in einer Ausheilung der HBV-Infektion. In der Regel werden  $3 \times 4,5$  bis  $3 \times 6 \times 10^6$  IE/Woche subkutan (s.c.) verabreicht [63, 21]. Die nicht unerheblichen Nebenwirkungen dieser Therapie, wie medikamenteninduzierte psychiatrische Komplikationen (Depression, Suizidalität), Depression des Knochenmarks und die Induktion von Autoimmunerkrankungen, zwingen nicht selten zu einem Abbruch der Therapie oder Reduktion der Dosis. PEGyliertes IFN- $\alpha$  ermöglicht durch seine siebenfach längere Halbwertszeit im Plasma ein einfacheres Therapieregime und langfristig höhere Wirkspiegel [21].

Neben der Interferon-Therapie ist seit 1999 in Deutschland die Therapie mit dem Nukleosidanalogen Lamivudin zugelassen. Hierdurch soll mit dem aus der HIV-Therapie stammenden Wirkstoff die Kontrolle der Virusreplikation durch Einbau funktionsloser Nukleosidanaloga (Lamivudin) herbeigeführt werden [203]. Ziel der Therapie ist es, die Viruslast bzw. die Virusreplikation im Organismus zu senken, welche zum Beispiel durch eine Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe erkennbar wird.

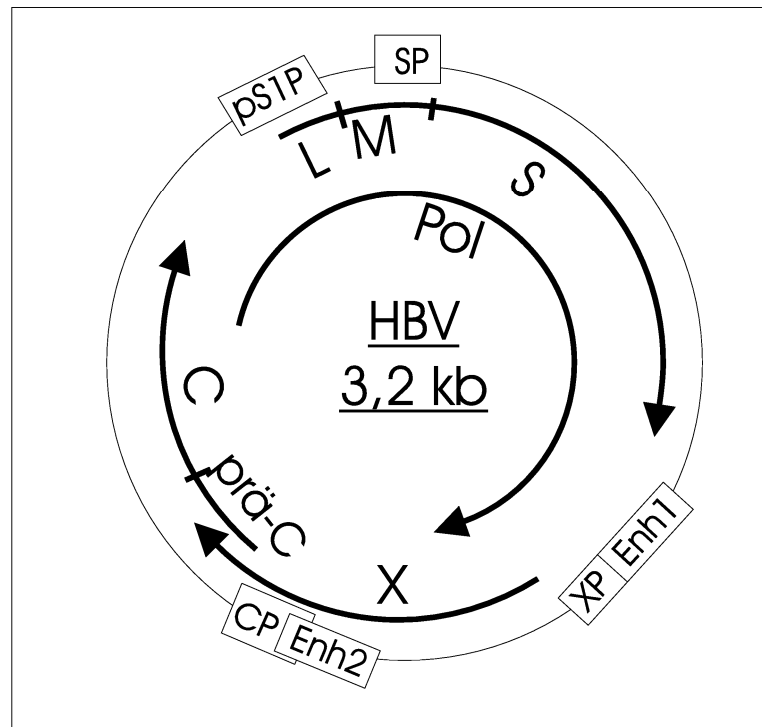
Als weitere Therapieoption werden HBV Immunglobuline (Hyperimmunglobulin, HBIG), besonders bei lebertransplantierten HBV-Infizierten, angewendet [199].

Die effizienteste, billigste und auf lange Sicht epidemiologisch wirksamste „Therapie“ ist die Impf-Prophylaxe mit rekombinant hergestelltem HBs-Ag, wobei nach Empfehlung der WHO besonders Kinder und Jugendliche geimpft werden sollen [140, 95].

### 1.1.3 Das HBV Genom, HBV Transkripte und HBV Proteine

#### 1.1.3.1 Das HBV Genom

Das HBV Genom wird im infektiösen Virion als etwa 3,2 Kilobasen (kb) großes, partiell doppelsträngiges (vollständiger (-)Strang, inkompletter (+)Strang) DNA-Molekül nachgewiesen. Die Organisation des HBV Genoms ist sehr komplex und setzt sich aus 4 überlappenden Leserahmen zusammen, die für die Oberflächenproteine, das Kapsidprotein, das X-Protein und die HBV Polymerase kodieren (siehe Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2:** Das HBV-Genom mit den offenen Leserahmen (Pfeile) für die Proteine prä-Core/Core (prä-C/C), Polymerase (Pol), X-Protein und die Oberflächenproteine L, M und S. Auf dem äußeren Kreis sind schematisch die regulierenden Elemente eingezeichnet: Core-Promotor (CP), X-Promotor (XP), prä-S1-Promotor (pS1P), S-Promotor (SP) und Enhancer 1 und 2 (Enh1, Enh2).

### 1.1.3.2 HBV Transkripte und Proteine

#### HBV mRNA-Spezies

Im Kern der infizierten Zelle werden von der episomalen HBV cccDNA (covalently closed circular DNA) folgende Transkripte hergestellt: prä-Core-, Kapsid- (Core) und Polymerase- mRNA (3,5 kB), großes Oberflächenprotein-Transkript (L-mRNA, 2,4 kB), mittleres (M-) und kleines (S-) Oberflächenprotein-Transkript (2,1 kB) und X-Protein-Transkript (0,7 kB) [57].

#### Die prägenomische RNA (pgRNA)

Die Transkription des 3,5 kB (=1.1-fache Überlänge) großen pgRNA-Moleküls initiiert in der prä-Core/Core - Region. Die pgRNA stellt über einen reversen Transkriptionsschritt die genomische Matrize zur Generierung der viralen DNA dar.

### **Das HBV prä-Core Protein**

Aus dem prä-Core Protein (24 kDa) entsteht durch posttranslationale carboxyterminale Verkürzung um 32-34 Aminosäuren (AS) das HBeAg (16 kDa) [58, 23]. Im Serum erscheint das HBeAg schon früh (e=„early“, siehe Abb. 1.1) und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Induktion der Immuntoleranz [145]. Es ist nicht Bestandteil des infektiösen Virus [184].

### **Das HBV Kapsidprotein (Core)**

Das Kapsid- oder Core-Protein (22 kDa) wird durch alternativen Translationsstart von einem dem prä-Core folgenden AUG exprimiert. Es fungiert als virales Kapsidprotein [24]. Durch die Proteinkinase C (PKC)-abhängige Phosphorylierung kann es wahrscheinlich die Ausschleusung von HBV Kapsiden steuern [90, 152]. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus auf den Enhancer 2 kann das Kapsidprotein die HBV Replikation erhöhen [109].

### **Die HBV Polymerase (Pol)**

Die HBV Polymerase (90 kDa) wird in einem zu prä-Core/Core alternativen Leserahmen von der 3,5 kb großen mRNA translatiert. Sie besitzt eine RT- (reverse Transkriptase), RNase H- und DNA-Polymerase - Aktivität [57].

### **Das M- und das L- Oberflächenprotein**

Der prä-S1-Promotor steuert die Produktion der Oberflächenproteine L („large“, 39 kDa) und M („middle“, 33 kDa). Das M-Protein besitzt die Fähigkeit, Serumalbumin zu binden [133, 44]. Das L-Protein ist zur Bindung an einen bislang unbekanntes Wirtsrezeptor nötig [103, 155, 165]. Zusätzlich reguliert das L-Protein die Konzentration an nukleärer HBV-cccDNA (siehe 1.1.5.1) [194, 195, 120].

### **Das S-Oberflächenprotein**

Der S-Promotor steuert die Expression des Hauptoberflächenproteins (24 kDa), das serologisch auch als HBsAg (s= „surface“ = Oberfläche) nachgewiesen wird. Es stellt einerseits den Hauptanteil an viralen Proteinen der äußeren Hülle des Virus dar, zum anderen ist es Bestandteil nicht-infektiöser HBsAg-Partikel.

### **Das HBV X-Protein (HBx)**

Der X-Promotor steuert die Expression mindestens einer X-Protein - Spezies, da

mehrere Startcodons im X-Gen-Leserahmen existieren. Für das X-Protein sind transaktivierende Eigenschaften, die zur Expressionssteigerung oder -hemmung von viralen und zellulären Proteinen führen, beschrieben [52, 134, 153, 176, 214]. Neben direkten DNA-Bindungen sind auch Protein-Protein-Interaktionen und Wechselwirkungen mit der Proteinkinase C gezeigt worden [98, 131]. Dem HBV X-Protein wird außerdem eine besondere Rolle in der Hepatokarzinogenese durch seine repressiven Effekte auf das p53-Tumorsuppressorprotein und der damit verbundenen Apoptoseblockade zugeschrieben [119, 168, 5, 214].

## 1.1.4 Regulation der HBV Transkription

### 1.1.4.1 Der HBV Core Promotor und Enhancer 2

Der HBV Core Promotor spielt eine zentrale Rolle in der HBV-Replikation, da er sowohl die Expression der prä-Core/Core - mRNA als auch der prägenomischen RNA steuert (pgRNA, siehe 1.1.3.2, S. 14). Die 236 bp große Core Promotor- und Enhancer 2 - Region (fcp, Volllänge Core Promotor = „full length core promotor“) befindet sich am 3'-Ende des X-Genes (siehe Abb. 1.3). Der Volllänge Core Promotor kann unterteilt werden in eine am 5'-Ende gelegene funktionelle Region mit einem regulatorischen Element (URR = „upper regulatory region“, größter Teil des Enhancer 2 (Enh2)) und den am 3'-Ende befindlichen basalen Core Promotor (bcp=„basic core promotor“) [223].

**Das URR-Element** hat verstärkenden Einfluß auf den basalen Core Promotor (bcp). In dieser Region liegen die Bindungsstellen für die leberspezifischen Transkriptionsfaktoren LEF (liver enriched factor), HNF1 (Hepatocyte nuclear factor 1), HNF3, HNF4 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) [209, 88, 67, 130]. Der Enhancer 2, der einen großen Bereich der URR einnimmt, reguliert zudem den S- und X-Promotor [225, 224].

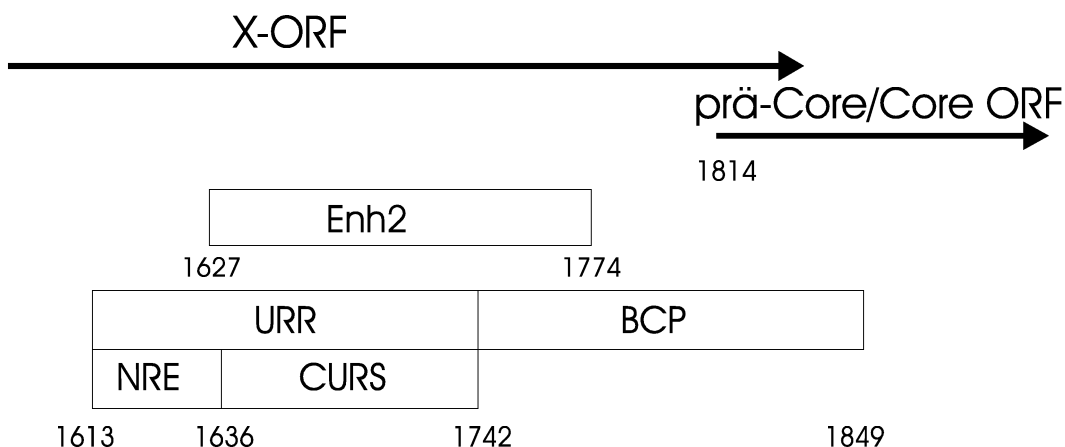
**Im basalen Core Promotor (bcp)** liegen 4 AT-reiche Sequenzen mit Homologie zur eukaryontischen TATA-Box. Die Transkription der prä-Core/Core - mRNA kann in einer der drei am 5'-Ende gelegenen TATA-ähnlichen Sequenzen initiiert werden [74]. An der vierten TATA-ähnlichen Region startet die Transkription der pgRNA [222, 28]. Neben den oben erwähnten leberspezifischen Transkriptionsfaktoren binden hier vor allem ubiquitär vorkommende Faktoren, wie Sp1 und TBP (TATA-binding protein) [226].



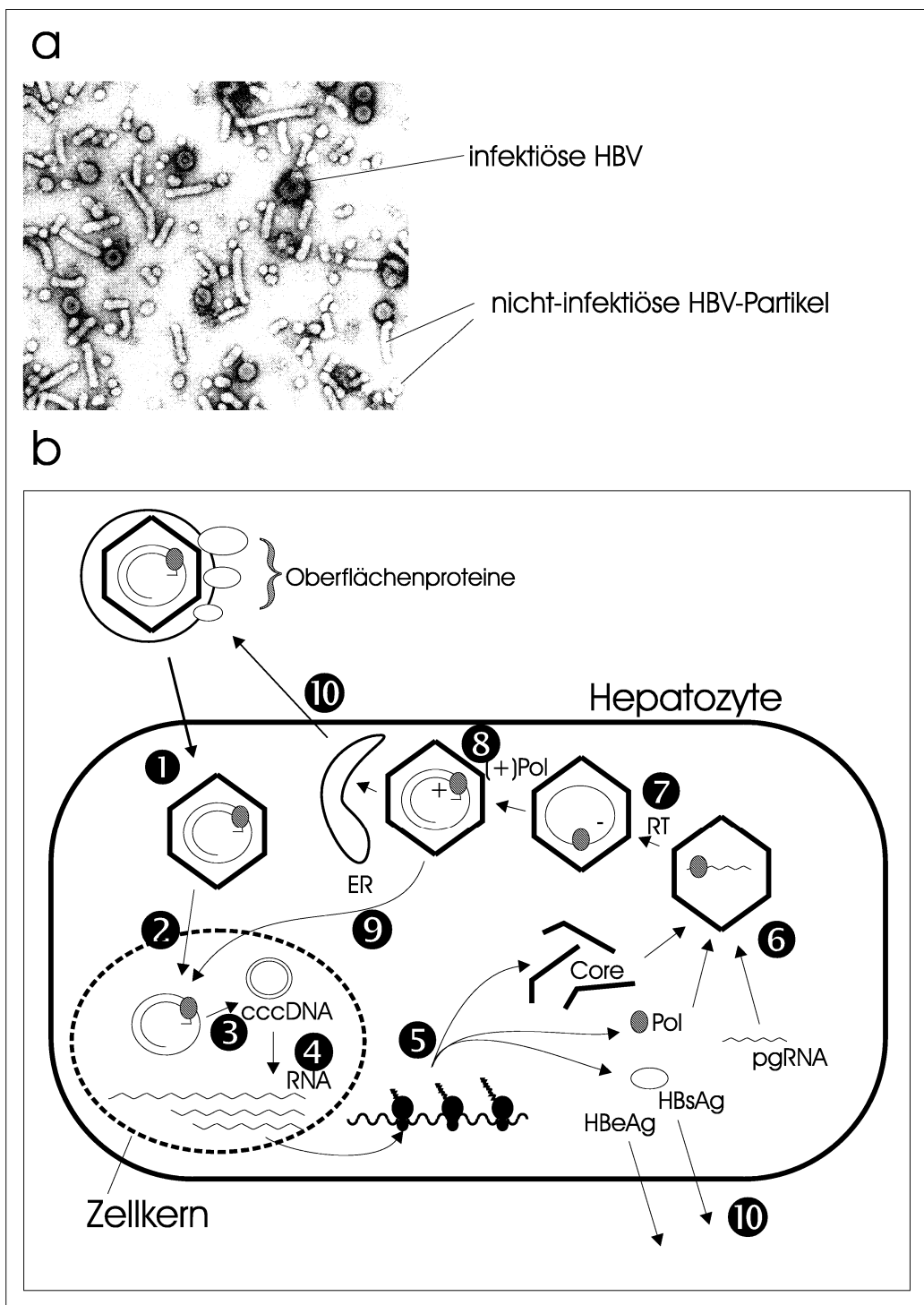
Mutationen im Bereich des Core Promotors haben in der Regel große Auswirkungen auf die Replikationskompetenz des HBV. Bestimmte Mutationen, z.B. an den Positionen 1762 und 1764 (1762T,1764A - Doppelmutation) oder die 1896-Stop-Punktmutation, führen zur Repression der prä-Core - Expression und damit zu serologisch HBeAg-negativen HBV-Infektionen. Diese Mutationen haben klinische Bedeutung und werden bei chronischen oder fulminanten Verläufen beobachtet [99, 159, 183, 25, 113, 114, 105].

#### 1.1.4.2 Der Enhancer 1 (Enh1)

Dieses vor dem X-Gen gelegene Steuerelement (siehe Abb. 1.2, S. 14) erhöht die Promotoraktivität des Volllänge Core Promotors (fcp) um den Faktor 13 (eigene Ergebnisse, siehe 3.7, S. 110). Spezifische Mutationen in diesem Bereich sind mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert, was auf die Bedeutung des Enh1 für die HBV - Replikation hinweist [19]. Der Enh1 beinhaltet Bindungsstellen für die leberspezifischen Transkriptionsfaktoren C/EBP, HNF1, HNF3, HNF4, LEF, RFX1, OCT-2 und AP1.



**Abbildung 1.3:** Schema des Enhancer 2 (Enh2) und des Core Promotors mit seinen Untereinheiten URR (upper regulatory region), NRE (negative regulatory element), CURS (core upstream regulatory sequence) und BCP (basic core promoter). Die Start- und Endpunkte der dargestellten Elemente beziehen sich auf die Position Eco-RI - Schnittstelle  $\equiv$  1. Zur Orientierung sind die an dieser Stelle überlappenden Leserahmen des X-Gens (X-ORF) und der Startpunkt des prä-Core/Core - Leserahmens (prä-Core/Core ORF) dargestellt. *Nach [105].*



**Abbildung 1.4:** (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von infektiösen und nicht-infektiösen HBV-Partikeln. *EM-Aufnahme: Dr. C.T. Bock* (b) Schema des Replikationszyklus des HBV. Nach Virusaufnahme (1) in die Wirtszelle erfolgt das Entpacken und der Import des HBV-Genoms in den Kern (2). Dort wird das partiell doppelsträngige Genom zur cccDNA „repariert“ (3) und diese transkribiert (4). Die synthetisierten (5) Proteine Core und Pol (Polymerase) bilden zusammen mit der pgRNA das HBV-Virion (6). Im Virion wird die pgRNA zunächst in (-)Strang DNA (RT-Schritt, 7) und diese in eine unvollständige (+)Strang DNA ((+) Pol, 8) übersetzt. Die cccDNA-Homöostase wird durch einen intrazellulären Infektionsweg sichergestellt (9). Die Ausschleusung des Virions sowie der Oberflächenproteine und des HBeAg erfolgt über den konstitutiv sekretorischen Signalweg (10).

## 1.1.5 Der HBV - Replikationszyklus

### 1.1.5.1 Ausgangspunkt der HBV Replikation: die HBV cccDNA

Ausgangspunkt für die Transkription der verschiedenen viralen RNAs sind etwa 10-20 Moleküle der HBV - cccDNA im Zellkern der infizierten Zelle [137, 211]. Dieser Vorrat an HBV - cccDNA wird bei Zellteilungen (z.B. bei Regenerationsvorgängen der Leber) weitergegeben und stetig durch Recycling zytoplasmatischer Virus-DNA aufrechterhalten (intrazellulärer Infektionsweg) [152].

### 1.1.5.2 Kapsidbildung und Enkapsidierung der HBV pgRNA

HBV Core lagert sich intrazellulär und in vitro spontan zu Dimeren zusammen [228]. Ab einer bestimmten Schwellenkonzentration (ca.  $1\mu\text{M}$  HBV Core Dimere) kommt es zur Bildung intakter Kapside [187].

Zur Enkapsidierung der pgRNA bindet der N-Terminus der HBV-Polymerase am 5' gelegenen  $\epsilon$ -Bereich (Verpackungsstruktur) der pgRNA, während der Carboxyterminus mit dem Core-Protein interagiert [106, 76].

### 1.1.5.3 Reverse Transkription und Replikation des HBV Genoms

Die enkapsidierte pgRNA ist terminal redundant und besitzt an beiden Enden den  $\epsilon$ -Bereich und den „Direct Repeat“ 1 (DR1). Ein Tyrosin-Rest der HBV Polymerase stellt die für die Polymeraseaktivität notwendige 3'-OH-Gruppe zur Verfügung [210, 230]. Die reverse Transkription der HBV pgRNA wird zunächst am 5'- $\epsilon$  initiiert und dann zum 3'- $\epsilon$  verlagert. Von diesem Punkt aus wird der komplette HBV DNA Minusstrang generiert. Gleichzeitig wird das pgRNA-Template bis auf den 5'-Rest durch die RNaseH-Aktivität der HBV Polymerase abgebaut [169, 193].

Primer für die Synthese des HBV-Plusstrangs ist der 5'-Rest der verbliebenen pgRNA. Er wird an das 3'-Ende verlagert und bindet dort an den DR2 des Minusstranges [191]. Von hier aus startet die Synthese des Plusstranges, die vermutlich durch dNTP-Verbrauch limitiert wird. Damit bleibt der Plusstrang unvollständig und es resultiert die für das HBV typische partiell doppelsträngige Konfiguration des Virusgenoms [221].

#### 1.1.5.4 Ausschleusung von reifen HBV Partikeln

Das HBV wird aus der Zelle über den konstitutiven Sekretionsweg (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) ausgeschleust. Ohne die Oberflächenproteine S und L ist eine Virusausschleusung nicht möglich [22, 206].

## 1.2 Die Hepatitis C Virus - Infektion (HCV)

### 1.2.1 Epidemiologische Bedeutung der HCV-Infektion

#### 1.2.1.1 Epidemiologie und Risikogruppen

Es wird geschätzt, dass weltweit etwa 170 Millionen Menschen mit dem Hepatitis C Virus infiziert sind [218, 117, 142]. Die Prävalenz ist abhängig von der Region: so sind 0,01%-0,1% der Bevölkerung in Großbritannien und Skandinavien, 0,2%-0,5% in Australien und Westeuropa, 2% in den USA und bis zu 20% in Ägypten HCV-positiv [218]. 40% der chronischen Lebererkrankungen gehen auf eine HCV Infektion zurück [21].

Die Hauptrisikogruppen für eine Infektion mit dem HCV stellen Drogenabhängige, Gefängnisinsassen, psychisch Schwerkranke, Dialysepflichtige, Mehrfachtransfundierte (z.B. Hämophile) und Organtransplantierte dar [218, 162].

Die späte Beschreibung des HCV im Jahr 1989 [34] und die bis dahin uneinheitliche Testung und Inaktivierung von Blutprodukten, belastete transfusionspflichtige Patienten mit einem Risiko von 10% (1970) bis 3,8% (1986), an der damals als „non-A-non-B-Hepatitis“ bezeichneten Hepatitis C zu erkranken. Mit Hilfe verbesserter molekularbiologischer Detektionsmethoden (RT-PCR) ist es heute möglich, das Risiko einer Transfusionshepatitis C auf 1:100.000 zu senken [21, 117].

#### 1.2.1.2 Epidemiologie der HCV Genotypen

Das HCV kann in 9 übergeordnete Genotypgruppen mit mehr als 80 Untergruppen unterteilt werden. In den USA und Europa ist der Genotyp 1 vorherrschend (60-70%), gefolgt von den Genotypen 2 und 3, die zu etwa gleichen Teilen bei 15-30% der Infizierten gefunden werden (siehe Abb. 1.5)[41, 116]. In Europa dominiert der Genotyp 1b, der mit einem aggressiveren histo-pathologischen und klinischen Verlauf assoziiert wird [144, 157].

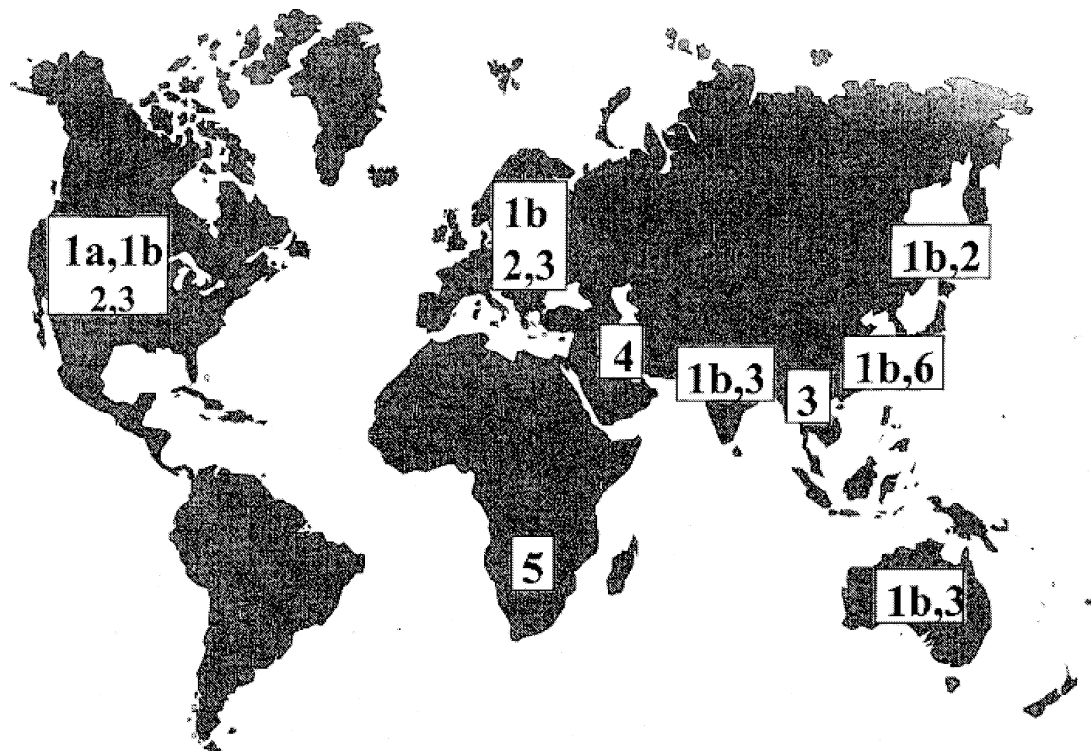


Abbildung 1.5: Die geografische Verteilung der HCV Genotypen 1-6. Aus [41]

## 1.2.2 Klinische Bedeutung und Krankheitsverlauf der HCV-Infektion

### 1.2.2.1 Die Übertragungswege des HCV

Die Infektion mit dem HCV erfolgt hauptsächlich über den Blutweg, mit geringerer Wahrscheinlichkeit über die Schleimhäute und über die Geburtswege [218]. Stichverletzungen an Injektionsnadeln HCV-RNA positiver Patienten haben ein geschätztes Virusübertragungsrisiko von 3-10% [112, 147].

### 1.2.2.2 Klinischer Verlauf

Nach einer Inkubationszeit von 15-160 Tagen (im Mittel 50) kann es zu milden Symptomen einer akuten Hepatitis (Ikterus, Übelkeit, Abgeschlagenheit) kommen. Häufig bleibt die akute Infektion auch unerkannt [21]. Verglichen mit der HBV-assoziierten Hepatitis kommt es bei einer HCV-Infektion zunächst zu einem ausgesprochen milden Krankheitsverlauf.

Im Gegensatz zur HBV-Infektion entwickeln jedoch 80-90% der HCV-Infizierten

einen chronischen Verlauf der HCV-Infektion. Bei 20-50% der chronischen HCV-Hepatitis entsteht nach durchschnittlich 10-20 Jahren eine Leberzirrhose und ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) [48]. Die fulminante Hepatitis ist mit 0,1% ein seltenes Ereignis bei der HCV-Infektion [21].

Die Prognose scheint abhängig vom HCV Genotyp. Wie bei HBV spielen auch bei HCV noch zusätzliche Wirts- und Umweltfaktoren wie das Patientenalter, Immunsuppression, Alkoholabusus und Koinfektion (v.a. mit HIV und HBV) eine Rolle [170, 117].

### 1.2.2.3 Diagnose der HCV-Infektion

Die akute HCV-Hepatitis kann bei hohen Transaminasenwerten (GOT > 20 U/l) durch serologische Tests auf anti-HCV-Antikörper (Test auf Antikörper gegen das Kapsid und die Nichtstruktur-Proteine 3, 4 und 5) diagnostiziert werden. Besonders bei Patienten mit Kryoglobulinämie (bei 4°C präzipitierende Immunglobuline; Kryoglobulinämie wird bei 50% der HCV-Infizierten nachgewiesen) und Immunsupprimierten (HIV Koinfektion!) kommt es bei diesen Untersuchungen jedoch häufiger (>10%) zu falschnegativen Befunden [117].

Deshalb werden die serologischen Untersuchungen zunehmend mit hoch-sensitiven molekularbiologischen (reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)) Verfahren kombiniert. Die Nachweisgrenze liegt bei „nested“ RT-PCR Untersuchungen unter 100 RNA-Kopien pro Milliliter Serum [197, 143]. Die quantitative RT-PCR ermöglicht zusätzlich eine Verlaufskontrolle der HCV-Infektion und damit eine eventuelle Modifikation der Therapie [15, 87].

Über die direkte Sequenzierung der Referenzregionen 5'-UTR, E1 und NS5B des HCV Genoms und dem Abgleich mit der Datenbank wird die Identifikation des HCV-Genotyps ermöglicht. Dieser spielt in der Entscheidung für das zu wählende Therapieschema eine wichtige Rolle [161].

### 1.2.2.4 Therapie der HCV-Infektion

Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) kann bei 40% der akut HCV-Infizierten das Fortschreiten in den chronischen Krankheitsverlauf verhindern.

Bei 50% der chronisch HCV-Infizierten kann durch eine 6-monatige IFN- $\alpha$ -Monotherapie eine Normalisierung der Transaminasen, bei 30% ein Absenken der HCV

RNA unter die Nachweisgrenze molekularbiologischer Detektionsverfahren erreicht werden. Nach Absetzen der Therapie kommt es jedoch in der Regel zu Rückfällen, so dass mit diesem Therapieschema höchstens 10% der therapierten chronisch HCV-Infizierten als geheilt betrachtet werden können [161].

Bei Rückfällen sowie bei den HCV-Genotyp 1-infizierten Patienten führt man eine Kombinationstherapie mit hochdosiertem IFN- $\alpha$  und dem Guanosin-Analogen Ribavirin durch. Mit diesem Therapieregime sind bis zu 40% der Patienten in Remission zu bringen [141, 208, 161].

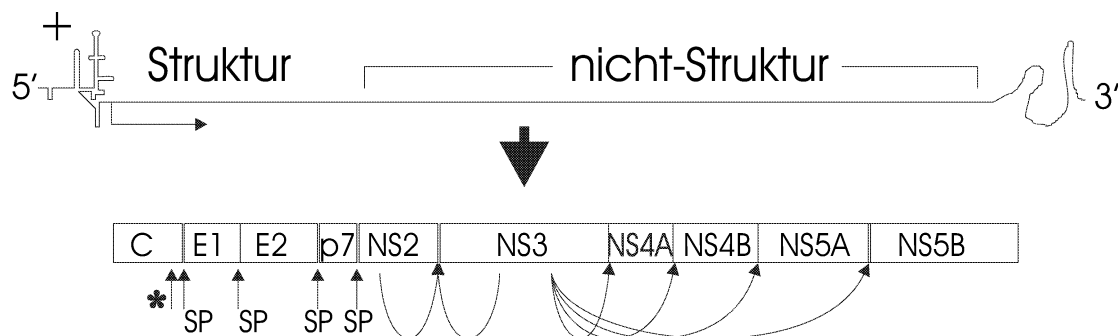
Die Rückfallrate kann außerdem durch Verwendung von Polyethylenglykolisiertem (PEGyliertem) IFN- $\alpha$ , einem Präparat mit längerer Halbwertszeit und besserer Bioverfügbarkeit, gesenkt werden [38, 93, 68].

Bei dekompensierter Leberzirrhose wird die orthotope Lebertransplantation (OLT) mit anschließender IFN- $\alpha$ -Ribavirin - Therapie durchgeführt [179, 82, 21].

Alternativ zu den beschriebenen Therapieschemata befinden sich weitere antivirale Substanzen wie Amantadin, Micophenolat,  $\alpha$ 1-Thymosin, Maxamine sowie HCV-Protease-, HCV-Helikase- und HCV-Polymeraseinhibitoren in klinischer Erprobung [82]. Weiterhin werden gentechnische Ansätze (DNA-Vakzinierung, „Antisense“ RNA) zur Impfprophylaxe gegen HCV geprüft. Ziel ist die Stimulation von zytotoxischen und T-Helfer-Zell - Antworten gegen die HCV-Proteine NS3 und Core [64, 9, 138].

### 1.2.3 Das HCV Genom und seine Produkte

Das Hepatitis C Virus gehört zur Familie der Flaviviridae. Hierzu gehören auch das Gelbfieber- und das Hepatitis G Virus (GBV-C). Das umhüllte HCV Viruspartikel enthält die ca. 9600 bp lange Plusstrang RNA, die für das HCV Polyprotein kodiert. Dieses Polyprotein wird durch zelluläre Signalpeptidasen und virale Autoproteasen in Struktur- (Core, E1, E2, p7) und Nichtstrukturproteine (NS2 bis NS5) gespalten (siehe Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6:** Schema des HCV Genoms und des Polyproteins (C-NS5B). Die aus dem Polyprotein durch die zelluläre Signalpeptidase (SP), die NS2-NS3-Autopeptidase und NS3-Protease gespaltenen Proteine sind dargestellt. (\*) bezeichnet die Spaltstelle der p21 Core Variante. *Nach [13].*

Nachfolgend sind die Funktionen der Einzelproteine des HCV Polyproteins aufgelistet:

HCV Protein	AS[42]	Funktion
Core	1-191	Nukleokapsid, Transaktivator, Translationsregulation, Apoptoseschutz [142]
E1	192-383	Hüll-Glycoprotein [43]
E2	384-746	Hüll-Glycoprotein [43], CD81-Ligand [198], „Escape“-Funktion vor der Immunantwort des Wirts durch die hypervariablen Regionen 1 und 2 (HVR1,HVR2) [94]
p7	747-809	Membrananker im Endoplasmatischen Retikulum (ER) [148]
NS2-NS3	810-1026	NS2-NS3-Autopeptidase: spaltet die Peptidbindung zwischen NS2 und NS3 [61]
NS3	1027-1657	Serin Protease (AS 1-180) [12], RNA Helikase (AS 181-631), Nukleosidtriphosphatase
NS4A	1658-1711	NS3 Kofaktor [51, 12], NS5A Phosphorylierungskofaktor [10]
NS4B	1712-1972	Membrananker für Replikase-Komplex und Virusausschleusung [47]
NS5A	1973-2420	Interferon-Resistenz [49]
NS5B	2421-3010	RNA-abhängige RNA-Polymerase („RNA dependent RNA polymerase“, RdRp) [14]



### 1.2.3.1 Nichttranslatierte Regionen

Im HCV-Genom existieren am 5'- und am 3'-Ende nichttranslatierte Regionen („Untranslated Region“, UTR). Sie spielen eine Rolle bei der Translationsinitiation und -modulation (siehe 1.2.5.2, S. 27). Bedingt durch diese wichtigen Funktionen stellen diese Regionen die am höchsten konservierten Bereiche im HCV Genom dar.

## 1.2.4 Das HCV Core Protein

### 1.2.4.1 Synthese und Domänen des HCV Core Proteins

Das HCV Core Protein wird nach der initialen Translation des HCV-Polyproteins durch die Signalpeptidase nach der Aminosäure- (AS-) Position 191 sowie an einer weiteren Stelle zwischen AS 174 und 191 abgespalten. Daraus resultieren Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kDa (p23) und 21 kDa (p21) [217, 62, 81]. Beim HCV Genotyp 1 und bei der Expression von HCV Core Transfektionskonstrukten ohne E1-Anteil entsteht außerdem noch ein p16-Protein (C-terminal trunziert) [127, 126].

Von der Aminosäurezusammensetzung ausgehend kann das Core Protein in drei Domänen unterteilt werden. Domäne 1 (AS 1-122) enthält basische Aminosäureregionen und stellt wahrscheinlich den „Funktionskern“ (RNA-Bindung [178], Oligomerisierung [139], Proteininteraktionen) dar. Domäne 2 (AS 123-174) und Domäne 3 (AS 175-191) sind wesentlich hydrophober und dienen vermutlich der intrazellulären Lokalisation [196], Assoziation mit Apolipoprotein AII (einem HDL-Bestandteil) [11] und der Oligomerisierung (Kapsidbildung) [139, 156] von HCV Core. Domäne 3 stellt die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase dar [142].

### 1.2.4.2 Intrazelluläre Lokalisation des HCV Core Proteins

Von elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiß man, dass das HCV Core Protein hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist [178, 150]. Im Zytoplasma findet eine Prozessierung der p23-Variante zu p21 statt. Im Zellkern kann das HCV Core Protein als p21 und p16, jedoch in einer anderen Konformation als die zytoplasmatischen Formen, nachgewiesen werden [217, 126].

### 1.2.4.3 HCV-Kapsidbildung

Das HCV Core Protein bildet das Kapsid des 55-65 nm großen sphärischen HCV-Partikels [83]. Der Zusammenbau der HCV Virionen an intrazellulären Membranen ist Folge von Konformationsänderungen im Core Protein, welche mit einer zunehmenden Proteinase-Resistenz einhergehen [17, 108]. Auslöser der Faltbewegungen im Molekül ist vermutlich die Bindung an HCV RNA [108, 107].

### 1.2.4.4 Beeinflussung zellulärer Signalwege durch das HCV Core Protein

Das HCV Core Protein kann durch bisher wenig geklärte Mechanismen Einfluß auf eine Reihe von zellulären Signalkaskaden nehmen:

#### 1.2.4.4.1 Der Einfluß des HCV Core Proteins auf den Zellzyklus

HCV Core reprimiert das Retinoblastoma-Protein (pRb) und führt damit zu einem Anstieg des durch pRb-inaktiv gehaltenen E2F-Proteins. E2F ist der zelluläre Faktor für den Übertritt aus der G1- in die Synthese- (S-) Phase [32]. Ebenso sind die für die Durchführung der S-Phase bedeutsamen Cyclin E Konzentrationen und assoziierte Kinaseaktivitäten erhöht [33]. Dies spricht für eine proliferationsfördernde Eigenschaft von HCV Core.

#### 1.2.4.4.2 Apoptosebeeinflussung durch das HCV Core Protein

Sowohl der durch äußere Stimuli getriggerte TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ ) als auch der durch akkumulierende DNA-Fehler gestartete interne Apoptoseweg scheinen durch HCV Core beeinflusst zu werden. Über eine Komplexbildung des HCV Core Proteins mit dem TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) [36] kommt es zu signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B (Nukleärer Faktor  $\kappa$ B) - Werten [220], die apoptoseprotektiv wirken. Abhängig davon, ob HCV Core im Zellkern oder im Zytoplasma vorliegt, kommt es zu einer Repression oder zu einer Steigerung des zellulären p21-Proteins (Apoptoseinduktor bei DNA-Schäden) [215, 89]. Auch weitere Apoptoseinduktoren, wie z.B. p53 und c-fos, werden wahrscheinlich durch HCV Core inhibiert [173, 172].

#### 1.2.4.4.3 Störung des MAPK-Signalwegs durch HCV Core

Einige Arbeiten belegen, dass der für die Steuerung vieler Proteinkinasen wichtige

MAPK (Mitogen-activated Proteinkinase) Signalweg durch HCV Core über Wechselwirkungen mit der Raf-1-kinase stimuliert wird [50, 55, 8]. Dies demonstriert wiederum die proliferationsfördernde Eigenschaft des HCV Core Proteins.

Diese Ergebnisse sprechen für einen wesentlichen Einfluß des HCV Core Proteins auf die Zellproliferation. HCV Core kann sowohl externe als auch interne Apoptosesignale abschwächen und auf diesem Weg zur Chronifizierung der Infektion („Escape“ vor den zytotoxischen T-Zellen) und zum Progress der Lebererkrankung, mit der Entwicklung zum HCC, beitragen.

#### **1.2.4.5 Interaktionen von HCV Core mit den anderen HCV Proteinen**

Das HCV Core Protein kann mit dem HCV E1 (Envelope) Protein in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) interagieren. Dabei ist E1 lumenseitig und Core zytoplasmatisch, perinukleär lokalisiert. Die Bindung findet bei Core zwischen den AS 151-173 (Carboxyterminus) und bei E1 zwischen den AS 370-380 (Carboxyterminus) statt. Damit können HCV Core Spezies, die kleiner als 151 AS (p16) und primär intranukleär lokalisiert sind, keine Bindung mit E1 eingehen [128].

Interaktionen mit anderen HCV Proteinen außer E1 konnten bisher nicht gezeigt werden [142].

### **1.2.5 Der HCV Replikationszyklus**

#### **1.2.5.1 Virusaufnahme in die Zelle**

Der CD81- und der Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R) wurden als zelluläre Rezeptoren für HCV beschrieben [198, 180, 13, 149]. Die Erkennung und Bindung an CD81 finden an zwei unterschiedlichen Stellen im HCV E2-Protein statt und haben eine vom Virustyp (1a oder 1b) abhängige Kinetik [174]. Die Internalisation des HCV Partikels geschieht vermutlich über Endozytose (siehe Abb. 1.7, b.1). Genauere Daten liegen bislang nicht vor [198, 180].

#### **1.2.5.2 Die Translation des HCV Genoms**

Nach der Aufnahme und dem Entpacken kann die HCV RNA sofort an den Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert werden (siehe Abb. 1.7, b.2-4). Ermöglicht wird dies durch die am äußersten 5'-Ende (5'-UTR) des

HCV-Genoms gelegene 341 Basen lange Ribosomenbindungsstelle („Internal Ribosomal Entry Site“, IRES). Sie ersetzt das 5'-Cap eukaryontischer mRNA und den eukaryontischen Translationsfaktor 4 („eukaryotic initiation factor 4“, eIF4) [100]. Die Translationseffizienz wird durch die ersten 100 Basen des folgenden HCV Core Gens und durch die 3'-UTR noch gesteigert [132, 85]. Eine negative Regulation der IRES durch das HCV Core Protein ist beschrieben [121].

### 1.2.5.3 HCV RNA-Replikation

Die Amplifikation des viralen Genoms wird durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) NS5B bewerkstelligt, die zusammen mit den Proteinen NS3, NS4, NS5A und vermutlich auch zellulären Proteinen einen Replikase-Komplex am endoplasmatischen Retikulum (ER) bildet (siehe Abb. 1.7, b.5) [47, 73, 84].

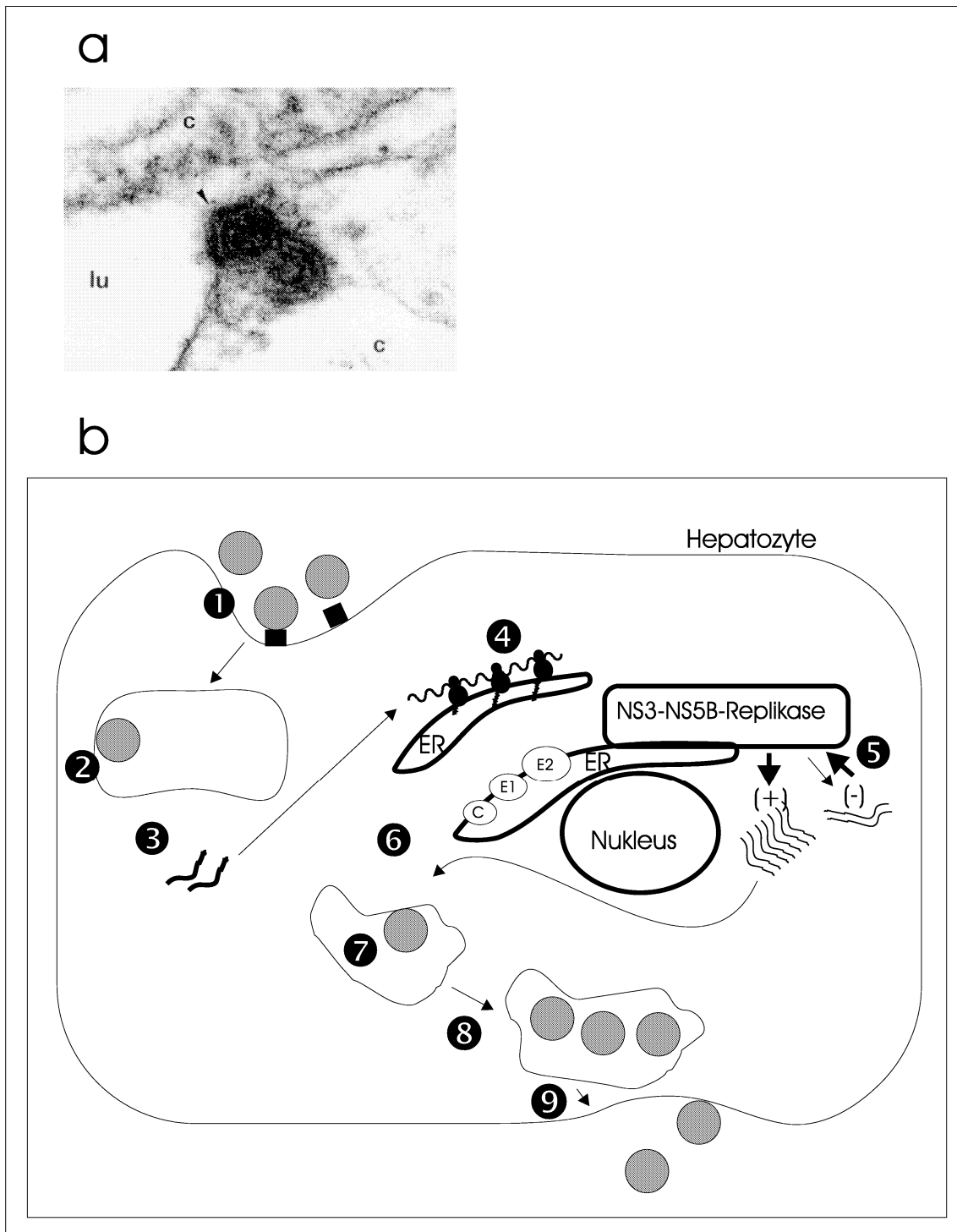
NS5B katalysiert sowohl die Produktion von Minus- als auch Plusstrang RNA (im Verhältnis 1:10). Die Polymeraseaktivität kann in vitro Primer-abhängig (hierbei dient die 3'-UTR als Primer) und Primer-unabhängig ablaufen [14]. NS5B bindet bevorzugt am 3'-Ende seiner kodierenden Sequenz [101]. Dies stellt eine Selektionsmöglichkeit gegen defekte HCV Genome dar [158].

Eine Fehlerrate von ungefähr  $10^{-4}$  und eine Produktion von etwa  $10^{12}$  Virionen pro Tag (etwa 50 Partikel pro Leberzelle bei 10% infizierten Hepatozyten) führen zu einer schnellen Generierung von Virusvarianten, die als Quasispezies bezeichnet werden. Das Viruspartikel besitzt im peripheren Blut eine Halbwertszeit von 3-5 Stunden [154].

### 1.2.5.4 Ausschleusen aus der Zelle

Der Zusammenbau des Hepatitis C Virions ist in Abschnitt 1.2.4.3, S. 26 beschrieben. Die HCV Kapside mit einem Durchmesser von etwa 30 nm binden an die extraluminale Seite des ER und stülpen sich mit der ER-Membran („Budding“) in das ER-Lumen (siehe Abb. 1.7,a und b.6-7), womit sie ihre endgültige Größe von ca. 50-60 nm erhalten [17].

Die Ausschleusung des Virions geschieht wahrscheinlich über den konstitutiv sekretorischen Signalweg durch Assoziation mit den im ER retinierten HCV Proteinen E1 und E2. Möglicherweise sind weitere virale Proteine (z.B. p7) und zelluläre „Komponenten“ (z.B. N-Glykosylierung) für das Ansteuern des Golgi-Apparates nötig (siehe Abb. 1.7, b.8-9) [17, 13, 136, 181].



**Abbildung 1.7:** (a) Das „Budding“ eines rekombinanten HCV-Partikels in das Lumen (lu) des Endoplasmatischen Retikulums. c = Zytosol. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus [17]. (b) Schema der HCV Replikation. Nach endozytischer Virusaufnahme (1) in den Hepatozyten erfolgt die pH-abhängige Verschmelzung mit den Vesikelmembranen (2) und das Entpacken der HCV Plusstrang-RNA (3). Diese wird sofort von den Ribosomen am Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert und das entstehende Polyprotein prozessiert (4). Die HCV-Proteine bleiben mit den Membranen des ER assoziiert. Die von der HCV-Replikase NS3-NS5B produzierte Plusstrang-RNA (5) bindet an das HCV Core Protein (C), welches darauf polymerisiert (6) und die Virusmorphogenese in den Vesikeln („Budding“) startet (7). Es erfolgt die Glykosylierung der Oberflächenproteine E1 und E2 (8) und die Ausschleusung der Virionen (9).

## 1.3 HBV-HCV - Koinfektion

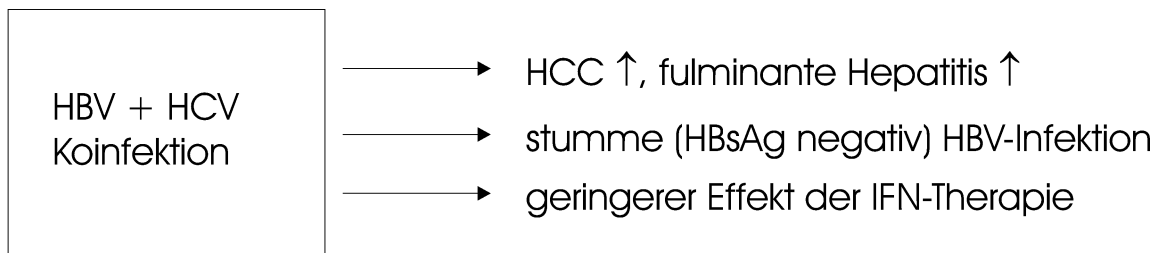
### 1.3.1 Epidemiologische Bedeutung

Weltweit ist davon auszugehen, dass 10-20% der chronisch HBV-Infizierten zusätzlich HCV-positiv sind [71, 122]. Es gibt jedoch bestimmte Risikogruppen, in denen die Inzidenz der HBV-HCV-Koinfektion wesentlich höher ist, als in der untersuchten Gesamtpopulation. So kann die Rate bei Drogenabhängigen/Polytoxikomanen um ein Vielfaches höher liegen. Spanische Drogenabhängige sind beispielsweise in 42,5% der Fälle positiv für eine HBV-HCV Koinfektion, während sich eine Monoinfektion mit HBV oder HCV nur bei 13% nachweisen läßt [160]. Betrachtet man nur die Drogenabhängigen mit der Diagnose einer akuten Hepatitis B, so sind in diesem Kollektiv sogar 93,6% HCV-positiv [175].

Eine besondere Schwierigkeit für die Interpretation epidemiologischer Daten ist das Auftreten HBsAg-negativer Verläufe unter einer HBV-HCV-Ko- oder Superinfektion. Diese Beobachtung ist erst durch die hoch-sensitive molekularbiologische Erregerdiagnostik (z.B. PCR) möglich geworden. Chronisch HCV-Infizierte sind in hohem Anteil zwar HBsAg negativ (serologisch stumm), aber HBV DNA positiv (9,2%-86,7%, je nach untersuchter Population) [167, 96, 192, 56, 205, 118]. Es konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der HBV-HCV-Koinfektion zum Abfall der HBsAg Konzentration im Serum kommt [146].

Es ist also davon auszugehen, dass die Prävalenzrate der HBV-HCV-Koinfektion noch nach oben korrigiert werden muss. Bei einem Großteil dieser Patienten wird die HBV Infektion nur durch die PCR diagnostiziert werden können [118, 26].

Widersprüchlich diskutiert wird in der Literatur, welches Virus die dominierende Rolle bei der Doppelinfektion übernimmt. Einige Arbeitsgruppen kommen zu dem Schluß, dass HBV durch HCV reprimiert wird [39, 65, 167], andere dagegen sehen das HBV als Suppressor auf die HCV-Replikation [96]. Möglich ist auch, dass das superinfizierende Hepatitisvirus (B oder C) das persistierende Hepatitisvirus (B oder C) kontrolliert [123].



**Abbildung 1.8:** Synopsis der klinischen Problematik der HBV-HCV Koinfektion

## 1.3.2 Klinische Bedeutung und Krankheitsverlauf der HBV-HCV-Koinfektion

### 1.3.2.1 Risikogruppen und Übertragungswege

Die Risikogruppen und mögliche Übertragungswege für eine HBV-HCV-Koinfektion sind nahezu identisch (siehe 1.1.2, S. 10 und 1.2.2, S. 21). So kann davon ausgegangen werden, dass bei längerer Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe die Wahrscheinlichkeit einer Koinfektion steigt [160].

### 1.3.2.2 Klinischer Verlauf der HBV-HCV-Koinfektion

Die meisten Publikationen berichten von einem schlechterem Verlauf der Koinfektion mit dem Hepatitis B und Hepatitis C Virus, verglichen mit der jeweiligen Monoinfektion. Die Pathologie der chronischen Koinfektion ist gegenüber der Monoinfektion charakterisiert durch erhöhte Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) - Aktivitäten und stärkere lobuläre Entzündung und Fibrosierung der Leber [192, 122, 56, 115, 212, 167].

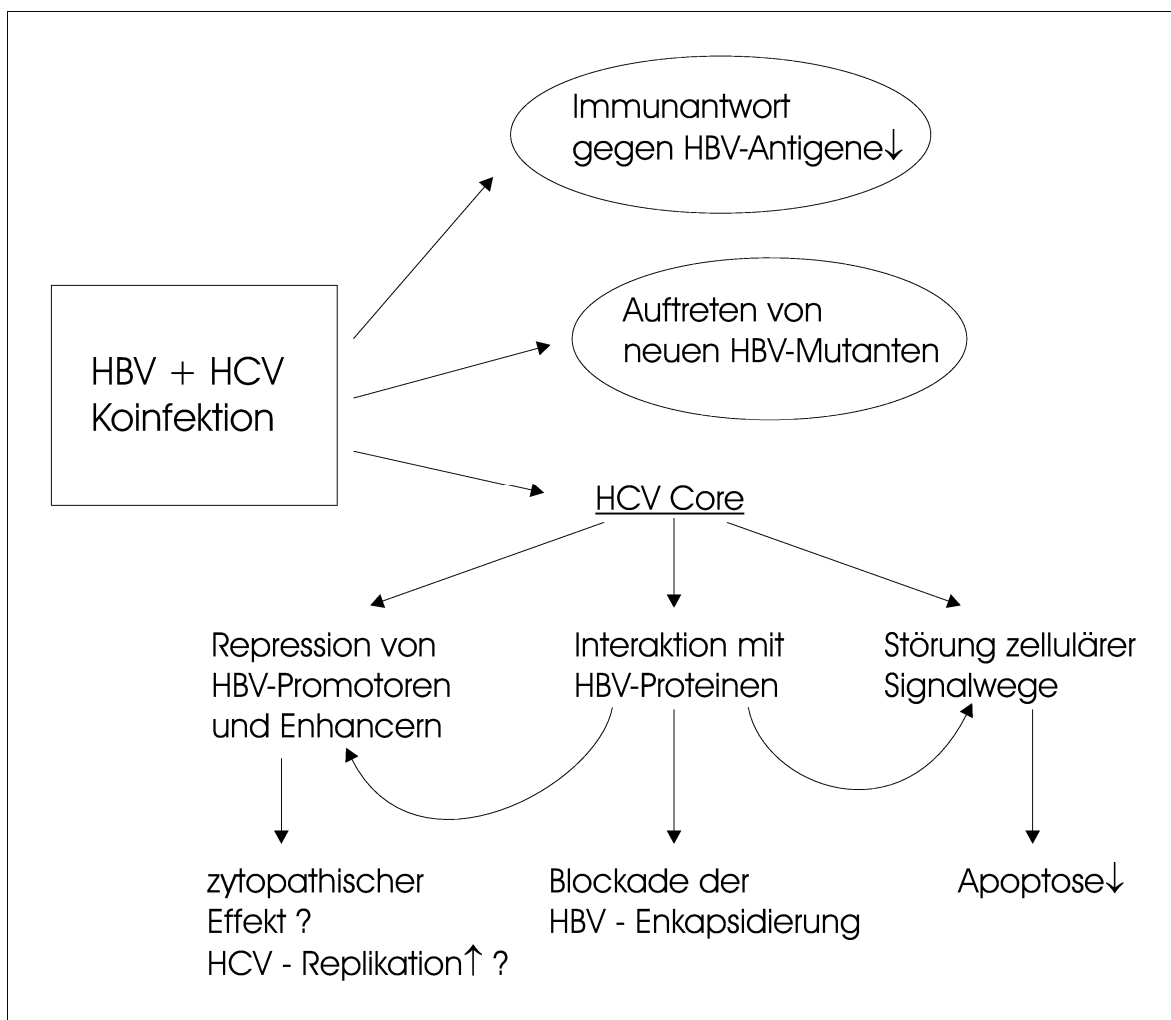
Zudem wird ein geringerer Effekt der IFN-Therapie sowie ein erhöhtes Risiko der Leberzirrhose- und HCC-Entwicklung beobachtet [164, 229, 212, 167]. In der Prognose ist die HBV-HCV-Koinfektion mit einem kumulativen 10-Jahres-Risiko für eine HCC-Entwicklung von 45% gegenüber der chronischen HBV- (16%) oder HCV-(28%) Monoinfektion behaftet [30]. Weiterhin werden etwa 5-10 mal häufiger fulminante Hepatitiden als bei der jeweiligen Monoinfektion beobachtet [35].

In einigen Studien zur Prognose der Patienten nach Lebertransplantation profitieren die Patienten sogar von der Koinfektion mit dem HCV im Gegensatz zu HBV-Monoinfizierten [79, 200]. Die Mechanismen, die zu den unterschiedlichen klinischen Verläufen führen, sind jedoch bislang unbekannt [91, 96, 190].

### 1.3.2.3 Therapie der HBV-HCV-Koinfektion

Bisherige Studien zur Therapie der HBV-HCV - Koinfektion haben gezeigt, dass eine 6-monatige Hochdosis-IFN $\alpha$  - Therapie zur Remission und histologischen sowie klinischen Besserung führen kann [207]. Außerdem erreicht die Ribavirin- und IFN-Kombinationstherapie ähnliche Ergebnisse bei der HBV-HCV-Koinfektion wie bei der HCV - Monoinfektion. Durch die Suppression des HCV kann es jedoch hierbei zu einem Wiederaufleben der HBV-Infektion kommen [124].

### 1.3.3 Pathogenese der HBV-HCV-Koinfektion



**Abbildung 1.9:** Synopsis möglicher bedeutsamer pathogenetischer Faktoren der HBV-HCV Koinfektion.



### **1.3.3.1 Molekularpathologische Ergebnisse**

Die HBV Core Expression ist in Leberbiopsien bei HBV-HCV-Koinfizierten gegenüber Monoinfizierten erniedrigt [65]. Ob HBV und HCV in der selben Leberzelle gleichzeitig präsent sind, wird kontrovers diskutiert. Bisher wurden strikte Respektion der Läppchengrenzen und getrennte Infektion der Zelle [216], aber auch diffuse Verteilung und Koinfektion der Zellen beobachtet [205].

### **1.3.3.2 Veränderung der Immunantwort unter der Koinfektion**

Bei der HBV-HCV-Koinfektion kommt es zur Abschwächung der zellulären Immunantwort gegen HBV Antigene, nicht jedoch gegen HCV Antigene [204]. Das gleiche Phänomen kann auch bei der humoralen Immunantwort beobachtet werden [182].

### **1.3.3.3 Veränderung der HBV-Biologie unter der HBV-HCV-Koinfektion**

Durch gezielte Sequenzanalysen der HBV Core Promotor-, Gen- und Enhancer - Regionen konnte eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Auftretens von HBV Mutationen bei Koinfektion mit HCV festgestellt werden. Dabei handelt es sich vor allem um eine HBV-Mutante mit einer 8-Nukleotid-Deletion im terminalen X-Gen (1770-1777), welche zu einem von 154 AS auf 134 AS trunkierten Protein führt [205]. Desweiteren ist eine neue HBV Core Promotor Mutante (T1802C/T1803G) in 80% der Koinfizierten (verglichen mit 10% bei HBV-Monoinfizierten) nachgewiesen [92].

### **1.3.3.4 Veränderung der HCV Biologie unter der HBV-HCV-Koinfektion**

Serologische Daten legen nahe, dass HCV vom Verstummen der HBV-Infektion „profitiert“: es kommt zum Anstieg der HCV RNA im Serum [205, 56, 166]. Die Mechanismen, die zu diesem Phänomen führen, sind noch unklar.

### **1.3.3.5 Direkte Effekte von HCV Proteinen auf HBV Enhancer- und Promotor-Elemente**

Nur wenige direkte Interaktionen von HCV Proteinen mit HBV cis-Elementen (Promotoren, Enhancer) sind bisher beschrieben. In in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass das HCV NS2 Protein HBV Promotoren und Enhancer reprimieren kann [46]. Von dem HCV Core Protein ist beschrieben, dass es in Zellkulturexperi-

menten die HBV Enhancer 1 und 2 reprimiert und dadurch die Transkription und Translation der HBs-, HBe- und HBc- Antigene um etwa 50% reduziert [186, 188, 29].

### **1.3.3.6 Beeinflussung des HBV Replikationszyklus durch das HCV Core Protein**

Bisher konnte nur für das HCV Core Protein ein Einfluß auf den HBV Replikationszyklus gezeigt werden. Als Ergebnis dieser Untersuchungen war eine etwa 14fache Reduktion der HBV pgRNA Verpackung beobachtet worden [188]. Der Mechanismus, der hinter dieser Interaktion steckt, ist eine Komplexbildung des HCV Core Proteins mit HBV X- und HBV Polymerase-Proteinen und mit dem  $\epsilon$ -Verpackungssignal der HBV pgRNA. Damit werden wichtige Bindungsstellen der HBV pgRNA blockiert und der Reifungsprozeß des HBV erheblich gestört [29].

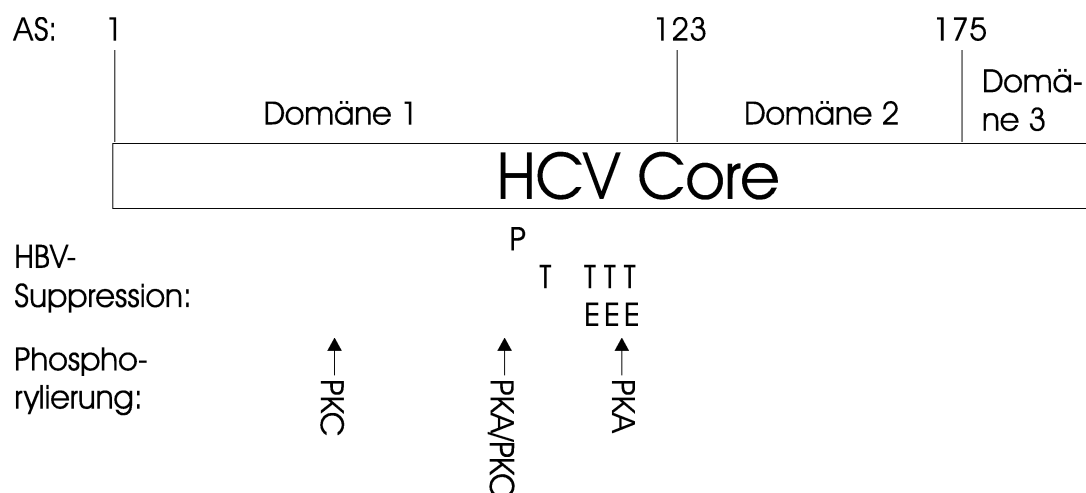
### **1.3.3.7 Interaktion des HCV Core Proteins mit dem HBV X-Protein (HBx)**

Sowohl HBx als auch HCV Core können Einfluß auf zelluläre Signalwege nehmen. Es konnte festgestellt werden, dass HBx und HCV Core synergistisch die zelluläre p21-Transkription, möglicherweise durch Bindung an das TGF- $\beta$  Responsive Element und an die Sp1- Bindungsstelle des p21-Promotors, reprimieren können. Daraus resultiert eine Verhinderung des zellulären Apoptoseprogramms, wobei als Folge die Zellproliferation stimuliert wird. Durch diesen Mechanismus sind eine Reihe zellbiologischer Grundlagen gegeben, die zur HCC-Entwicklung führen können [69].

Eine weitere Interaktion zwischen dem HBx und dem HCV Core Protein kann durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den TNF-R1 Signalweg erfolgen und einen zytoprotektiven, anti-apoptotischen Effekt ausüben [102]. Dies kann zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einer T-Zell-Antwort des Immunsystems und damit zu einem chronischen Verlauf der HBV-HCV-Koinfektion führen.

Es ist in Zellkulturexperimenten gezeigt worden, dass das HCV Core Protein seinen repressiven Effekt auf die HBV Replikation nur in Anwesenheit des HBx Proteins ausüben kann. Ob dies nun von einer Komplexbildung HCV Core – HBx oder eher einer synergistischen Wirkung auf die bereits angesprochenen Signalkaskaden abhängt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden [29].

### 1.3.3.8 Funktionelle Bereiche des HCV Core Proteins mit repressiver Wirkung auf die HBV Replikation



**Abbildung 1.10:** Schema des HCV Core Proteins mit seinen Domänen und den durch Mutagenese ermittelten, für die HBV Suppression wichtigen Aminosäurepositionen (AS): P=PKC-abhängige Transkriptions- und Enkapsidierungsrepression (AS 101), T=Transkriptionsrepression (AS 104,113,114,115), E=Enkapsidierungsrepression (AS 113,114,115). Die ermittelten Phosphorylierungspositionen durch die Proteinkinasen A und C (PKA/PKC) an den Positionen Serin 53 (Ser-53), Ser-99 und Ser-116 sind eingezeichnet. Aus [189, 29]

Durch Mutagenese konnten in Zellkulturexperimenten funktionelle Bereiche innerhalb des HCV Core Proteins identifiziert werden (siehe Abb. 1.10). Die repressive Aktivität des HCV Core Proteins auf die HBV-Replikation liegt im C-Terminus der Domäne 1 [188]. Unter den Aminosäurepositionen (AS) 101 bis 122 gibt es Bereiche, die selektiv nur die HBV Proteinexpression (AS 104) oder aber die HBV Proteinexpression und Enkapsidierung (AS 101,113,114,115) blockieren [29].

Die HBV-Replikationsrepression durch das native HCV Core Protein ist dabei abhängig von Proteinkinase A und C (PKA/PKC) katalysierten Phosphorylierungen an den Serinresten Ser-99 und Ser-116. Diese Phosphorylierungen erfolgen aber nicht am kompletten HCV Core Protein, sondern nur am C-terminal trunkierten (AS 122). Eventuell führt eine vorangehende PKA- Aktivierung des HCV Core zu einer Auffaltung des Proteins und damit zu einer Exposition für die PKC [189].

Alle genannten Effekte des HCV Core Proteins ließen sich bei der Kotransfektion mit einem Voll-Länge HCV Genom reproduzieren [29].

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Koinfektion mit dem Hepatitis B und C Virus führt zu einer Aggravation der Komplikationen chronischer Hepatitiden wie Leberzirrhose, Hepatozelluläres Karzinom und fulminanter Hepatitis. Als Folge der Koinfektion kann es häufig zum „Verstummen“ der HBV-Infektion kommen. Ziel dieser Arbeit waren funktionelle Untersuchungen der Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Replikation, um die Interferenzmechanismen bei der Koinfektion von HBV mit HCV aufzudecken, die zu einem komplikationsreichen Verlauf der Hepatitis führen können.

Für die HBV Replikation sind folgende Abschnitte von besonderer Bedeutung: Homöostase der nukleären HBV cccDNA, Transkription der HBV pgRNA, Expression des HBV Core Gens, Enkapsidierung und Ausschleusung des HBV Virions. Um diese Schritte des HBV Replikationszyklus unter dem Einfluß des HCV Core Proteins zu untersuchen, wurden folgende Teilprojekte durchgeführt:

### 1. Vorarbeiten

- (a) Etablierung von quantitativen PCR - und RT-PCR - Systemen zur Analyse der HBV RNA, enkapsidierten HBV DNA, HBV cccDNA und HCV Core RNA
- (b) Klonierung von HBV Vektoren und HCV Core Konstrukten
- (c) Darstellung der HCV Core Expression auf RNA- und Protein-Ebene sowie Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop
- (d) Erarbeitung eines Kotransfektionsprotokolls und Standardisierungssystems für Reporterassays und quantitative PCR-Analysen

### 2. Einfluß des HCV Core Proteins auf die HBV Transkription

- (a) Analyse der Änderung der Transkriptionskontrolle des HBV Core Promotors und Enhancers 1 und 2 unter HCV Core - Einfluß
- (b) Validierung der Reporterassays im replikativen HBV-System
- (c) Analyse der direkten/indirekten Interaktion des HCV Core Proteins mit den HBV Enhancer - und Core Promotor - Regionen

### 3. Einfluß des HCV Core Proteins auf die HBV Reifung

- (a) quantitative Analyse der Veränderung des Verhältnisses enkapsidierter intrazellulärer HBV Vorläufer-DNA versus HBV DNA extrazellulärer Viren unter Einfluß des HCV Core Proteins
- (b) Messung der Veränderung des intranukleären HBV cccDNA-„Pools“ unter Einfluß des HCV Core Proteins
- (c) Bestimmung der Veränderung von intrazellulären und sezernierten HBe- und HBs- Antigenen unter Einfluß des HCV Core Proteins
- (d) Berechnung des Ortes der stärksten Akkumulation von HBV bei Koexpression von HCV Core

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Medien, Lösungen und Enzyme

Alle Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O, Fa. Millipore) angesetzt. Hier nicht aufgeführte Puffer oder Lösungen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methode gesondert angeführt. Soweit erforderlich, wurden die verwendeten Lösungen und Puffer autoklaviert (45 min; 1 bar, 120 °C) oder sterilfiltriert (0,22 µm Filtermembran).

#### 2.1.1 Stammlösungen und Standardpuffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

**1M Ethylen-Diamin-Tetraazetat, EDTA:** wässrige Lösung; nach Erwärmen mit NaOH-Plättchen auf pH 8,0 eingestellt

**20x 3-(N-morpholino)propansulfonsäure, MOPS:** 400mM MOPS, 100mM Natriumazetat, 20mM EDTA; mit 1N NaOH auf pH 7,0 eingestellt

**3M Natriumazetat:** mit 1M Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt

**Phosphat Buffered Saline, PBS-Puffer:** 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O); 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

**Standard Natrium Citrat, 20xSSC-Puffer:** 3M NaCl, 0,3M Na<sub>2</sub>-Zitrat(2H<sub>2</sub>O)

**Natrium Dodecyl Sulfat, SDS:** Dodecylsulfat-Natriumsalz als 10% und 20% wässrige Lösung

**Tris-Puffer:** Tris(hydroxymethylaminomethan) wurde als 1 M wässriger Puffer angesetzt. Dabei wurde der Puffer mit pH-Werten von 6,8; 8,0; 8,5 oder 8,8 mit konzentrierter HCl eingestellt.

**Tris-Borsäure-EDTA, TBE-Puffer:** 100mM Tris; 10mM Borsäure; 0,025mM EDTA; mit konzentrierter HCl auf pH 8,0 eingestellt

**Tris-EDTA, TE-Puffer:** 10mM Tris; 1mM EDTA; mit konzentrierter HCl auf pH 8,0 eingestellt

### 2.1.2 Enzyme

Alle verwendeten Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzyme wurden von den Firmen New England BioLabs, MBI Fermentas und Roche bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Restriktionsenzyme eingesetzt: BamHI, BglII, Eco47III, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, KpnI, NotI, PvuI, SacI, SacII, SmaI, XbaI. Als DNA-modifizierende Enzyme wurden T4-DNA-Ligase, DNase I, RNase A und SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) verwendet.

### 2.1.3 Bakterienmedium, Antibiotika und Bakterien

**Luria Broth (LB-) Vollmedium:** 10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl aufgefüllt auf 1000 ml dH<sub>2</sub>O; pH wurde nicht eingestellt

**Ampicillin Stocklösung:** 100mg/ml (dH<sub>2</sub>O), Arbeitskonzentration: 100-200 µg/ml

**Kanamycin Stocklösung:** 50mg/ml (dH<sub>2</sub>O), Arbeitskonzentration: 50 µg/ml

**Agar-Platten:** 1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium

**Bakterien:** Escherischia coli (E. coli), Stamm DH5α

**Elektrotransformationsmedium SOC:** 2% w/v Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl. Dem Medium wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> sowie 20 mM Glucose zugesetzt.

## 2.2 Geräte und Zubehör

Digitales pH-Meter	Fa. WTW pH 525
Elektrophoresekammern	Fa. Bio - Rad
Elektrotransformationsgerät	Gene-Pulser der Fa. Bio-Rad
Farbdiafilm	Fuji Provia 400F
Filmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA Curix 60
Geltrockner	Slab Gel Dryer mit Vakuumpumpe SGD4050, Fa. Savant
Inkubatorschrank	Fa. Heraeus
Laborschüttler/Heizblock	Fa. Eppendorf Thermomixer 5436
Laborwaage	Fa. Sartorius
Mikroskope	Fa. Olympus (Standard-Labormikroskop) Fa. Zeiss Axiophot (Fluoreszenzmikroskop) Fa. Zeiss LSM 410 invert, Laserbestückung: - intern HeNe (633 nm), HeNe (543 nm) - extern Argonionen (488 nm, 514 nm)
Photometer	Fa. Bio - Rad SmartSpec 3000
Schüttelinkubator	Fa. New Brunswick Scientific Innova 4000
Sequenziermaschine	Fa. Applied Biosystems Abi Prism 310
Spannungsgeber	Fa. Bio - Rad Power Pac 200
Spiegelreflexkamera	Fa. Olympus
Thermocycler	Fa. Applied Biosystems GeneAmp 9700, GeneAmp 5700 Sequence Detector Fa. MJ Research PTC-200 Gradient Cycler
Zellkultur-Werkbank	Fa. Heraeus
Zentrifugen	Fa. Sorvall RT6000D, MC12V, RC-5B Fa. Eppendorf Centrifuge 5417C, Hermle ZK 380



## 2.3 Vektoren und Plasmide

### 2.3.1 Klonierungsvektoren

#### 2.3.1.1 pBluescript KSII+ Vektor

pBluescript ist ein kommerziell erhältlicher Klonierungsvektor (Fa. Stratagene). Er enthält eine Ampicillin-Resistenz und bakterielle (*lac* Promotor), jedoch keine eukaryontischen Steuerelemente. Dieses Plasmid wurde auch als promotorlose Negativkontrolle und zur DNA-Mengenkompensation in den Kotransfektionsexperimenten eingesetzt.

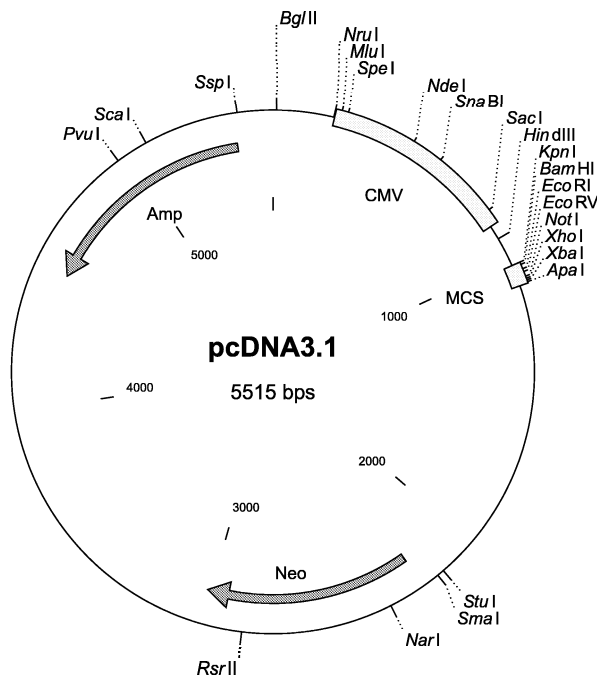
#### 2.3.1.2 pGEM-T easy Vektor

Die Klonierungsvektoren der pGEM-T Familie (Fa. Promega) ermöglichen die direkte Einklonierung von PCR-Produkten. pGEM-T easy wird linearisiert geliefert und verfügt über eine Ampicillin-Resistenz und über Thymidinüberhänge. Diese verhindern die Religation und ermöglichen eine sehr effiziente Insertion der Fragmente, die mit der Taq-DNA-Polymerase (Taq = *Thermus aquaticus*) produziert wurden, da diese Amplifikate 3'-Adeninüberhänge enthalten.

### 2.3.2 Expressionsvektoren

#### 2.3.2.1 pcDNA3/pcDNA4 Vektoren (siehe Abb. 2.1)

Die eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3/4 (Fa. Invitrogen) enthalten die Promotorregion des humanen Cytomegalievirus (CMV) vor einer Mehrfachklonierungsstelle („multiple cloning site“, MCS). Der CMV-Promotor verfügt über eine hohe Promotoraktivität und erlaubt damit eine hohe Expression von Proteinen. Weiterhin ist in dem Vektor eine Ampicillin- sowie Neomycinresistenz integriert. Letztere dient als Selektionsmarker in eukaryontischen Zellen. Das vor die MCS gesetzte Poly-Histidin (N-terminales His-Tag) Peptid erlaubt die Generierung von PolyHis-Fusionsproteinen, die sich dann über Nickelsäulen aufreinigen lassen.



**Abbildung 2.1:** Karte des Expressionsvektors pcDNA3.1. Amp = Ampicillin-Resistenz, CMV = CMV-Promotor, MCS = Mehrfachklonierungsstelle, Neo = Neomycin-Resistenz.

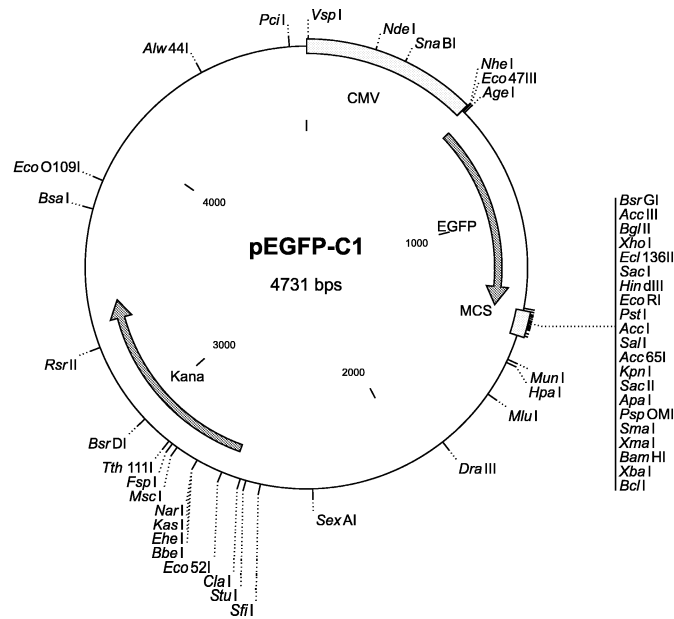
### 2.3.2.2 pEGFP-C Vektor (siehe Abb. 2.2)

Das grün fluoreszierende Protein- (GFP-) Gen des Expressionsvektors pEGFP-C (Enhanced GFP, Fa. CLONTECH) kodiert für ein modifiziertes grün fluoreszierendes Protein (Anregungsmaximum bei 484 nm, Emissionsmaximum bei 510 nm). Das EGFP-Gen steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Dem EGFP-Gen folgt die MCS, so daß über die Einklonierung des gewünschten Gens (ohne Startcodon) ein NH<sub>2</sub>-EGFP-Insert-COOH - Fusionsprotein erzeugt werden kann. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgt über Blaulicht-Anregung im Fluoreszenzmikroskop.

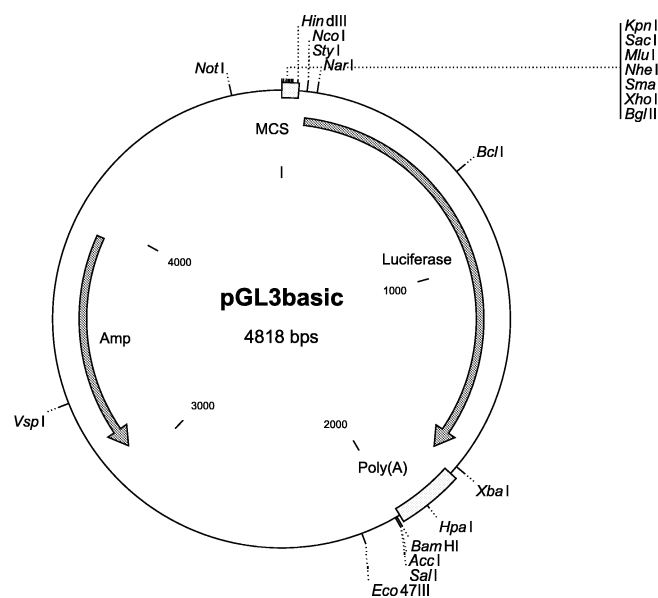
## 2.3.3 Reportergenvektoren

### 2.3.3.1 Luciferase-Detektionssysteme (siehe Abb. 2.3)

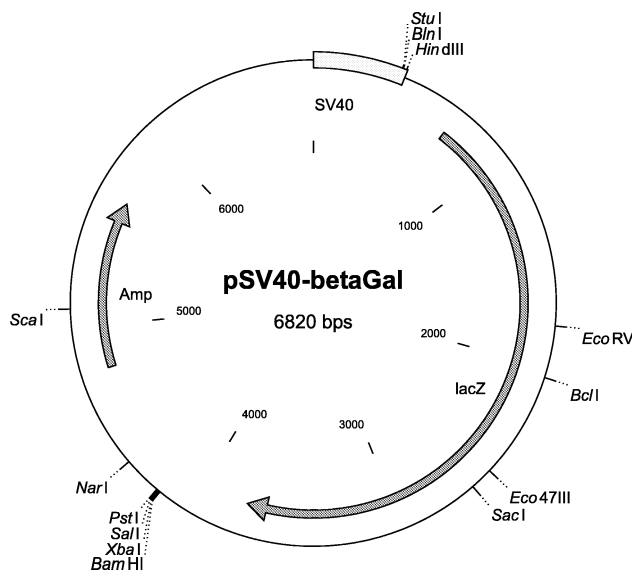
Für die Untersuchung der Aktivität eukaryontischer Steuerelemente (Promotoren und Enhancer) wurden die Reportervektoren pGL3-Basic und pGL2-Promotor der Fa. Promega eingesetzt. Vor dem Luciferase-Gen, isoliert aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*, besteht die Möglichkeit, das gewünschte Steuerelement einzuklonieren. Die Expressionshöhe der Luciferase, gemessen im Luciferase-Assay (siehe 2.9, S. 58), spiegelt damit die Aktivität des Steuerelements wider.



**Abbildung 2.2:** Karte des Expressionsvektors pEGFP-C1. Kana = Kanamycin-Resistenz, CMV = CMV-Promotor, MCS = Mehrfachklonierungsstelle, EGFP = erweitertes grün fluoreszierendes Protein.



**Abbildung 2.3:** Karte des Reportervektors pGL3-basic. Amp = Ampicillin-Resistenz, CMV = CMV-Promotor, MCS = Mehrfachklonierungsstelle.



**Abbildung 2.4:** Karte des Reportervektors pSV40-betaGal (SV40- $\beta$ Gal). Amp = Ampicillin-Resistenz, SV40 = SV40-Promotor, MCS = Mehrfachklonierungsstelle, lacZ = Gen der  $\beta$ -Galactosidase.

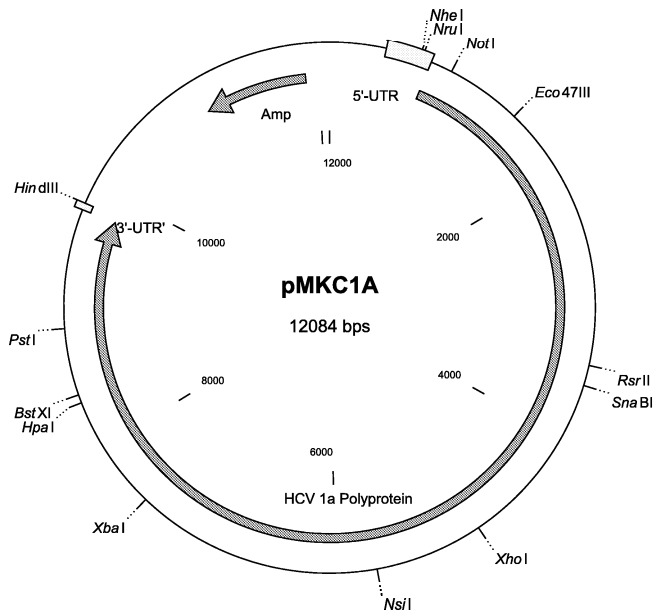
### 2.3.3.2 $\beta$ -Galactosidase-Detektionssysteme (siehe Abb. 2.4)

Die  $\beta$ -Galactosidase, das Produkt des lacZ-Gens, erzeugt durch die von ihr katalysierte Spaltreaktion einen photometrisch quantifizierbaren Farbumschlag. Dabei entsteht aus 5-Bromo-4-chloro-3-indoyle  $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) eine blaue Farbe oder aus o-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG) eine gelbe Farbe.  $\beta$ -Galactosidase-Experimente wurden bei Luciferaseexperimenten zur Quantifizierung der Zellzahl (Standardisierung) durchgeführt (siehe 2.9, S. 58). Es standen Vektoren mit einem RSV- (Rous Sarcoma Virus), einem SV40- (Simian Virus 40) und einem CMV-Promotor zur Verfügung. Zur Standardisierung der Luciferaseexperimente wurde RSV- $\beta$ Gal eingesetzt.

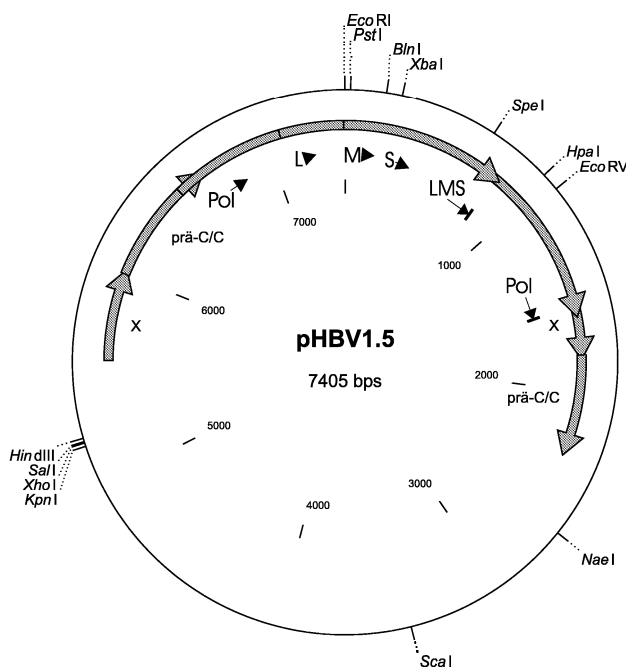
## 2.3.4 Virale Ausgangsplasmide

### 2.3.4.1 HCV 1a - Plasmid (siehe Abb. 2.5)

Das Plasmid pMKC1A (freundlicherweise von Dr. M. Krüger, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt) besteht aus dem Vektor pUC19, in den über SmaI 5'-terminal und HindIII 3'-terminal ein Volllänge HCV 1a Genom inkloniert ist. Dieses Plasmid wurde als Vorlage für alle HCV PCR-Klonierungen verwendet. Die Nukleotidpositionen der Primer (siehe 2.4, S. 46) beziehen sich auf den Start der HCV IRES als Position 1.



**Abbildung 2.5:** Karte des Plasmids pMKC1A mit den HCV-Regionen für 5' und 3' nicht-translatierten Bereich (UTR) und HCV Polyprotein Leserahmen. Amp = Ampicillin-Resistenz.



**Abbildung 2.6:** Karte des HBV Replikons pHBV1.5. Für die Regionen der überlappenden Gene Pol, L, M und S sind Start- und Endpositionen der Übersicht halber separat bezeichnet. Legende siehe Abb. 1.2, S. 14.

### 2.3.4.2 HBV Replikon (siehe Abb. 2.6)

Das Plasmid pHBV1.5 ist ein eineinhalbfaches, replikationskompetentes HBV adw2 (Genotyp D) Gesamtgenom, das über EcoRV 5'-terminal und SacI-blunt 3'-terminal in pBluescript eingefügt wurde [22]. Es diente als Vorlage für alle HBV PCR-Klonierungen. Die Nukleotidpositionen der Primer beziehen sich auf das präC/C-ATG = 1 (EcoRI-Schnittstelle = 1817).

## 2.4 Oligonukleotide

Für PCR-Klonierungen, Sequenzierungen und quantitative PCRs (Taqman) wurden von den Firmen Carl Roth Karlsruhe, MWG Biotech AG und Applied Biosystems synthetisierte Oligonukleotide verwendet. Die Tabellen mit den jeweils verwendeten Oligonukleotiden befinden sich in den zugehörigen Kapiteln.

### 2.4.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Tabelle 2.1 zeigt die für Sequenzierungen verwendeten Primer. Die Sequenzierungen wurden in der Abteilung Molekulare Pathologie des Instituts für Pathologie, Tübingen, unter Mithilfe des Sequenzierdienstes des diagnostischen Labors durchgeführt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>
FP1seq pcDNA3/4 871	CTCACTATAGGGAGACCCAAGCT
RP1seq pcDNA3/4 1936	ACAGTGGGAGTGGCACCTT
FP2seq HCVcore 1186	GTGTGGTGGGAATTCAGCACAA
RP2seq HCVcore 1300	TAAACTCCACCAACGATCTGA
FP1seq pEGFP 1249	AACGAGAAGCGCGATCA
RP1seq pEGFP 2049	AAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATG
FPseq pGL3 5445	TGCCAGAACATTTCTCTATCG
RPseq pGL3 841	AGGGCGTATCTCTTCATAGCC

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotide zur Verwendung in Sequenzierungen

## 2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.5.1 Material und Reaktionsansatz

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) basiert auf der enzymatischen und selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten [177]. In den Experimenten dieser Arbeit wurde das AmpliTaq-System der Firma Applied Biosystems verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 200 bis maximal 1000 ng der zu amplifizierenden DNA („Template“)
- Vorwärts- („Forward-“,FP) und Rückwärts- („Reverse-“,RP) Primer von ca. 20 bp Länge. Diese hybridisieren sequenzspezifisch jeweils am 3'-Ende ihres homologen DNA-Abschnitts im Template. Die Konzentration der Primer betrug jeweils 15 pM.
- 1,6 U AmpliTaq-DNA-Polymerase (Taq = *Thermus aquaticus*)
- 5  $\mu$ l 10xPuffer (enthält 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% w/v Gelatine)
- 10 nM eines Desoxy-Nukleotid-tri-phosphat - Mixes (dATP,dTTP,dCTP,dGTP)
- Das Volumen des Ansatzes wurde mit dH<sub>2</sub>O ad 50  $\mu$ l aufgefüllt.

### 2.5.2 Durchführung

Die Polymerasekettenreaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung für 5 Minuten bei 94°C
- 35fache Wiederholung des Zyklus:
  - Schmelzen (Denaturierung) von DNA-Doppelsträngen bei 94°C (30 Sekunden).
  - Binden der Primer (Hybridisierung, „Annealing“) an ihre Zielsequenz bei 56°C (45 Sekunden). Die Temperatur dieses Schrittes hängt einerseits von der Basenkomposition der Primer und andererseits von der gewünschten Hybridisierungsgenauigkeit (je höher die Temperatur, desto genauer) der Primer ab.

- Extension (Elongation) der Amplikons durch die AmpliTaq DNA-Polymerase bei 72°C (1 Minute). Für größere Fragmente (>1000 bp) wurde die Extensionszeit bis auf 2 Minuten verlängert, damit der Taq-Polymerase genug Zeit gegeben war, die Polymerisation der DNA-Stränge zu vervollständigen.
- Terminale Extension bei 72°C für 10 Minuten.

Die gewonnenen Amplifikate wurden danach in der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.7.3, S. 52) analysiert und weiterverarbeitet.

### 2.5.3 RNA-Nachweis durch reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Das PCR-Verfahren kann auch für den Nachweis von RNA verwendet werden. Hierzu führt man vor den Amplifikationsreaktionen eine cDNA- (c=„complementary“) Synthese aus dem RNA-Template durch. Diese Reaktion wird von lentiviralen Reversen Transkriptasen katalysiert. In den meisten Verfahren kommt hierfür die Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) Reverse Transkriptase (RT) zum Einsatz. In der RT-Reaktion (30 Minuten bei 48-50°C) wird das RNA-Template 1:1 in eine cDNA übersetzt. Danach kann durch Überführen des RT-Transkripts in eine PCR-Reaktion („two-Step“) oder durch direktes Starten der DNA-Polymerase („one-Step“, Aktivieren der Taq-Polymerase durch Abspalten eines hitzelabilen Antikörpers an der Polymerase) die cDNA amplifiziert werden.

## 2.6 Zellkultur

Für funktionelle Experimente wurden die humanen Hepatomzelllinien HuH7, HepG2 und die daraus abgeleitete Zelllinie HepG2.2.15, die konstitutiv das HBV exprimiert und infektiöse Virionen sezerniert, verwendet [151, 104, 4].

### 2.6.1 Material

- DMEM Nährmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium; Dulbecco & Freeman)



- fetales Kälberserum (FKS; Fa. Sigma) in einer Konzentration von 10% im Medium
- Penicillin-Streptomycin (Fa. Sigma) in einer Konzentration von 1% im Kulturmedium
- Trypsin-EDTA Lösung (0,5% Trypsin, 5,3 mM Na<sub>4</sub>-EDTA; Fa. Sigma, in PBS-Puffer, 10x konzentriert)

## 2.6.2 Zellkultur

HuH7, HepG2 und HepG2.2.15 Zellen wachsen in DMEM-Medium adhärent als einschichtiger Zellrasen. Für Zellkulturexperimente und zur Stammhaltung wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Kunststoffflaschen (Fa. Nunc) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank inkubiert und alle 5 bis 10 Tage passagiert.

Für die Passage wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen und mithilfe von 1-2 ml der Trypsin-EDTA Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 8x10<sup>5</sup> Zellen pro Flasche in frischem Medium (12ml) ausgesät.

Für experimentelle Untersuchungen wurden Zellkulturschälchen von 6 cm (3ml Medium) oder 10 cm (5ml Medium) Durchmesser (Fa. Nunc) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 24 h wurden die Zellen bei einer Zelldichte von etwa 75% (2x10<sup>6</sup> Zellen/6 cm Schale) transfiziert.

## 2.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die zu einem 75% konfluenten Zellrasen ausgewachsen waren, wurden trypsiniert (siehe 2.6.2), in DMEM-Medium resuspendiert (ca. 8x10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium) und zusammen mit 150µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Fluka) und 150µl FKS aufgenommen und in Schraubdeckelröhrchen (Fa. Nunc) transferiert. Die Zellen wurden dann schrittweise herabgekühlt: 15 Minuten bei 4°C, 2 Stunden bei -20°C, 24 Stunden bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen für 1-2 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und sofort in eine Zellkulturflasche mit 12 ml vorgelegtem DMEM-Kulturmedium überführt. Nach 6-12 Stunden wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und erneuert, um Reste der Gefrierzusätze und abgestorbene Zellen zu entfernen.

PCR-Insert	verwendete Primer	Zielvektor(en)	Angaben zum Restriktionsverdau
HCV Core 1a Gen	HCV C1, HCV C2	pcDNA3.1, pSV40- $\beta$ Gal	Simultanverdau in Puffer R+
HCV Core 1a Gen	FP HCVcore 345, RP HCVcore 957	pEGFP-C3	Simultanverdau in Puffer Y+ (2x)
HBV basaler Kapsidgenpromotor (bcp)	HBVbcp s, HBVbcp AS	pGL3-Basic	KpnI-Verdau (Puffer KpnI), Ethanol-fällung der DNA, BglII-Verdau (Puffer O+)
HBV Volllänge Kapsidgenpromotor (fcp)	HBVfcp s, HBVbcp AS	pGL3-Basic	KpnI-Verdau (Puffer KpnI), Ethanol-fällung der DNA, BglII-Verdau (Puffer O+)
HBV Enhancer I und partieller X-Promotor (enh1XP)	FP HBVenh1XP 2364, RP HBVenh1XP 2774	pGL2-Promotor	KpnI-Verdau (Puffer KpnI), Ethanol-fällung der DNA, SmaI-Verdau (Puffer Y+)
HBV Enhancer I und partieller X-Promotor (enh1XP)	FP2 HBVenh1XP 2364, RP HBVenh1XP 2774	pGL3b-HBVbcp, pGL3b-HBVfcp	KpnI-Verdau

**Tabelle 2.2:** Übersicht über die generierten PCR-Inserts und Zielvektoren mit Angabe der verwendeten Klonierungsbedingungen. Die Puffer sind Originallösungen der Firma MBI Fermentas. Zu den Primern siehe Tabelle 2.3.

## 2.7 Klonierung von Genregionen

Beim Klonieren wurden gewünschte Genregionen (Gene, Promotoren, Enhancer) per PCR amplifiziert (siehe 2.5, S. 47, verwendete Primer siehe Tabelle 2.3), mittels Restriktionsverdau geschnitten und durch Ligation in einen entsprechenden Zielvektor (siehe 2.3, S. 41) eingebracht.

Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über die erzeugten PCR-Produkte (Inserts), ihre Zielvektoren und die notwendigen Klonierungsschritte.

Primername	Sequenz	Enzym
HCV C1	GCCGAAGCTTCCTGAT- AGGGTGCTTGCG	Hind III
HCV C2	GCAAGCGTGGGAGTGA- GCGGATCCGCC	BamHI
FP HCVcore 345	CGGAATTCGAGCACAAAT- CCAAAACCC	EcoRI
RP HCVcore 957	CGGGATCCCGTTCGTGA- CATGGTACAC	BamHI
HBVbcp s	CGGGGTACCCTACTTCAA- GACTGTGT	KpnI
HBVbcp AS	GGAAGATCTAAGAGATGAT- TAGGCAGA	BglII
HBVfcp s	CGGGGTACCCTTCACC- TCTGCACGTTGCA	KpnI
FP HBVenh1XP 2364	TCCCCGGGGGACTTC- CTGTTAACAGGCCTATT	SmaI
FP2 HBVenh1XP 2364	GGGGTACCCCTTCCT- GTTAACAGGCCTATT	KpnI
RP HBVenh1XP 2774	GGGGTACCCCTGTATA- TTCCGCGAGAGG	KpnI

**Tabelle 2.3:** Primer für PCR-Klonierungen und einsynthetisierte Enzymschnittstellen

## 2.7.1 Restriktionsverdau

Im DNA-Restriktionsverdau werden DNAs von Restriktionsenzymen spezifisch geschnitten. Über die Schnittstellen können dann Vektor und PCR-Insert zusammengefügt werden.

### 2.7.1.1 Verwendete Enzyme

Die routinemäßig eingesetzten Enzyme sind in Abschnitt 2.1.2 (S. 39) aufgelistet. Die für die einzelnen PCR-Klonierungen verwendeten Enzyme und Puffer sind der Tabelle 2.2 (S. 50) zu entnehmen.

### 2.7.1.2 Restriktionsverdau

- Inkubation von 5  $\mu$ g Insert-DNA mit 2 U Restriktionsenzym(en) und 5  $\mu$ l Puffer (siehe Tabelle 2.2) und dH<sub>2</sub>O ad 50  $\mu$ l bei 37°C für 1-2 Stunden
- Inkubation von 5  $\mu$ g Vektor-DNA mit dem gleichen Reaktionsansatz wie das Insert

## 2.7.2 Ethanolfällung der DNA

Wenn mehrere Enzyme zum Schneiden der DNA-Fragmente benötigt werden, kann es vorkommen, dass jedes Enzym einen unterschiedlichen Puffer benötigt. Dann muß der Schneidevorgang in 2 Restriktionsverdau - Reaktionen aufgeteilt werden und die DNA aus dem ersten Verdau herausgefällt werden:

- Reaktionsansatz mit 2,5x Volumen Ethanol absolut und 0,3M Na-acetat mischen
- Inkubation für 30 Min. bei -80°C
- Zentrifugation für 15 Min. bei 4000xg 4°C
- Das erhaltene Pellet wird mit dem Ansatz für den folgenden Restriktionsverdau (siehe 2.7.1.2) aufgenommen

## 2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden die DNA-Abschnitte nach ihrer Länge aufgetrennt. Sie können ab einer Konzentration von 200 ng DNA unter Anregung mit UV-Licht durch das Interkalans Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

### 2.7.3.1 Gießen des Agarosegels

- Auflösen von 1% w/v Agarose (Fa. Gibco BRL) in 50 ml 1xTBE-Puffer durch Sieden in der Mikrowelle bis die Flüssigkeit klar wird
- Hinzufügen von Ethidiumbromid (1 µg/ml)
- Gießen des Gels in die Gelkammer (Fa. BioRad), Einfügen des Taschenkamms (Taschenvolumen mind. 50µl)
- Nach Abkühlung des Gels wird der Kamm entfernt

### 2.7.3.2 Elektrophorese

- Vermischen des Restriktionsverdau mit 8µl 6xDNA-Ladepuffer (Fa. Peqlab)

- Auftragen der Proben (Insert und Vektor verdaut und unverdaut) und des Größenstandards (10 kb DNA-Leiter der Fa. Peqlab)
- Darstellung der DNA-Fragmente unter UV-Licht

### 2.7.4 Isolation der DNA aus dem Gel

Die elektrophoretisch aufgetrennte Insert- und Vektor-DNA wurde unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Jetsorb-Kit (Fa. Genomed) gereinigt. Die DNA lag danach in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst vor.

### 2.7.5 Ligation von Insert- und Vektor-DNA

In der Ligasereaktion wurden der geschnittene Vektor und das Insert miteinander verbunden und der Plasmidring wieder geschlossen.

- Vermischen von 13  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l Vektor und 3  $\mu$ l Insert,
- 2  $\mu$ l 10x Ligase-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM Dithiothreitol; 10 mM ATP; 250  $\mu$ g/ml Bovines Serum Albumin) und
- 1 U T4-DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs).
- Inkubation für mindestens 2 Stunden bei 14°C

### 2.7.6 Elektroporation von kompetenten Bakterien

#### 2.7.6.1 Gewinnung von Bakterien für die Elektroporation

Die Herstellung Elektroporations-kompetenter Bakterien (Stamm: siehe 2.1.3, S. 39) ist Voraussetzung für eine effiziente Klonierung. Folgende Schritte wurden dazu durchgeführt:

- Inkubation der Bakterien in 5 ml Antibiotika-freiem LB-Medium für 16 Stunden bei 37°C
- Vergrößern des Volumens auf 500 ml LB-Medium und weitere Inkubation bei 37°C bis Erreichen einer photometrisch kontrollierten Wachstumsdichte OD<sub>600</sub> = 0,5

- 30 Minuten Abkühlen der Bakteriensuspension auf Eis
- Zentrifugieren (4000xg, 10 Minuten, 4°C) und Resuspension der Bakterien in 500 ml dH<sub>2</sub>O
- Zentrifugieren (4000xg, 10 Minuten, 4°C) und Resuspension der Bakterien in 250 ml dH<sub>2</sub>O
- Zentrifugieren (4000xg, 10 Minuten, 4°C) und Resuspension der Bakterien in 10 ml 10% Glycerin-dH<sub>2</sub>O
- Verteilen der Bakteriensuspension auf 50µl große Aliquots und Lagerung bei -80°C

### 2.7.6.2 Elektroporation kompetenter Bakterien

Bei der Elektroporation wurde mittels eines elektrischen Impulses die Zellmembran elektrokompenter Bakterien (siehe 2.7.6.1, S. 53) destabilisiert. So konnte die zugefügte Plasmid-DNA von den Bakterien leichter aufgenommen werden. Folgende Schritte waren dazu notwendig:

- Kühlen der Elektroporations-Küvetten und der elektrokompenten Bakterien auf 0°C
- Vermischen von 50µl Bakteriensuspension mit 0,5-1µl des Ligationsansatzes aus 2.7.5
- Elektroporation; Elektroporationsparameter: 200Ω, 25µF und 1,8 kV (0,1 cm Küvette, Fa. Biorad)
- Sofortiges Überführen der Bakterien in 1ml 37°C warmes SOC-Medium (siehe 2.1.3, S. 39)
- Anschließend Inkubation der Bakterien bei 37°C im Schüttler für 1 Stunde
- Ausplattieren von 200µl Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit Antibiotikum (siehe 2.1.3, S. 39)
- Inkubation der Platten für mindestens 16 Stunden bei 37°C

„Minipräp“	„Maxipräp“
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verwendung des Bakterienansatzes aus 2.7.7</li> <li>- Zentrifugieren von 1,8 ml Bakterien suspension für 2 min bei 4000xg und 4°C</li> <li>- Resuspension des Pellets in 200µl Puffer P1</li> <li>- Bakterienlyse mit 200µl Puffer P2</li> <li>- Inkubation für 5 min bei 25°C</li> <li>- Neutralisation mit 200µl Puffer P3</li> <li>- Zentrifugieren für 10 min bei 4000xg und 4°C</li> <li>- Fällern der DNA mit 600µl Isopropanol</li> <li>- 5 min Inkubation bei 25°C</li> <li>- Zentrifugieren für 15 min bei 4000xg und 4°C</li> <li>- Waschen des Pellets mit 100µl 70% Ethanol</li> <li>- Trocknung des Pellets für 5 min</li> <li>- DNA in 50µl dH<sub>2</sub>O aufnehmen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volumenerhöhung des Bakterienansatzes aus 2.7.7 auf 250 ml LB-Medium</li> <li>- Inkubation für 16 Stunden bei 37°C im Bakterien schüttler</li> <li>- Zentrifugieren des kompletten Ansatzes bei 4000xg und 4°C</li> <li>- Resuspension der Bakterien in 10 ml Puffer P1</li> <li>- Bakterienlyse mit 10 ml Puffer P2</li> <li>- Inkubation für 5 min bei 25°C</li> <li>- Neutralisation mit 10 ml Puffer P3</li> <li>- Inkubation für 20 min bei 0°C</li> <li>- Zentrifugieren für 30 min bei 26000xg und 4°C</li> <li>- Filtration des Überstands durch einen Filter und durch die mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen Säule</li> <li>- zweimaliges Waschen mit dem Puffer QC</li> <li>- Elution mit 15 ml Puffer QF</li> <li>- Fällern der DNA mit 10,5 ml Isopropanol</li> <li>- 5 min Inkubation bei 25°C</li> <li>- Zentrifugieren für 30 min bei 3000xg und 4°C</li> <li>- Waschen des Pellets mit 5 ml 70% Ethanol</li> <li>- Zentrifugieren des Pellets aus dem Ethanol für 15 min und Trocknung</li> <li>- DNA in 150µl dH<sub>2</sub>O aufnehmen</li> </ul>

**Tabelle 2.4:** Die „Mini- und Maxi-Präp“ Verfahren zur Isolation von DNA aus transformierten Bakterien

### 2.7.7 Kultivieren von transformierten Klonen

Von der beimpften und bebrüteten Agarplatte wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze je ein Klon aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum (siehe 2.1.3, S. 39) für 6-24 Stunden bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

### 2.7.8 DNA-Präparation aus Bakterien („Minipräp“ und „Maxipräp“)

Die Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien erfolgte durch Mini- (bis 50µg DNA) oder Maxipräp (bis 1 mg DNA). Für beide Verfahren wurden Komponenten des Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen verwendet. Der Ablauf beider Methoden ist in Tabelle 2.4 (S. 55) dargestellt.

Nach der Präparation eines neuen Plasmids ist die DNA-Konzentration photometrisch bei optischen Dichten von 260nm (DNA-Konzentration) und 280nm (RNA-Verunreinigung) in einer 1:100 Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O bestimmt, ein Restriktionsverdau zur Kontrolle der korrekten Insertligation und eine Sequenzierreaktion zur Verifizierung der korrekten DNA-Sequenz durchgeführt worden.

## 2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen mit klonierten Konstrukten

Damit Fremd-DNA in eukaryontischen Zellen nachweisbar zur Expression gelangen kann, wird sie in speziellen Transfektionsprotokollen in die Zellen eingebracht. Die Transfektionen dieser Arbeit basieren auf der Calciumphosphat Präzipitationsmethode [27].

### 2.8.1 Material

- 0,25 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung
- 2xBBS (280mM NaCl; 50mM N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-taurin (BES); 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O)), pH 7,13 für HuH7 und HepG2; pH 6,85 für HepG2.2.15 Zellen



## 2.8.2 Durchführung der Transfektion

- Aussaat und Kultivierung der Zellen für mindestens 16 Stunden nach der Beschreibung in 2.6.2 (S.49)
- Anschließend Herstellung eines Transfektionsmixes für 6cm- (10cm-) Schalen, bestehend aus
  - 0,5-40  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA, gelöst in  $\text{dH}_2\text{O}$
  - 150 $\mu\text{l}$  (für 6cm-Schalen) oder 500 $\mu\text{l}$  (für 10cm-Schalen) 0,25M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung
  - 150 $\mu\text{l}$  (für 6cm-Schalen) oder 500 $\mu\text{l}$  (für 10cm-Schalen) 2xBBS.
- vorsichtiges Schütteln des Transfektionsmixes, kurze Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe zum Kulturmedium der Zellkulturschälchen
- Inkubation der Schälchen bei 35°C und 3%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank für 12-16 Stunden
- anschließender Mediumwechsel (= Transfektionsstart)
- weitere Inkubation bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank

## 2.8.3 HBV-HCV - Kotransfektionsexperimente

Für die Messung des Einflusses des HCV Core Proteins auf die HBV Transkription und Replikation wurde ein Kotransfektionsprotokoll (siehe Tabelle 2.5) entwickelt, das die Unterscheidung von unspezifischen und HCV-Core spezifischen Einflüssen erlaubt. Für diesen Zweck kamen spezielle, auf die HCV Core Konstrukte angepaßte Negativkontrollen (gleiche Leserahmenlänge, gleicher Promotor, siehe 3.2.2, S. 93) zum Einsatz.

- **Für Luciferaseexperimente:** Vermischen von 2,5 $\mu\text{g}$  DNA des zu untersuchenden HBV-Reporterkonstruktes (siehe 3.14, S. 97) mit 1 $\mu\text{g}$  RSV- $\beta\text{Gal}$  und 5 $\mu\text{g}$  des jeweiligen HCV-Konstruktes A bis F **oder**
- **Für Untersuchungen am replizierenden HBV-System:** Vermischen von 2,5 $\mu\text{g}$  pHBV1.5 - DNA mit 5 $\mu\text{g}$  des jeweiligen HCV-Konstruktes A bis F
- **alle Experimente:** Transfektion in Doppelansätzen nach dem Protokoll in Abschnitt 2.8.2

<b>Probe</b>	<b>Erläuterung</b>	<b>Konstrukt</b>
A	nur-DNA Negativkontrolle	pBluescript KS II+
B	Negativkontrolle zum SV40-HCV Core Konstrukt	SV40-ORF2
C	SV40-HCV Core	pSV40-HCVCore 1a
D	Negativkontrolle zum CMV-HCV Core Konstrukt	CMV-ORF2, pEGFP-C2
E	CMV-HCV Core 1a	pcDNA3-HCVCore 1a
F	CMV-HCV Core 1b	pMO120 (pcDNA3-HCVCore 1b)

**Tabelle 2.5:** Darstellung der bei Kotransfektionen verwendeten Konstrukte. Unter Erläuterungen sind die jeweils verwendeten Promotoren angegeben.

## 2.9 Reporterassays zum Messen der HBV-Promotor- und Enhanceraktivitäten

Reporterassays dienen der Messung von Promotor- und Enhanceraktivitäten. Für die Untersuchung der Aktivitäten des basalen Kapsidgenpromotors, des Volllänge-promotors und des Enhancer 1 des HBV wurden diese vor ein Luciferasegen kloniert. Im Luciferaseassay wurde die Höhe der Luciferaseexpression gemessen und dieser Wert gegen das kotransfizierte, im ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay gemessene, RSV- $\beta$ -Galactosidase-Konstrukt standardisiert (siehe 2.4, S. 44 und 2.9.5, S. 60).

### 2.9.1 Vorbereitung der Zellen für Luciferase - und ONPG- $\beta$ -Galactosidase - Assay

Mit Luciferase-, RSV- $\beta$ Gal- (siehe 2.4, S. 44) und HCV Core-Konstrukten kotransfizierte HuH7 Zellen wurden – soweit nicht anders angegeben – am dritten Tag nach Transfektion mit 1xPBS gewaschen, mittels 350 $\mu$ l Lysepuffer des Firefly-Luciferasekits (Fa. Promega) lysiert, mit einem Plastischaber abgeschabt und für 1 Minute bei 4000xg und 25°C zentrifugiert. Mit dem Überstand des Zentrifugats konnten der Firefly Luciferase- und der ONPG- $\beta$ -Galactosidase - Assay durchgeführt werden.

### 2.9.2 Firefly Luciferase-Assay[7, 213]

- Vorlage von 100 $\mu$ l der Firefly Substratlösung (Beetle Luciferin) des Luciferasekits in ein Luminometerröhrchen (Fa. Falkon)
- Vermischen mit 20 $\mu$ l des Zelllysats aus 2.9.1

- Messen der Luciferaseaktivität für 10 Sekunden im Luminometer bei Raumtemperatur

### 2.9.3 ONPG- $\beta$ -Galactosidase (lacZ) - Assay [86]

Vom Überstand aus Abschnitt 2.9.1 wurden 50 $\mu$ l eingesetzt und zu folgendem Reaktionsgemisch gegeben:

- 500 $\mu$ l Assaypuffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 39 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>)
- 1  $\mu$ l 1M Dithiothreitol (DTT) und 150 $\mu$ l o-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG), 4 mg/ml dH<sub>2</sub>O) frisch zugegeben

Je nach Stärke der Reaktion inkubierten alle Ansätze bei 37°C für 1-2 Stunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 $\mu$ l 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und der Farbumschlag bei OD<sub>405</sub> vermessen.

### 2.9.4 X-Gal- $\beta$ -Galactosidase - Assay

Dieses Experiment wurde für eine Abschätzung der Transfektionseffizienz und zum Optimieren des 2xBBS Transfektionspuffers verwendet.

- Waschen der Zellen mit 1xPBS
- Fixierung mit Ethanol absolut für 10 Minuten, danach nochmaliges Waschen mit 1xPBS
- Färben der Zellen mit einer Färbelösung, bestehend aus (es folgen Angaben für 6cm-Schalen; Angaben für 10cm-Schalen sind in Klammern gesetzt)
  - 200 $\mu$ l (600 $\mu$ l) X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-Galactopyranosid, 10mg/ml gelöst in DMSO absolut)
  - 1,8 ml (5,4 ml) 1xPBS
  - 20 $\mu$ l (60 $\mu$ l) 500mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] + 20 $\mu$ l (60 $\mu$ l) 500mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]
  - 6 $\mu$ l (18 $\mu$ l) 1M MgCl<sub>2</sub>

- Inkubation der Zellen für 4 bis 16 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank
- Zellen mit  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität waren blau gefärbt.

### 2.9.5 Auswertung der Luciferase-Experimente

Der gemessene Luciferasewert wurde zur Standardisierung auf die Zellzahl durch den parallel gemessenen ONPG- $\beta$ -Gal-Wert dividiert. Das Ergebnis entspricht der standardisierten Promotoraktivität (2.1). Diese Promotoraktivität wurde – soweit nicht anders angegeben – in Relation zur jeweiligen Negativkontrolle (=1) gesetzt (2.2). Eine relative Promotoraktivität <1 entsprach in der Interpretation der Ergebnisse einer Repression, >1 einer Verstärkung. Die relative Standardabweichung wurde als Quotient aus absoluter Standardabweichung zum Mittelwert berechnet (2.3).

$$\text{Promotoraktivität} = \frac{\text{Luciferasewert}}{\text{ONPG} - \beta - \text{Gal} - \text{Wert}} \quad (2.1)$$

$$\text{relative Promotoraktivität} = \frac{\text{Promotoraktivität}}{\text{Negativkontrolle}} \quad (2.2)$$

$$\text{relative Standardabweichung} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \quad (2.3)$$

## 2.10 RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Experimente mit folgender RNA-Isolierung zum Nachweis der Genexpression von HCV Core, HBV Core oder der ATP-Synthase 6 („housekeeping Gen“ zur Standardisierung) wurden mit in Schalen (6 cm Durchmesser) ausgesäten HuH7- und HepG2.2.15 Zellen durchgeführt. Die RNA-Präparation erfolgte mit dem RNeasy Kit (Fa. Qiagen).

- Waschen der transfizierten Zellen mit 1xPBS und Inkubation mit 600 $\mu$ l Lysepuffer RLT
- Lysat mit 600 $\mu$ l 70% Ethanol versetzen, auf Qiagen-Säulen geben, 15 Sekunden bei 4000xg und 25°C zentrifugieren

- Waschen der Säule mit den Puffern RW1 und RPE, dazwischen jeweils für 15 Sekunden bei 4000xg und 25°C zentrifugieren
- Trockenzentrifugation der Säulenmembran für 2 Minuten bei 4000xg und 25°C
- Anschließende RNA-Elution mit 50µl RNase freiem dH<sub>2</sub>O und Zentrifugation für 1 Minute bei 4000xg und 25°C.

## 2.11 HBV-Virusfällung aus Zellkultur- mediumüberstand

Umhüllte Viruskapside assoziieren unspezifisch mit Polyethylenglykol (PEG). Dies ermöglichte die Fällung aus dem Mediumüberstand transfizierter Zellen und wurde in dieser Arbeit für die Darstellung der HBV-Sekretionsaktivität verwendet [3].

- 1,2 ml Mediumüberstand HBV-transfizierter HuH7-Zellen + 133µl 10x PEG-Lösung (85% PEG 6000 w/v dH<sub>2</sub>O; Drehen für 16 Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler
- 10 Minuten bei 7000xg zentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen; aus dem Pellet (HBV Viren) wurde danach die DNA extrahiert (siehe 2.12, S. 61)

## 2.12 DNA-Extraktion aus HBV-Viren

Dieses Verfahren ermöglichte die Isolierung der in den HBV Virionen enthaltenen DNA. Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

- Virus-Pellet in 100µl 1x PBS aufnehmen + 5µl Proteinase K ( $\equiv$  5 mAU<sup>1</sup>, Qiagen Proteinase) + 10µl 10% SDS
- 2 Stunden bei 56°C im Schüttler inkubieren
- versetzen mit 115µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1); vortexen und bei 1000xg 3 Minuten und 4°C zentrifugieren

---

<sup>1</sup>1 mAU = Spaltung von 1µmol Tyrosin-Äquivalent aus denaturiertem Hämoglobin in 1 Minute

- wässrige obere Phase abnehmen
- Ethanolfällung wie in Abschnitt 2.7.2 (S. 52) beschrieben
- DNA-Pellet aufnehmen in 20 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Die erhaltene DNA wurde danach in der quantitativen PCR (siehe 3.1.2, S. 81) vermessen.

## 2.13 Isolierung intrazellulärer HBV Kapside

Intrazelluläre HBV Kapside können durch Immunpräzipitationstechniken mit polyclonalen Antikörpern, gerichtet gegen das HBV Core Protein, selektiv herausgefällt werden. Durch Isolierung und quantitativer Bestimmung der HBV-DNA aus den Kapsiden ermöglichte diese Methode eine Aussage über die Konzentrationen von HBV Kapsiden in der Zelle.

### 2.13.1 Benötigte Puffer und Lösungen

**TNE-Puffer** 10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl

**Lysepuffer** 10 mM Tris pH 8; 10 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM EDTA pH 8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,2% Igepal; 1 mM Dithiotreitol (DTT) (alles Fa. Sigma); 1 mM Pefablock (Fa. Roth)

**Protein A Agarose** Fa. Roche

### 2.13.2 Immunpräzipitation von HBV Kapsiden

#### 1. Aufbereiten der Zellen

- Waschen der HBV-transfizierten HuH7-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten „post transfectionem“, wie bei den jeweiligen Experimenten angegeben, in 1x PBS und Aufnahme in 500 $\mu$ l 1x PBS
- Abschaben und Zusammenfügen der Zellsuspensionen von 3 Schalen (6 cm Durchmesser) pro Meßwert (=Gesamtvolumen von 1500 $\mu$ l)
- Aliquotieren von 300 $\mu$ l Zellsuspension zur Isolation gesamt-zytoplasmatischer RNA (siehe 2.10, S. 60)

- Zentrifugation der restlichen 1200 $\mu$ l für 10 Minuten bei 1000xg und 4°C
- Inkubation des Zell-Pellets in 300 $\mu$ l Lysepuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Homogenisieren im Glas-Glas Kolbenhomogenisator (Fa. Zeiss) mit 10-15 Schlägen

## 2. Präinkubation von Antikörpern und Zelllysate

- dreimaliges Waschen der Protein A Agarose (150 $\mu$ l/Probe) mit 200 $\mu$ l TNE-Puffer; Aufnehmen der Protein A Agarose in TNE-Puffer (200 $\mu$ l/Probe)
- Mischen von Zelllysate mit 100 $\mu$ l der Protein A Agarose - Suspension zum Blockieren unspezifischer Bindungen
- Mischen von 15 $\mu$ l anti-HBc ( $\equiv$  1:30 Verdünnung, polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Kapsidprotein von HBV, Fa. Dako) mit 100 $\mu$ l der Protein A Agarose - Suspension
- Inkubation für 4 - 12 Stunden bei 4°C im rotierenden Überkopfschüttler

## 3. Immunpräzipitation

- Zentrifugieren des Zelllysate - Protein A Agarose - Gemisches bei 4000xg und 25°C für 30 Sekunden
- Vermischen des Überstands mit dem anti-HBc - Protein A Agarose - Gemisch
- Inkubation im rotierenden Überkopfschüttler für 12-16 Stunden bei 4°C
- Zentrifugieren des Testansatzes bei 4000xg und 25°C für 30 Sekunden
- dreimaliges Waschen des Pellets mit 200 $\mu$ l TNE-Puffer
- DNA-Extraktion (=progeny (Vorläufer) DNA-Assay) nach dem Schema in Abschnitt 2.12 (S. 61)

## 2.14 Darstellung der HBV cccDNA

Die HBV cccDNA („covalently closed circular DNA“) ist ein episomales Replikationsintermediat des HBV und dient der HBV Transkription als Vorlage (siehe 1.1.5.1, S. 19). Aussagen über die Menge intranukleärer cccDNA geben Hinweise auf mögliche Behinderungen der HBV-Reifung und Ausschleusung.

Die intranukleäre HBV cccDNA wurde quantitativ vermessen, um eine Behinderung der HBV Kapsidsekretion durch das HCV Core Protein zu erfassen.

### 2.14.1 Eingesetzte Puffer

**Lysepuffer** 0,6% SDS, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7,2  
5M NaCl

### 2.14.2 Hirt-Extraktion zur Isolation episomaler DNA-Moleküle [77]

- Präparation der Kernextrakte wie in Abschnitt 2.18 (S. 73) beschrieben, dabei keine Verwendung von Proteaseinhibitoren
- 50 $\mu$ l Kernextrakt, 100 $\mu$ l Lysepuffer und 40 $\mu$ l 5M NaCl mischen
- für 12-16 Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler drehen
- 1 Stunde bei 17000xg und 4°C zentrifugieren (Ausfällen von SDS mit zellulärer DNA)
- Überstand Proteinase K-verdauen, Phenol-extrahieren, DNA-fällen (wie in Abschnitt 2.12 (S. 61) beschrieben)
- das Präzipitat in 20 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufnehmen.

Die erhaltene DNA wurde mit der HBV Core quantitativen PCR (siehe 3.1.2, S. 81) und pHBV1.5 qPCR (siehe 3.1.3, S. 84) vermessen. Die Differenz von HBV Core zu pHBV1.5 ergibt die Anzahl der cccDNA Moleküle nach der Gleichung:

$$cccDNA = HBV\ Core - pHBV1.5 \quad (2.4)$$

## 2.15 Expressionsanalyse mittels quantitativer PCR

### 2.15.1 Das Prinzip der quantitativen PCR

Das Ziel der quantitativen real-time PCR ist die Messung der im Reaktionsansatz vorhandenen, sequenzspezifischen Nukleinsäure-Konzentration. Das Prinzip der



„Taqman“ quantitativen PCR (im folgenden als qPCR abgekürzt) baut auf dem in Abschnitt 2.5 (S. 47) beschriebenen PCR-Verfahren auf. Zusätzlich zu den Vorwärts- (FP) und Rückwärtsprimern (RP) wird in dieser Technik eine sogenannte Taq-Probe (TP) eingesetzt. Die TP ist ein ca. 20 Basen langes Oligonukleotid, dessen 5'- und 3'-Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Reporter (6-FAM = 6-Carboxyfluorescein) und Quencher (TAMRA = 5-/6-Carboxytetramethylrhodamine)) markiert sind. Die TP bindet kurz hinter dem 3'-Ende des FPs [78, 125, 70, 60].

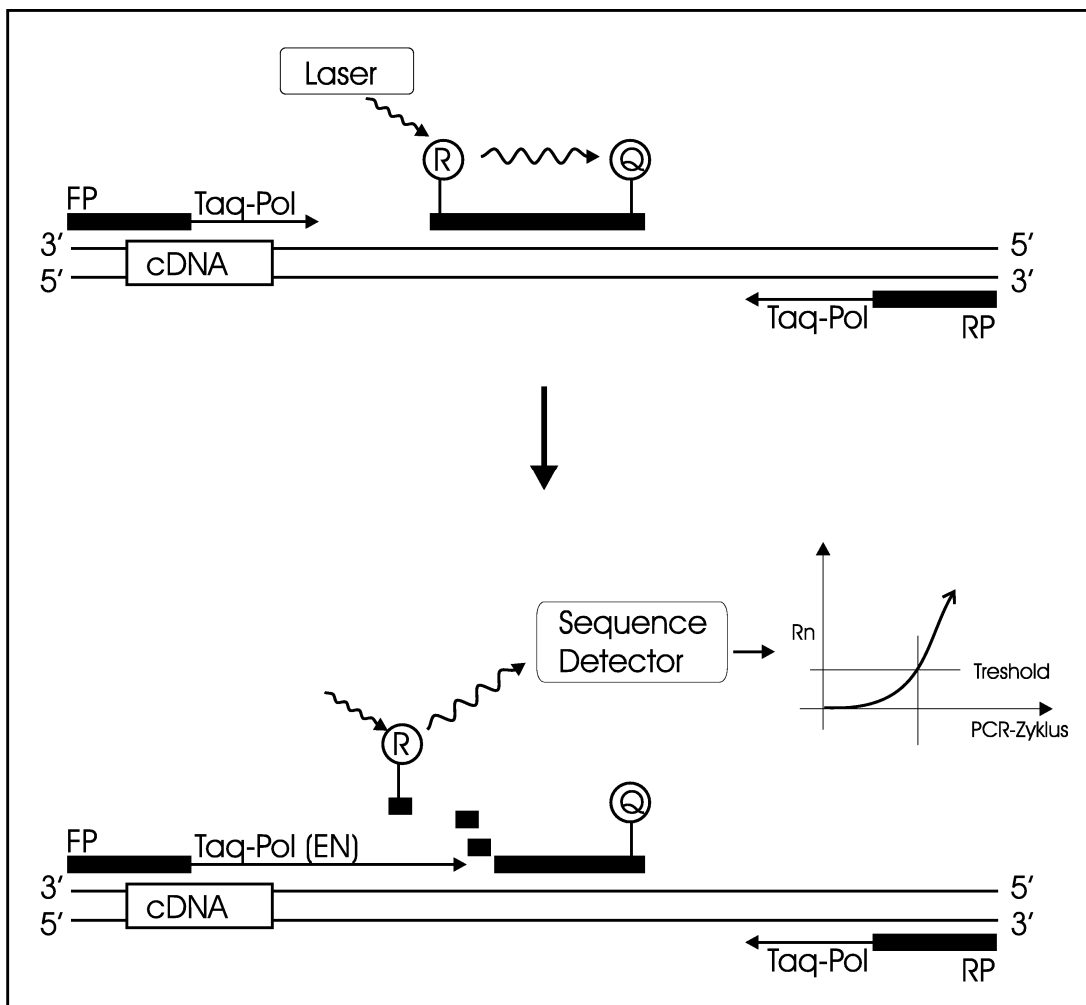
Durch einen Förster-Energietransfer kann die Fluoreszenz des Reporters auf den Quencher übertragen werden [53, 111]. Wird der Reporter durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten, findet auch kein Förstertransfer auf den Quencher statt. Die Emission des Reporters kann nun mit einer Kamera detektiert werden.

Je mehr Kopien der spezifischen Nukleinsäure im Reaktionsansatz vorhanden sind, desto mehr TP wird gebunden und Reporterfarbstoff abgespalten. Ab einem gewissen Punkt überschreitet die Emissionsstärke des Reporters die Detektionsschwelle („Treshold“). Dieser Zykluspunkt wird durch lineare Regression gegen die Werte einer bekannten DNA-Verdünnungsreihe auf die Kopienzahl zurückgerechnet. Die Umrechnung von der DNA-Konzentration in die Kopienzahl ist in Formel 2.5 gezeigt.

$$\begin{aligned}
 \text{Plasmidmasse } x \text{ in pg} &= \text{Plasmidlänge in bp} \times \text{Gewicht eines bp} \times \text{Avogadrozahl} \\
 &= \text{Plasmidlänge in bp} \times 660 \text{ Da} \times (1,66 \times 10^{-24} \text{ g}) \times 10^{12} \\
 \Rightarrow 1 \text{ pg} &= 1/x \text{ DNA - Kopien}
 \end{aligned}
 \tag{2.5}$$

Eine weitere Möglichkeit bei der quantitativen PCR besteht im Einsatz von SYBR Green (Fa. Molecular Probes, Applied Biosystems) anstelle der TP. In den amplifizierten Strängen lagert sich das fluoreszierende Interkalans SYBR Green ein, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich dadurch ändern. Die Spezifität des Systems muß durch eine Gelelektrophorese der PCR Produkte nachgewiesen werden [72, 75].

Die qPCR läßt sich auch für den quantitativen RNA-Nachweis anwenden, indem ein reverse Transkriptase- (RT-) Schritt vor die eigentliche qPCR gesetzt wird [60].



**Abbildung 2.7:** Das Prinzip der Taqman quantitativen PCR: Die Exonukleaseaktivität (EN) der Taq-Polymerase (Taq-Pol) schneidet den Reporter (R) von der Taq-Probe ab. Somit kann er sein Fluoreszenz-Signal nicht mehr auf den Quencher (Q) übertragen und wird dadurch meßbar. Durch Positionieren eines Tresholds kann aus dessen Schnittpunkt mit der Fluoreszenzkurve auf den PCR-Zyklus zurückgerechnet werden.

### 2.15.2 Benötigte Materialien für die qPCR

Zur Durchführung der qPCR wurde das in Abschnitt 2.2 (S. 40) bezeichnete GeneAmp 5700 System eingesetzt. Die PCR-Steuerung und Auswertung wurde mit der GeneAmp 5700 SDS Software durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten „MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates“ und „Optical Caps“ der Fa. PE Biosystems.

Als PCR Reagenzien wurden folgende Produkte der Fa. Applied Biosystems verwendet:

**Für DNA Analysen** TaqMan Universal PCR Master Mix

- 2x Master Mix (bestehend aus AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG (Uracil-N-Glycosylase, entfernt Uracil aus PCR-Produkten), dNTPs und dUTP, einem passiven Referenzfarbstoff (ROX) und optimiertem Puffer)

**Für RNA Analysen** TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit

- 40x MultiScribe (=rekombinante Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) und RNase Inhibitor Mix sowie
- 2x Master Mix (bestehend aus AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs und dUTP, einem passiven Referenzfarbstoff (ROX) und optimiertem Puffer) ohne AmpErase UNG

**Für SYBR Green PCR** SYBR Green PCR Master Mix

- 2x Master Mix (bestehend aus AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs und dUTP, einem passiven Referenzfarbstoff (ROX) und SYBR Green I Farbstoff)

Für das Erstellen und die Berechnung der Primer und Taq-Probes wurde die Software Primer Express 2.0 der Fa. Applied Biosystems verwendet. Dabei wurden folgende Regeln beachtet [1]:

- die Amplikonlänge (Abstand zwischen FP und RP) sollte 150 bp nicht überschreiten
- je kürzer der Abstand vom Primer zur Taq-Probe, desto genauer kann das System messen (max. 50 bp Abstand)
- der G/C-Gehalt sollte zwischen 30 und 80% liegen
- die letzten 5 Basen am 3'-Ende der Primer durften maximal 2 G's oder C's enthalten
- die Schmelztemperaturen für die Primer sollten im Bereich zwischen 58 und 60°C, die für die TP 5-10°C höher liegen
- max. 3 aufeinanderfolgende Basenwiederholungen im Oligonukleotid (nie 3 G's)

### 2.15.3 Standardisierung

Standardisierung und Umrechnung in Nukleinsäurekonzentrationen erfolgten für jede qPCR (auch RT-qPCR) mittels einer Plasmid-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich ng bis fg. Die für die qualitative Interpretation optimale Primer- und TP-Konzentrationen wurden eingestellt. Als Optimum galt die Konzentration, bei der die Fluoreszenzstärke der Negativkontrolle die Fluoreszenzstärke der Positivkontrollen sicher nicht erreichte. Somit konnten falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Alle Werte sind – soweit nicht anders angegeben – doppelt gemessen, um die Standardabweichung der Messungen berechnen zu können. Der Treshold-Wert wurde in die Wendepunkte der Fluoreszenzkurven gelegt [1].

Zur Standardisierung der gemessenen HBV-Core- und HCV-Core- Konzentrationen wurden diese durch die, mittels RT-qPCR ermittelte, Expression des Housekeeping Gens ATP-Synthase, Untereinheit 6 (siehe 3.1.1, S. 79), dividiert (siehe Formel 2.6).

$$\textit{standardisierte HCV oder HBV Last} = \frac{\textit{HCV oder HBV}}{\textit{ATS}} \quad (2.6)$$

## 2.16 Expressionsanalyse durch HCV Core - Proteinnachweis

Western Blot Experimente wurden durchgeführt, um die Expression des klonierten HCV Core Gens auf Proteinebene zu bestätigen.

### 2.16.1 Eingesetzte Lösungen und Puffer

**Lyse-Puffer** 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 50 mM Tris pH 8; 10 mM Pefablock (Fa. Roth)

**TCA** Trichloressigsäure, 100% w/v wässrige Lösung

**4x Probenpuffer [110]** 0,25 M Tris; 8% SDS; 40% Glycerin; 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,008% Bromphenolblau; pH 6,8 (eingestellt mit konzentrierter HCl)

**10x PAGE Puffer** 0,25 M Tris pH 8; 1,92 M Glycin

**Acrylamid-Fertiglösung** Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1), Fa. Roth

**Transferpuffer** 39 mM Glycin; 48 mM Tris pH 8; 0,037% SDS; 20% Methanol

**Waschpuffer** 1x PBS; 0,2% Tween-20 (Fa. Sigma)

**Blockierlösung** 3% w/v Magermilchpulver (Lasana, Fa. Humana) in Waschpuffer

**Chemilumineszenzlösungen** Mischung aus Lösung 1 und 2 direkt vor Verwendung

- Lösung 1 (17,7 ml dH<sub>2</sub>O; 2 ml Tris pH 8,5; 200  $\mu$ l Luminol; 88  $\mu$ l Coumarinsäure)
- Lösung 2 (18 ml dH<sub>2</sub>O; 2 ml Tris pH 8,5; 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 2.16.2 Vorbereitung der Proben

- Aussaat der HuH7-Zellen, Transfektion mit 20 $\mu$ g pSV40-HCVCore 1a, pcDNA3-HCVCore 1a oder pEGFP-HCVCore 1a
- Abschaben der Zellen im Medium 4 Tage post transfectionem
- Zentrifugieren der Zellsuspension bei 500xg und 4°C für 5 bis 10 Minuten
- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS
- Lyse mit 300  $\mu$ l Lyse-Puffer
- Zentrifugieren für 10 Minuten bei 4000xg und 4°C; Abnahme des Überstands; Proteinfällung durch Zusatz von TCA ad 20% für mindestens 12 Stunden bei 4°C
- danach 10 Minuten bei 4000xg und 4°C zentrifugieren
- Pellet mit 500  $\mu$ l -20°C gekühlter Aceton-1M HCl (9:1) waschen, zentrifugieren bei 4000xg und 4°C für 5 Minuten
- Pellet mit 500  $\mu$ l -20°C gekühltem Aceton waschen, zentrifugieren
- Pellet danach vakuumtrocknen

### 2.16.3 Auftrennen der Proben mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) dient zum Auftrennen von Proteinen nach deren Molekulargewicht. Hierbei werden die Proteine denaturiert, durch Reaktion mit SDS stark negativ geladen und mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese über eine Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt [110].

Die hier aufgeführten Volumina sind für BioRad Mini-Gele berechnet.

**12,5% Trenngel** 4 ml Acrylamid-Lösung; 2 ml dH<sub>2</sub>O; 3,75 ml 1M Tris pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS; 50  $\mu$ l 10% Ammoniumpersulfat (APS, Fa. Sigma); 10  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Fa. Sigma)

**3% Sammelgel** 0,65 ml Acrylamid-Lösung; 3,675 ml dH<sub>2</sub>O; 0,625 ml 1M Tris pH 6,8; 50  $\mu$ l 10% SDS; 25  $\mu$ l 10% APS; 5  $\mu$ l TEMED

Die Proteinproben wurden mit 40  $\mu$ l 4x Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 100°C gekocht, danach in die Taschen des Sammelgels gegeben. Die Proben wurden in 1x PAGE-Puffer mit 0,1% SDS bei 140-200 V für ca. 1-2 Stunden im Gel aufgetrennt.

### 2.16.4 Identifikation des HCV Core Proteins mittels Western Blot-Analyse [185]

Bei der Western Blot - Analyse wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben auf eine PVDF-Membran (PolyScreen Polyvinylidenfluorid, Fa. NEN Life Sciences) transferiert und dort immobilisiert. Durch Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HCV Core Protein und Sichtbarmachung von dessen Bindung mittels eines Zweitantikörpers und Chemilumineszenzreaktion konnte das HCV Core Protein detektiert werden.

- elektrischer Transfer des SDS-PAGE Gels im „semi dry“ - Verfahren (Aufbau: Kathode – 3x Transferpuffer-getränktes Whatman Papier – Membran – SDS-Gel – 3x Transferpuffer-getränktes Whatman Papier – Anode) auf die PVDF-Membran für 75 Minuten bei 2 mA/cm<sup>2</sup> [16]
- Inkubation der Membran in Blockierlösung über Nacht bei 4°C
- Inkubation in Waschpuffer für 3x 10 Minuten (Waschen)

- 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper anti-HCVcore (monoklonaler Mausantikörper, Fa. Affinity Bioreagents), Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer
- Waschen
- 1 Stunde Inkubation mit dem zweiten Antikörper anti-Maus IgG (Kaninchenantikörper gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, Fa. Dianova), Verdünnung 1:4000 in Waschpuffer
- Waschen
- 1 Minute Inkubation mit Chemilumineszenzlösung 1 und 2
- Verpacken der Membran in Frischhaltefolie und Exposition auf Röntgenfilm bis zur guten Sichtbarkeit der Banden

## 2.17 Fluoreszenzmikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation von HCV Core ist mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie des EGFP-HCV Core 1a Fusionsproteins untersucht worden. Die Zellkerne wurden zur besseren Orientierung mit Propidiumjodid gegengefärbt.

In einem zweiten Experiment ist die Verteilung von HBV-Kapsiden und EGFP-HCV Core 1a gleichzeitig beobachtet worden. Zellkerne konnten hier, wegen Belegung des Rotkanals durch die HBV-Kapsid-Fluoreszenz, nicht dargestellt werden.

### 2.17.1 Eingesetzte Puffer und Lösungen

**Fixationslösung** 3,7% Formaldehyd + 300 mM Sucrose, gelöst in 1xPBS

**Kernfärbelösung** 5  $\mu$ g Propidiumjodid + 10  $\mu$ l RNase A Stocklösung (10 mg/ml), gelöst in 1 ml 1x PBS

**Blockierlösung** 0,5% Triton X-100 + 2% BSA in 1xPBS

### 2.17.2 Darstellung von Zellkern und EGFP-HCV Core 1a

- Aussaat von HuH7-Zellen auf 1x1cm Deckgläschen in Zellkulturschalen (6 cm Durchmesser)

- Transfektion mit 10 $\mu$ g pEGFP-C2 (als Negativkontrolle) oder pEGFP-HCV Core 1a; zusätzlich Kotransfektion mit 5 $\mu$ g pHBV1.5 (Methode: 2.8.2, S. 57)
- Waschen des Deckgläschens in 1x PBS nach 3,6 oder 9 Tagen
- Fixieren der Präparate mit Fixationslösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 3x Waschen mit 1x PBS
- Kernfärbung mit Kernfärbelösung für 30 Minuten bei 37°C.

Die Deckgläschen wurden mittels eines Tropfens Glycerin oder Eindeckmedium (Elvanol, Fa. Dako) auf einen Objektträger transferiert und sofort mikroskopiert.

### 2.17.3 Darstellung von HBV Kapsiden und EGFP-HCV Core 1a

- Aussaat von HuH7-Zellen auf 1x1cm Deckgläschen in 6cm Zellkulturschalen
- Kotransfektion von 5 $\mu$ g pEGFP-C2 (als Negativkontrolle) oder pEGFP-HCV Core 1a zusammen mit 5 $\mu$ g pHBV1.5
- Waschen des Deckgläschens in 1x PBS nach 3 Tagen
- Fixieren der Präparate mit Fixationslösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 3x Waschen mit 1x PBS
- Inkubation in Blockierlösung für 15 Minuten
- Inkubation mit dem Erstantikörper anti-HBc (polyklonaler Kaninchenantikörper, Fa. Dako, 1:100 verdünnt) in Blocklösung für 30 Minuten
- zweimaliges Waschen der Deckgläschen mit 1xPBS
- Inkubation mit dem TRITC- (Tetramethylrhodamin Isothiocyanat Isomer R) markierten Zweitantikörper (anti-Kaninchen, Fa. Dianova, 1:200 verdünnt) für 30 Minuten

Die Deckgläschen wurden mittels eines Tropfens Glycerin oder Eindeckmedium (Elvanol, Fa. Dako) auf einen Objektträger transferiert und sofort mikroskopiert.



### 2.17.4 Mikroskopparameter

#### **Rot** Zellkerne/HBV Kapside

- Propidiumjodid (Zellkerne): Anregungsmaximum 535 nm, Emissionsmaximum 615 nm
- TRITC (HBV Kapside): Anregungsmaximum 540 nm, Emissionsmaximum 580 nm
- Einstellung für beide Farbstoffe: Anregungsfilter BP 515-560, Sperrfilter LP 590

#### **Grün** EGFP/EGFP-HCVCore

- EGFP: Anregungsmaximum 484 nm, Emissionsmaximum 510 nm
- Mikroskopeinstellung: Anregungsfilter BP 450-490, Sperrfilter LP 520

## 2.18 Gelretardierungs - Analyse (Gelshift, EMSA)

Ziel der Gelshift Analyse oder EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ist die Detektion der Bindung von Proteinen oder Peptiden an bestimmte DNA-Sequenzen [54]. In dieser Arbeit wurde mittels Gelshift Analyse eine mögliche Bindung des HCV Core Proteins an den HBV Core Promotor und die Enhancer 1 und 2 untersucht. Dazu wurden Kernextrakte zuvor transfizierter Zellen gewonnen und mit radioaktiv markierten PCR-Fragmenten der genannten HBV-Steuerelemente hybridisiert.

### 2.18.1 Eingesetzte Puffer und Lösungen

**NPB-Puffer:** 10 mM Tris pH 7,4; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 140 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 5mM Pefablock (Fa. Roth)

**NPBT-Puffer:** NPB mit 0,1% Triton X-100

**Sucrose-NPB:** NPB mit 50% w/v Sucrose (Fa. Sigma)

**Dignam C:** 20 mM Hepes pH 7,9; 25% Glycerol; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 5 mM Pefablock

**5xBindepuffer:** 125 mM Hepes pH 7,6; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 170 mM KCl

**10x Proteinase Inhibitor Cocktail:** 20 mM DTT; 5 mM Pefablock (Fa. Roth);  
20% Aprotinin(Fa. Roth)

**Dialysepuffer:** 25 mM Hepes pH 7,6 (Fa. Sigma); 0,1 mM EDTA; 40 mM KCl;  
11,4% Glycerin

**Laufpuffer:** 0,25xTBE

**5% Polyacrylamidgel:** 12,5 ml 1xTBE; 8,3 ml Polyacrylamid-Lösung (37,5:1, Fa.  
Roth); 29,17 ml dH<sub>2</sub>O; 350µl APS (Ammoniumpersulfat, Fa. Sigma); 30µl  
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Fa. Sigma)

**DNA Ladepuffer:** 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene Cyanol FF (Acid blue  
147); 40% Sucrose (alles Fa. Sigma)

**20% Ficoll:** wässrige Lösung (Fa. Sigma)

**Fixierlösung:** 10% Essigsäure; 20% Ethanol in dH<sub>2</sub>O

### 2.18.2 Herstellung von Kernextrakten [45]

- Aussaat der HuH7-Zellen, Transfektion mit 20µg pcDNA3-HCVCORE 1a; nicht transfizierte Zellen dienen als Negativkontrolle
- Abschaben im Medium 4 Tage post transfectionem
- Zentrifugieren der Zellsuspension bei 500xg und 4°C für 5 bis 10 Minuten
- zweimaliges Waschen mit PBS, danach Zugabe von 100µl kaltem (0°C) NPBT Puffer und gutes Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren
- Aufladen des Homogenates auf ein 150µl großes Sucrose-NPB - Kissen
- Zentrifugieren bei 4000xg und 4°C für 10 Minuten
- Die Sucrose- (=zytosolische) Fraktion wird aliquotiert; die Kerne in 50µl Dig-nam C resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C gedreht, danach 10 Minuten bei 4000xg und 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand entspricht dem Kernextrakt
- Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80°C

### 2.18.3 Bradford Assay [20]

Der Bradford Assay diente der photometrischen Proteinquantifizierung, um bei den Gelshift Analysen immer gleiche Proteinmengen einzusetzen.

- Verdünnung von 10 $\mu$ l Kernextrakt mit 790 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
- Mischen dieser Verdünnung mit 200 $\mu$ l Bradford Reagenz (Fa. Biorad), Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Photometrische Bestimmung der OD<sub>595</sub>
- Vergleich gegen eine BSA-Standardreihe (1, 2, 5, 10  $\mu$ g Bovines Serum Albumin (BSA) pro 10 $\mu$ l)

### 2.18.4 Generierung der DNA-Fragmente

In dieser Arbeit sind PCR-Fragmente der HBV Core Promotor- und Enhancer-Regionen nach dem Standard PCR-Protokoll (siehe 2.5, S. 47, Primer: s. Tabelle 2.7) synthetisiert worden (s. Tabelle 2.6).

DNA-Fragment	FP	RP	Fragmentgröße (bp)
enh1XP-1	FP HBV enh1XP 2364	RP4 HBV enh1XP 2504	140
enh1XP-2	FP4 HBV enh1XP 2497	RP3 HBV enh1XP 2686	189
enh1XP-3	FP3 HBV enh1XP 2682	RP HBV enh1XP 2774	92
fcp-1	HBVfcp s	RP HBV fcp 3113	115
fcp-2	FP HBV fcp 3106	HBV bcp AS	150

**Tabelle 2.6:** Durch PCR generierte Fragmente für die Untersuchung in Gelshift-Experimenten

Name	Sequenz
HBVfcp s	CGGGGTACCCCTTCACCTCTGCACGTTGCA
RP HBV fcp 3113	GCCTCAAGGTCGGTCGT
FP HBV fcp 3106	CTTGAGGCCTACTTCAAAGACTGT
HBVbcp AS	GGAAGATCTAAGAGATGATTAGGCAGA
FP2 HBV enh1XP 2364	GGGGTACCCCTTCCTGTTAACAGGCCTATT
RP4 HBV enh1XP 2504	GTGAAAGCCTGTTTAGCTTGTATA
FP4 HBV enh1XP 2497	GCTTTCACCTTCTCGCCAAC
RP3 HBV enh1XP 2686	TCGGCAGAGGAGCCACA
FP3 HBV enh1XP 2682	GCCGATCCATACTGCGGA
RP HBV enh1XP 2774	GGGGTACCCCTGTATATTTCCGCGAGAGG

**Tabelle 2.7:** Oligonukleotide für die Generierung von PCR-Fragmenten für die Gelshift-Analyse

### 2.18.5 Radioaktive Markierung der PCR-Fragmente

- Mischen von 125ng PCR-Fragment mit 2 $\mu$ l T4-Kinasepuffer und 1 $\mu$ l (10 U) T4-Kinase (Fa. Roche), ad 16 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
- Zugabe von 4 $\mu$ l <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP ( $\equiv$  40 $\mu$ Ci, Fa. NEN Lifesciences)
- Inkubation für 30 Minuten bei 37°C
- Hinzufügen von 30 $\mu$ l TE-Puffer
- Entfernen von freien Nukleotiden über Sephadex G25 Säulen (Fa. Amersham Pharmacia)
- Inkubation der markierten DNA für 15 Minuten bei 75°C
- 1 $\mu$ l des Produktes wird im Szintillationszähler ( $\beta$ -Counter) ausgezählt

### 2.18.6 Hybridisierung von radioaktiven PCR-Fragmenten mit Kernextrakt-Proteinen

Zur Hybridisierung wurde zuvor ein Mastermix mit dem markierten PCR-Fragment erstellt:

- 4 $\mu$ l 5x Bindepuffer; 2 $\mu$ l 10x Proteinase Inhibitor Cocktail

- 1  $\mu\text{g}$  Poly-d[I-C] (Fa. Sigma) und 2  $\mu\text{g}$  BSA zum Blockieren unspezifischer Bindungen
- 60000 cpm (counts per minute) radioaktiv markiertes PCR-Fragment
- Hinzufügen von  $\text{dH}_2\text{O}$  bis zu einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$

Zu je 10  $\mu\text{l}$  des Mastermixes wurden folgende Proteinverdünnungen zugegeben:

- 10  $\mu\text{l}$  Dialysepuffer (freie DNA-Probe) **oder**
- 5  $\mu\text{g}$  Kernextrakt nicht-transfizierter HuH7-Zellen (Negativkontrolle) **oder**
- 5  $\mu\text{g}$  Kernextrakt nicht-transfizierter HuH7-Zellen mit 0,5  $\mu\text{l}$  anti-HCV Core Antikörper unverdünnt (Fa. Affinity Bioreagents) (Negativkontrolle) **oder**
- 5  $\mu\text{g}$  Kernextrakt pcDNA3-HCVCORE 1a transfizierter HuH7-Zellen **oder**
- 5  $\mu\text{g}$  Kernextrakt pcDNA3-HCVCORE 1a transfizierter HuH7-Zellen mit 0,5  $\mu\text{l}$  anti-HCV Core Antikörper unverdünnt **oder**
- 1  $\mu\text{g}$  rekombinantes HCV Core- $\beta\text{Gal}$  Fusionsprotein (Fa. Advanced Immunochemical)

Das Gesamtvolumen wurde bis 20  $\mu\text{l}$  mit Dialysepuffer ergänzt und für 25 Minuten bei 0°C inkubiert.

### 2.18.7 Gelelektrophorese

- Gießen des 5% Polyacrylamidgels und Polymerisation
- Vor-Elektrophorese des Gels für 30 Minuten bei 150 V und 4°C
- Hinzufügen von 2  $\mu\text{l}$  20% Ficoll zu den Hybridisierungsproben und 2  $\mu\text{l}$  DNA-Ladepuffer zur freien DNA-Probe
- Gelelektrophorese bei 300 V und 4°C
- Stop der Elektrophorese, wenn die Bromphenolblau-Bande ca. 8 cm vom unteren Gelrand entfernt war

### 2.18.8 Fixierung und Autoradiographie des Gels

- Nach Gellauf Inkubation des Gels in Fixierlösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten
- Vakuum-Trocknen des Gels für 1 Stunde bei +80°C auf Whatman-Papier
- Exposition des getrockneten Gels auf Röntgenfilm für 24 Stunden bis mehrere Tage bei -80°C

# Kapitel 3

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Etablierung quantitativer real-time PCR-Systeme zum Nachweis von HBV- und HCV-Nukleinsäuren

Für den Nachweis von HBV Core RNA und DNA, pHBV1.5 Plasmid DNA und HCV Core RNA wurden quantitative PCR-Systeme (qPCR) entwickelt. Sie dienen der Analyse der HBV Core Transkription (HBV Core RT-qPCR), Messung der enkapsidierten intrazellulären und extrazellulären HBV DNA (HBV Core qPCR), Quantifizierung der intranukleären HBV cccDNA (HBV Core und pHBV1.5 qPCRs) sowie der transkribierten HCV Core RNA (HCV Core RT-qPCR).

Um die Meßergebnisse auf die eingesetzte Zellzahl standardisieren zu können (siehe 2.15.3, S. 68), wurde die Transkriptionsanalyse des „house-keeping“ Gens ATP-Synthase 6 (ATS RT-qPCR) durchgeführt [59].

Das Prinzip der quantitativen PCR sowie das eingesetzte Material sind in Abschnitt 2.15 (S. 64) beschrieben.

#### 3.1.1 ATP-Synthase 6 quantitative PCR (ATS RT-qPCR)

Dieses System mißt die Transkriptionsrate des Gens der mitochondrialen ATP-Synthase, Untereinheit 6 (im folgenden als ATS bezeichnet). Die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und andere „stabil“ exprimierte Stoffwechselgene („House-keeping Genes“) wurden als zu empfindlich gegenüber zellulären Stresssituationen eingeschätzt und deshalb in dieser Arbeit nicht verwendet [59].

Um die ATS RT-qPCR für die Quantifizierung der Zellzahl nutzen zu können, wurden die Primerkonzentrationen optimiert und in Standard-Verdünnungsreihen eingesetzt.

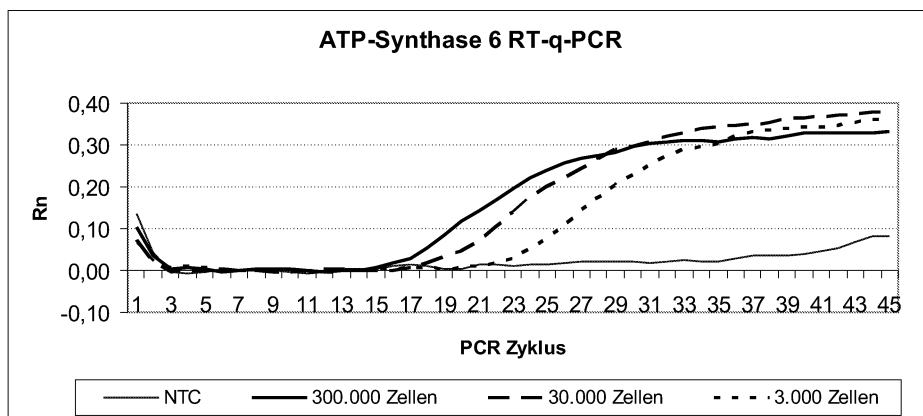
### 3.1.1.1 Primer und Zyklusparameter

Name	Sequenz	Konzentration
ATP-S-6-FP	CAGTGATTATAGGCTTTTCGCTCTAA	11 pmol/ $\mu$ l
ATP-S-6-RP	CAGGGCTATTGGTTGAATGAGTA	6 pmol/ $\mu$ l
ATP-S-6-Taq	FAM-AGCCCACTTCT-TACCACAAGGCACA-TAMRA	10 pmol/ $\mu$ l

**Tabelle 3.1:** Primer und Taq-Probe für die Verwendung in der ATS RT-qPCR. *Siehe auch [59].*

Die Durchführung der ATS RT-qPCR erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 3.1 angegebenen Oligonukleotide ATP-S-6-FP, ATP-S-6-RP und ATP-S-6-Taq mit folgenden PCR-Schritten:

- Reverse Transkriptase- (RT-) Schritt: 30 Minuten bei 48°C
- Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C
- 40 Zyklen (15 Sekunden Schmelzen 95°C → 1 Minute Annealing und Extension bei 60°C)



**Abbildung 3.1:** Verdünnungsreihe der ATS RT-qPCR. NTC = No template control (Negativkontrolle), Rn = Relative Fluoreszenz (Quotient aus Reporterfluoreszenz und passivem Referenzfarbstoff).



### 3.1.1.2 Durchführung der Standardisierung der ATS RT-qPCR

Aus  $3 \times 10^6$  HuH7-Zellen wurde RNA isoliert (siehe 2.10, S. 60). Als Standard-Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen 1:10 ( $\equiv$  300.000 Zellen), 1:100 ( $\equiv$  30.000 Zellen) und 1:1000 ( $\equiv$  3.000 Zellen) eingesetzt.

### 3.1.1.3 Ergebnis der Standardisierung und Diskussion

Das Ergebnis der Standardisierung ist in Abb. 3.1 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass mittels der ATS RT-qPCR Negativkontrolle (Abb. 3.1, NTC) und Positivkontrollen (Abb. 3.1, RNA von 3.000 bis 300.000 Zellen) anhand des Fluoreszenzanstiegs bei Zyklus 45 ( $<0,1$  gegenüber 0,3 bis 0,4) eindeutig voneinander diskriminierbar sind. Die größte Genauigkeit der linearen Regressionskurve (Lage der Zykluspunkte auf der Standardgerade) konnte bei einem „Treshold“ (siehe Abb. 2.7, S. 66 und 2.15.3, S. 68) von 0,1 relativen Fluoreszenzeinheiten (Rn) berechnet werden.

Durch dieses Experiment konnte demonstriert werden, dass die ATS RT-qPCR ein sicheres und genau messendes System zur Quantifizierung der Expression des „house-keeping“ Gens ATP-Synthase 6 (ATS) ist. Die ATS-Expression wurde in allen weiteren funktionellen Experimenten zur HBV-HCV-Koinfektion als Surrogatparameter für die Zellzahl verwendet.

## 3.1.2 HBV Core quantitative PCR (HBV Core qPCR)

Die HBV Core qPCR wurde zum quantitativen Nachweis von HBV Core RNA (RT-qPCR) und HBV Core DNA eingesetzt. Ihr Einsatz erfolgte in Experimenten mit dem Ziel der quantitativen Analyse der HBV Transkription, der enkapsidierten HBV DNA und der intranukleären HBV cccDNA-Konzentration (siehe 3.1.3, S. 84).

Die Etablierung der HBV Core qPCR beinhaltete das Entwerfen der Primer und Taq-Probe (siehe 2.15.1, S. 64), Einstellen der Konzentration, Test in der RT-qPCR und Aufstellen der Standard-Verdünnungsreihe.

### 3.1.2.1 Primer und Zyklusparameter

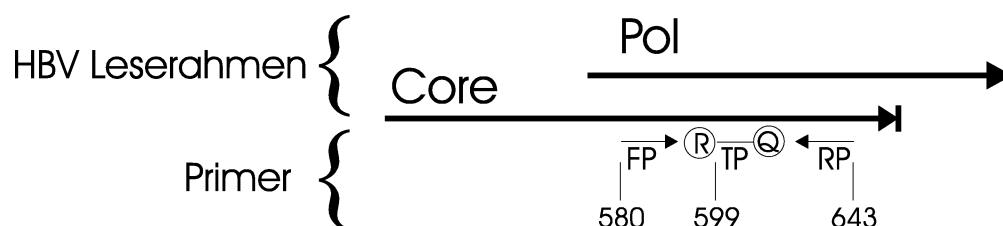
In der HBV Core qPCR und RT-qPCR wurden die Oligonukleotide FP HBV Core 580F, RP HBV Core 643R und HBV-core adw2.599T (siehe Tabelle 3.2 und Abb. 3.2) verwendet. Die Ermittlung der optimalen Primer und Taq-Probe erfolgte am

HBV-Genotyp adw2 (Bezugspunkt der Basennummerierung: prä-C ATG = 1). Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

- Reverse Transkriptase- (RT-) Schritt (nur bei RT-qPCR): 30 Minuten bei 48°C
- Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C
- 45 Zyklen (15 Sekunden Schmelzen 95°C → 1 Minute Annealing und Extension bei 60°C)

Name	Sequenz	Konzentration
FP HBV Core 580F	GCCTCGCAGACGCAGATC	15 pmol/ $\mu$ l
RP HBV Core 643R	ACATTGAGATTCCCGAGATTGAG	15 pmol/ $\mu$ l
HBV-core adw2.599T	FAM-CCATCGCCGCGT- CGCAGAAG-TAMRA	10 pmol/ $\mu$ l

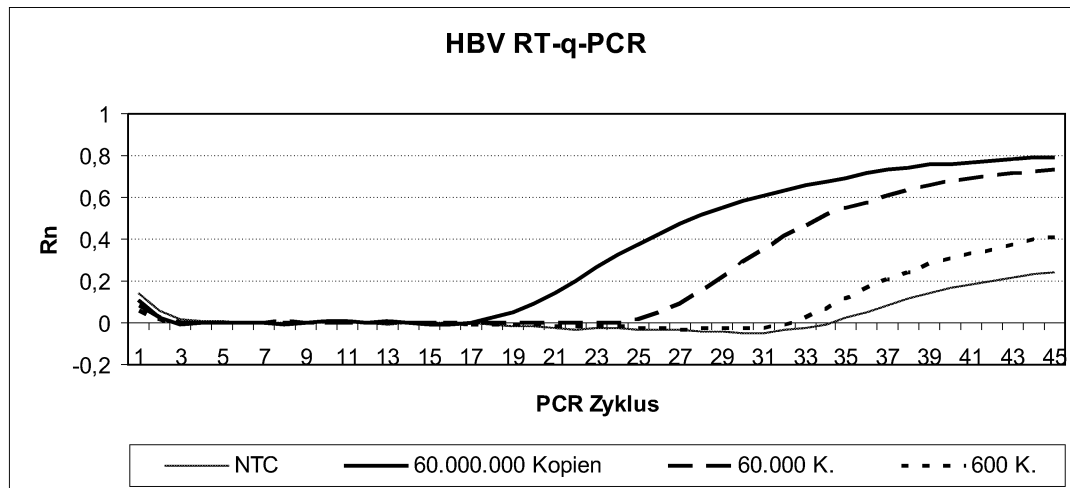
**Tabelle 3.2:** Primer und Taq-Probe für die Verwendung in der HBV Core qPCR und RT-qPCR



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Primerlokalisierung der HBV Core qPCR in Bezug auf die Leserahmen des HBV Core Gens und der HBV Polymerase (Pol). FP = Vorwärtsprimer, TP = Taq-Probe, RP = Rückwärtsprimer. Die Zahlen sind die Nukleotidpositionen und beziehen sich auf das prä-C ATG = 1.

### 3.1.2.2 Durchführung der Standardisierung und Quantifizierung von HBV Core Nukleinsäuren

Die Länge des verwendeten Plasmidstandards pHBV1.5 beträgt ca. 7400 bp. Damit ergibt sich nach Formel 2.5 (S. 65) in einer Konzentration von 1 pg/ $\mu$ l eine Anzahl von  $1,2 \times 10^5$  DNA-Molekülen. Nach dem Erstellen einer Standard-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 500 pg/5  $\mu$ l ( $\equiv$  60.000.000 DNA-Kopien), 500 fg/5  $\mu$ l ( $\equiv$  60.000 DNA-Kopien) und 5 fg/5  $\mu$ l ( $\equiv$  600 DNA-Kopien), wurden pro Analyse 5  $\mu$ l DNA- oder RNA-Isolat in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.



**Abbildung 3.3:** Verdünnungsreihe des Plasmidstandards pHBV1.5 in der HBV Core RT-qPCR. NTC = No template control (Negativkontrolle), Rn = Relative Fluoreszenz (Quotient aus Reporterfluoreszenz und passivem Referenzfarbstoff).

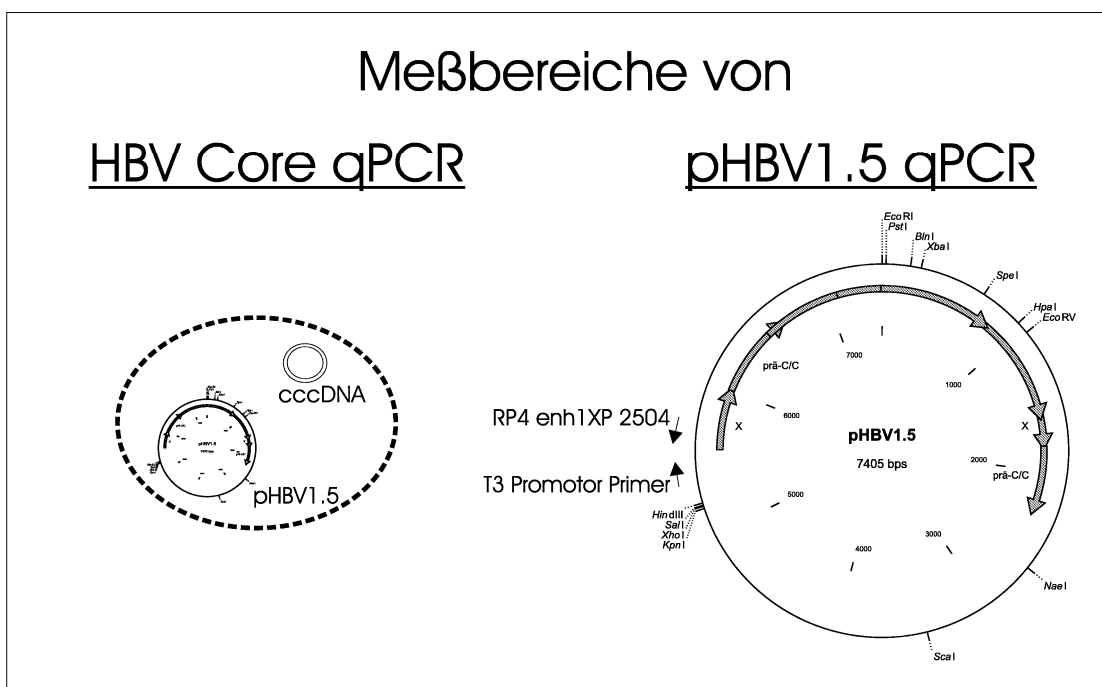
### 3.1.2.3 Ergebnis der Standardisierung und Diskussion

In der Abbildung 3.3 ist das Ergebnis der Standardisierung der HBV Core RT-qPCR dargestellt. Hierbei zeigte sich ein Fluoreszenzanstieg der Negativkontrolle (Abb. 3.3, NTC) ab dem 35. PCR-Zyklus bis zu einem Maximum von 0,22 relativen Fluoreszenzeinheiten (Rn) bei Zyklus 45. Da die Fluoreszenzkurve der kleinsten Standardprobe (Abb. 3.3, 600 Kopien) bei Zyklus 45 nur ein Maximum von  $Rn = 0,4$  erreichte, mußte der „Treshold“ für die Berechnung der linearen Regressionskurve zwischen 0,22 und 0,4 gelegt werden. Bei einer Berechnung der linearen Regression bei einem „Treshold“ von 0,3 lagen alle drei Meßpunkte (Abb. 3.3, 600 bis  $60 \times 10^6$  Kopien) auf einer Geraden.

Sowohl mit der HBV Core qPCR als auch mit der RT-qPCR zeigte sich in allen weiteren Messungen eine zuverlässige Linearität der Messreihen, so dass auf eine weitergehende Optimierung (Verringern der Primer- oder Taq-Probe - Konzentrationen, Temperaturveränderung) verzichtet werden konnte.

Die HBV Core qPCR stellt ein im Bereich von 600 bis  $60 \times 10^6$  DNA-, RNA-Kopien/ $5 \mu l$  linear messendes Analysesystem dar. Positive und negative Proben können sauber voneinander getrennt werden. Durch die Erfüllung dieser Kriterien ist auch ein Einsatz in der Diagnostik der HBV-Infektion möglich.

### 3.1.3 pHBV1.5 quantitative PCR (pHBV1.5 qPCR)



**Abbildung 3.4:** Das Meßprinzip zur Quantifizierung der intranukleären HBV cccDNA. Von der aus dem Kernisolat bestimmten Gesamt-HBV-DNA (ermittelt durch die HBV Core qPCR) wird die pHBV1.5-Plasmid-Konzentration (ermittelt durch die pHBV1.5 qPCR) subtrahiert. Das Ergebnis spiegelt die Konzentration der HBV cccDNA wider. Ebenfalls eingezeichnet sind die Positionen der pHBV1.5 qPCR Primer in Bezug auf das pHBV1.5 - Plasmid.

Die pHBV1.5 qPCR wurde entwickelt, um die Menge des pHBV1.5 - Plasmidanteils im Ergebnis der HBV Core qPCR bestimmen zu können (siehe Abb. 3.4). Ihre Anwendung blieb deshalb auf die Analyse der intranukleären HBV cccDNA-Konzentration beschränkt. Diese berechnet sich aus der Differenz der Ergebnisse von HBV Core qPCR - pHBV1.5 qPCR (siehe Abb. 3.4).

Die Etablierung der pHBV1.5 qPCR beinhaltete das Erstellen und die Konzentrationseinstellung der Primer, die Standardisierung und den Nachweis der Spezifität durch Gelelektrophorese der Amplifikate.

#### 3.1.3.1 Primer und Zyklusparameter

Die verwendeten Primer waren der T3-Promotor Primer des Vektors pBluescript als Vorwärtsprimer und der RP4 HBV enh1XP 2504 des HBV-„Inserts“ als Rückwärtsprim-

mer (siehe Tabelle 3.3 und Abb. 3.4). Die pHBV1.5 qPCR wurde mit einem SYBR-Green - Reaktionsansatz folgendermaßen durchgeführt:

- Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C
- 40 Zyklen (15 Sekunden Schmelzen 95°C → 1 Minute Annealing und Extension bei 60°C)

Name	Sequenz	Konzentration
T3 Promotor Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	5 pmol
RP4 HBV enh1XP 2504	GTGAAAGCCTGTTTAGC- TTGTATA	7,5 pmol

**Tabelle 3.3:** Primer für die Verwendung in der pHBV1.5 qPCR

### 3.1.3.2 Durchführung von Standardisierung, Quantifizierung und Nachweis der Spezifität der pHBV1.5 qPCR

Es wurden die Konzentrationen 5pg/5µl (≡600.000 Kopien), 500fg/5µl (≡60.000 Kopien) und 50fg/5µl (≡6.000 Kopien) aus der pHBV1.5 - Standardverdünnungsreihe mit der gleichen DNA-Konzentrations-Kopienzahl - Umrechnung wie in Abschnitt 3.1.2 verwendet. Die Quantifizierung der pHBV1.5 DNA wurde aus Kernextrakten (siehe 3.12, S. 133) durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte noch der Nachweis der Spezifität über eine elektrophoretische Auftrennung der qPCR-Amplifikate (siehe Abb. 3.6).

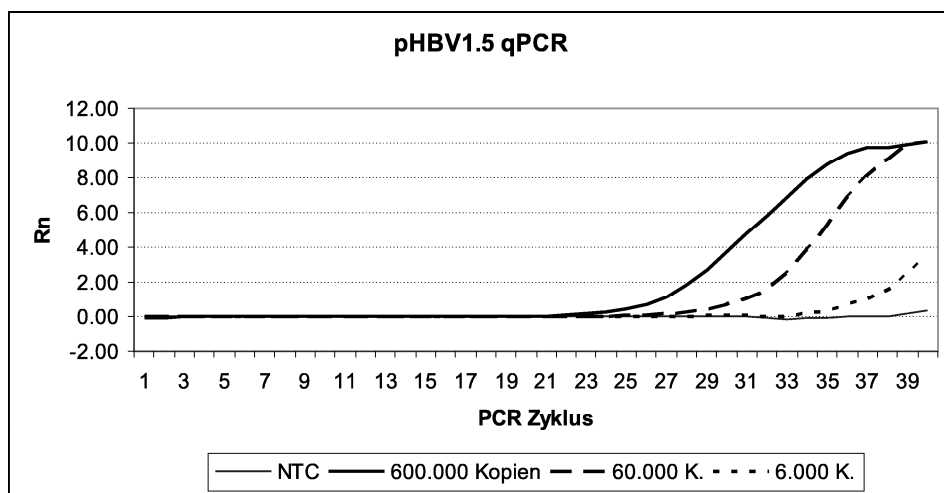
### 3.1.3.3 Ergebnis der Standardisierung und Diskussion

Das Ergebnis der Standardisierungsexperimente (siehe 3.1.3.2 und 3.12, S. 133) ist in den Abb. 3.5 und 3.6 dargestellt. Hierbei konnte ein leichter Anstieg der Negativkontrolle (Abb. 3.5, NTC) auf  $R_n = 0,1$  bei Zyklus 40 beobachtet werden. Daher wurde der „Threshold“ für die lineare Regression auf Werte  $>0,1$  gelegt, so dass die Meßpunkte der 3 Standard-Verdünnungsstufen auf einer Geraden zu liegen kamen (Abb. 3.5, 6.000 bis 600.000 Kopien).

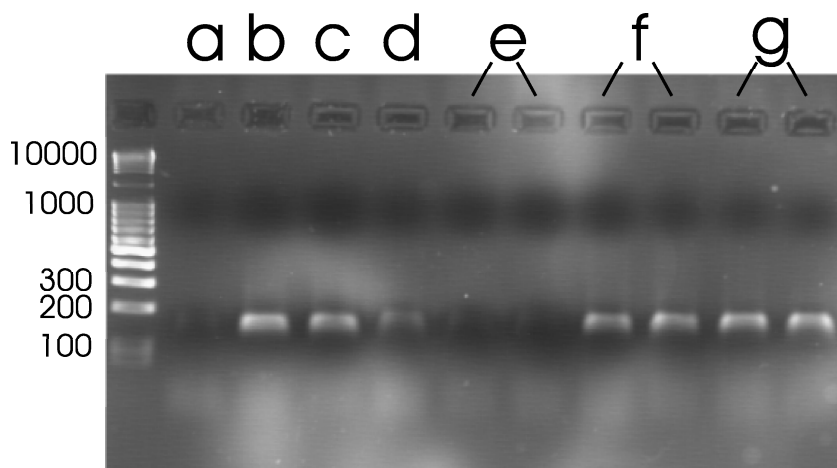
Die Spezifität der pHBV1.5 qPCR für pHBV1.5-Plasmide wurde mittels Gelelektrophorese der qPCR-Amplifikate nachgewiesen (siehe Abb. 3.6). Hier zeigten sich in den Positivkontrollen (Abb. 3.6 b-d,f,g) Banden bei einer DNA-Größe von 180

bp, was auch der erwarteten Länge des amplifizierten Abschnitts entsprach. In den Negativkontrollen (Abb. 3.6 a,e) wurden keine Banden detektiert.

Aus den Ergebnissen läßt sich schlussfolgern, dass die pHBV1.5-qPCR zur Quantifizierung von pHBV1.5 Plasmiden und im Zusammenhang mit der HBV Core qPCR zur quantitativen Analyse der intranukleären HBV cccDNA-Konzentration geeignet ist.



**Abbildung 3.5:** Standard-Verdünnungsreihe des Plasmidstandards pHBV1.5 in der pHBV1.5 qPCR. NTC = No template control (Negativkontrolle), Rn = Relative Fluoreszenz (Quotient aus Reporterfluoreszenz und passivem Referenzfarbstoff).



**Abbildung 3.6:** Nachweis der Spezifität der pHBV1.5 - qPCR. (a) qPCR NTC (Negativkontrolle), (b) 5 pg pHBV1.5, (c) 500 fg pHBV1.5, (d) 50 fg pHBV1.5 ( $\equiv$  6000 Kopien/ $\mu$ l); Doppelwerte der cccDNA-Präparate (siehe 3.12, S. 133): (e) Negativkontrolle des Versuchs, (f)  $\equiv$  18000 Kopien/ $\mu$ l, (g)  $\equiv$  33000 Kopien/ $\mu$ l.

### 3.1.4 HCV Core quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Die HCV Core RT-qPCR wurde etabliert, um in zellbiologischen Experimenten die Transkriptionsrate von zuvor transfizierten HCV Core Konstrukten quantitativ bestimmen zu können.

Die Etablierung der HCV Core RT-qPCR beinhaltete das Entwerfen der Primer und Taq-Probe, Einstellen und Optimieren von Primer- und Taq-Probe - Konzentrationen und Aufstellen der Standard-Verdünnungsreihe.

Die bisher für die Diagnostik verfügbaren HCV qPCR-Systeme verwenden die höher konservierten 5'-UTR- und 3'-UTR- Bereiche, die auch für die Primer- und Taq-Probe - Konstruktion einfacher zugänglich sind [135, 163]. Folgende Probleme ergaben sich bei der Entwicklung einer qPCR in der HCV Core Region:

- Ein Drittel der Basenfolgen im Core-Bereich stellten dreifach bis fünffach - Folgen (z.B. CCCCC) dar.
- Der GC-Anteil mit 62% und regionaler Häufung von GC-Inseln führte zu einer weiteren Einschränkung des verfügbaren Sequenzbereichs.

Die meisten Abschnitte standen für eine Amplikonlänge >50 Basen aus diesen Gründen nicht zur Verfügung, so dass nur der Übergangsbereich 5'-UTR-HCV Core nutzbar war. Diese Einschränkung erforderten die weiter unten beschriebenen Optimierungsschritte.

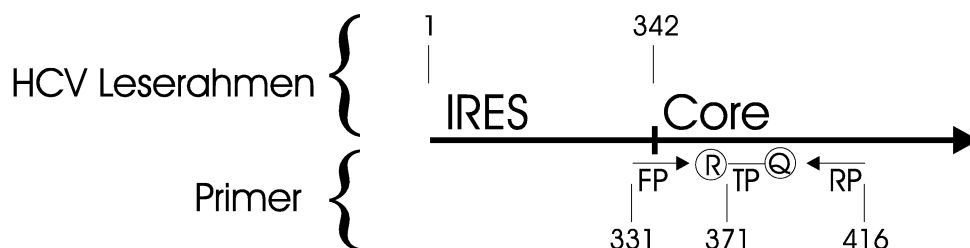
#### 3.1.4.1 Primer und Zyklusparameter

Zur Durchführung der HCV Core RT-qPCR wurden die Oligonukleotide HCV-FP 331, HCV-RP 416 und HCV Taq-371 (siehe Tabelle 3.4 und Abb. 3.7) verwendet. Die Ermittlung der optimalen Primer und Taq-Probe erfolgte am Genotyp HCV 1a (Bezugspunkt der Basennummerierung ist die HCV IRES = 1). Der Reaktionsansatz der HCV Core RT-qPCR wurde wie folgt durchgeführt:

- RT-Schritt: 30 Minuten bei 48°C
- Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95°C
- 45 Zyklen (15 Sekunden Schmelzen 95°C → 1 Minute Annealing und Extension bei 60°C)

Name	Sequenz	Konzentration
HCV-FP 331	GACCGTGCATCATGAGCAC	2,5 pmol/ $\mu$ l
HCV-RP 416	CGGGAACCTAACGTCCTGTGG	2,5 pmol/ $\mu$ l
HCV Taq-371	FAM-AATCAAACGTAACAC- CAACCGCCGC-TAMRA	3,75 pmol/ $\mu$ l

**Tabelle 3.4:** Primer und Taq-Probe für die Verwendung in der HCV Core qPCR



**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung der Primerlokalisierung der HCV Core RT-qPCR in Bezug auf den Anfang des HCV Genoms. FP = Vorwärtsprimer, TP = Taq-Probe, RP = Rückwärtsprimer. Die Zahlen sind die Nukleotidpositionen von IRES- und HCV Core Gen - Beginn (oben) und den Oligonukleotiden (unten).

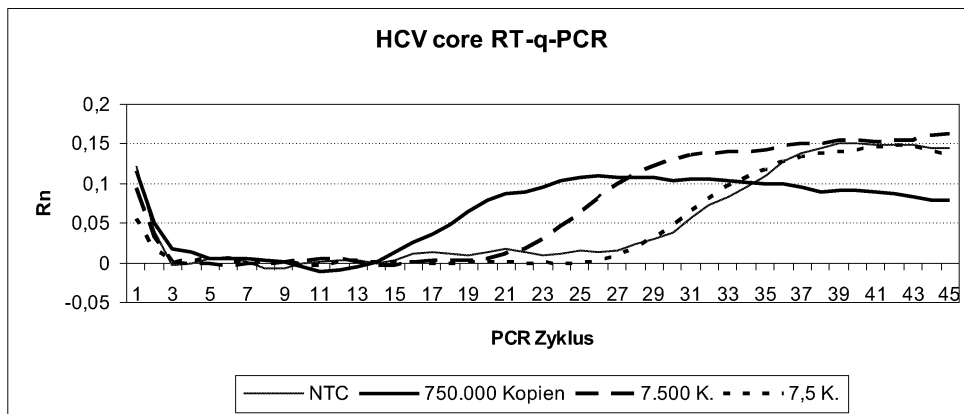
### 3.1.4.2 Durchführung der Standardisierung und Quantifizierung von HCV Core RNA

Zur Standardisierung der HCV Core RT-qPCR wurde auf die Plasmid - DNA pcDNA3-HCV Core 1a (siehe 3.2.1, S. 90) mit einer Länge von 6178 bp zurückgegriffen. Anhand der Formel 2.5 (S. 65) ergeben sich  $1,5 \times 10^5$  DNA-Moleküle pro  $\mu$ l bei einer Konzentration von 1 pg/ $\mu$ l.

Die Standardgerade für das HCV Core RT-qPCR System ließ sich bis in sehr niedrige Konzentrationen ( $0,05 \text{ fg}/5\mu\text{l} \equiv 7,5 \text{ DNA-Kopien pro Reaktionsansatz}$ ) linearisieren. Bei Konzentrationen über  $500 \text{ fg}/5\mu\text{l} (\equiv 75.000 \text{ Kopien})$  waren aber keine sicheren Werte mehr zu erzielen. Aus diesem Grund sind in den Experimenten RNA-Proben für die HCV Core Expressionsanalyse zuvor 1:10 verdünnt worden.

In der qualitativen Analyse (Trennung positiv/negativ) traten Fehler auf. In vielen Messungen mußte die Negativkontrolle als falsch-positives Meßergebnis gewertet werden (siehe Abb. 3.8). Dies erforderte eine weitere Optimierung der HCV Core RT-qPCR (siehe folgender Abschnitt).



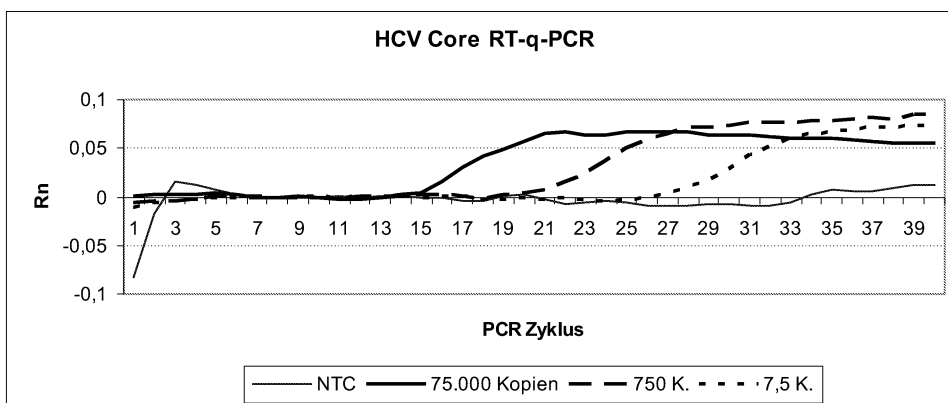


**Abbildung 3.8:** Die Standardverdünnungsreihe der HCV Core RT-qPCR vor der Optimierung. Die falsch-positive Negativkontrolle zeigt noch deutlichen Verbesserungsbedarf. NTC = No template control (Negativkontrolle), Rn = Relative Fluoreszenz (Quotient aus Reporterfluoreszenz und passivem Referenzfarbstoff).

### 3.1.4.3 Optimierung der HCV Core RT-qPCR

Die Optimierung des Systems bestand im Wesentlichen aus dem Absenken der Negativkontrollen-Fluoreszenz („Hintergrundrauschen“) durch Neueinstellung von Primer- und Taq-Probe - Konzentrationen. Es wurde darauf geachtet, daß dies die Sensitivität zur Erkennung positiver Proben nicht beeinträchtigte.

Nach Absenken der Primer- (von 10 auf 2,5 pmol) und nachfolgend der Taq-Probe-Konzentrationen (von 10 auf 3,75 pmol) bewegte sich die Fluoreszenzkurve der Negativkontrolle nach unten (siehe Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9:** Die Standardverdünnungsreihe der HCV Core RT-qPCR nach der Optimierung. Die Negativkontrolle (NTC) hebt sich nun deutlich negativ von den positiven Proben ab. Rn = Relative Fluoreszenz (Quotient aus Reporterfluoreszenz und passivem Referenzfarbstoff).

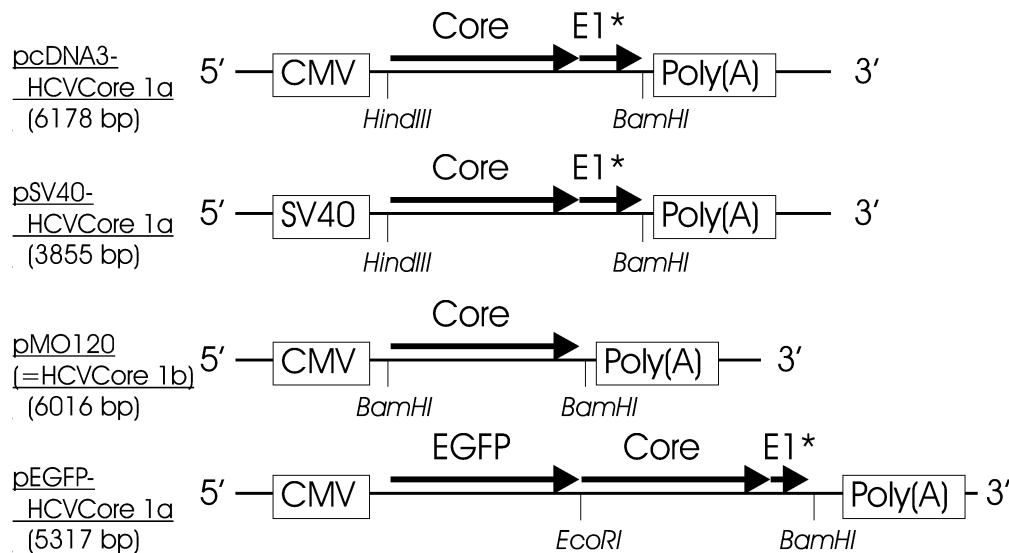
### 3.1.4.4 Ergebnis der Standardisierung und Optimierung, Diskussion

Das Ergebnis der etablierten HCV Core RT-qPCR zeigt Abb. 3.9. Hier ist ersichtlich, dass die Negativkontrolle ab PCR-Zyklus 34 nachweisbar wird und in Zyklus 40 eine Fluoreszenzstärke von  $R_n = 0,01$  erreicht (Abb. 3.9, NTC). Sie liegt damit weit unter den Fluoreszenzstärken der Positivkontrollen, die sich alle oberhalb von  $R_n = 0,05$  befinden (Abb. 3.9, 7,5 bis 75.000 Kopien). Für die Berechnung der linearen Regressionskurve mußte der Treshold auf  $R_n$ -Werte  $>0,01$  und  $<0,05$  gelegt werden, damit alle 3 Standardverdünnungsmeßpunkte auf einer Geraden liegen.

Die HCV Core RT-qPCR ist das erste quantitative Messverfahren für HCV Core RNA (getestet wurde nur der Genotyp HCV 1a). Das Verfahren mißt im Bereich zwischen 7,5 und 75.000 RNA-Kopien/ $5\mu\text{l}$  linear. Liegt die Ausgangskonzentration höher, so muß die zu messende Probe verdünnt werden.

## 3.2 Etablierung von HBV - und HCV - Konstrukten

### 3.2.1 HCV Core Konstrukte



**Abbildung 3.10:** HCV Core Expressionsplasmide. E1\* bedeutet, dass hier noch wenige (47) N-terminale Aminosäuren des HCV E1-Proteins translatiert werden. pMO120 wurde freundlicherweise von Björn Schwer (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Um die Effekte des exprimierten HCV Core Proteins auf den HBV Replikationszyklus untersuchen zu können, wurde das HCV Core Gen zunächst in Expressionsvektoren inkloniert. Die Expressionskonstrukte wurden anschließend in humane Hepatomzelllinien (HuH7, HepG2, HepG2.2.15) transient transfiziert (siehe 2.8.2, S. 57). Der Nachweis der Expression erfolgte durch Taqman RT-PCR (HCV Core RNA), Western Blot Analyse (HCV Core Protein) und Fluoreszenzmikroskopie (EGFP-fusioniertes HCV Core Protein).

### **3.2.1.1 Herstellung des pcDNA3-HCVCORE 1a Konstruktes**

Das Plasmid pcDNA3-HCVCORE 1a (Abb. 3.10) wurde mittels PCR-Klonierung mit den Primern HCV C1 und HCV C2 in den Vektor pcDNA3.1 (siehe 2.3, S. 41) inkloniert und beinhaltet den Sequenzbereich 292 bis 1082 (komplettes HCV Core (191 AS) und 47 AS von HCV E1) des zugrunde liegenden HCV 1a Genoms (siehe 2.3.4, S. 44). Die Expression des Core Proteins wird durch einen humanen Cytomegalovirus - Promotor (CMV) gesteuert.

### **3.2.1.2 Herstellung des pSV40-HCVCORE 1a Konstruktes**

Das Plasmid pSV40-HCVCORE 1a (Abb. 3.10) wurde aus dem pSV40- $\beta$ Gal Reportervektor (Fa. Promega) durch HindIII-BamHI-Kassettenaustausch des lacZ-Gens (=  $\beta$ -Galactosidase) mit dem HCV Core 1a Gen aus dem pcDNA3-HCVCORE 1a - Konstrukt hergestellt. Die Expression des HCV Core Proteins wird durch einen Simian Virus 40 - Promotor (SV40) gesteuert.

### **3.2.1.3 Das Plasmid pMO120 (pcDNA3-HCVCORE 1b)**

Das Plasmid pMO120 (Abb. 3.10) stellt ein pcDNA3-HCVCORE 1b Konstrukt dar (im Folgenden als pcDNA3-HCVCORE 1b bezeichnet), das für diese Arbeit freundlicherweise von Herrn Dr. Björn Schwer (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Mithilfe dieses Plasmids und dem pcDNA3-HCVCORE 1a Konstrukt sollten Vergleiche zwischen HCV Genotyp-Unterschieden ermöglicht werden.

### **3.2.1.4 Herstellung des pEGFP-HCVCORE 1a Konstruktes**

Durch Einklonierung des mit den Primern FP HCVCORE 345 und RP HCVCORE 957 generierten Sequenzabschnitts 345 bis 957 des HCV Genoms 1a (Startcodon bei

Genom-Position 342) in den Vektor pEGFP-C3 konnte ein 439 AS langes EGFP-HCVCore 1a Fusionsprotein erzeugt werden (Abb. 3.10). Die Fusionsstelle im Plasmid wurde routinemäßig durch Sequenzierung kontrolliert.

Die intrazelluläre Verteilung des HCV Core Proteins wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Detektion des EGFP-HCVCore 1a - Fusionsproteins dargestellt (Ergebnisse: siehe 3.5, S. 104).

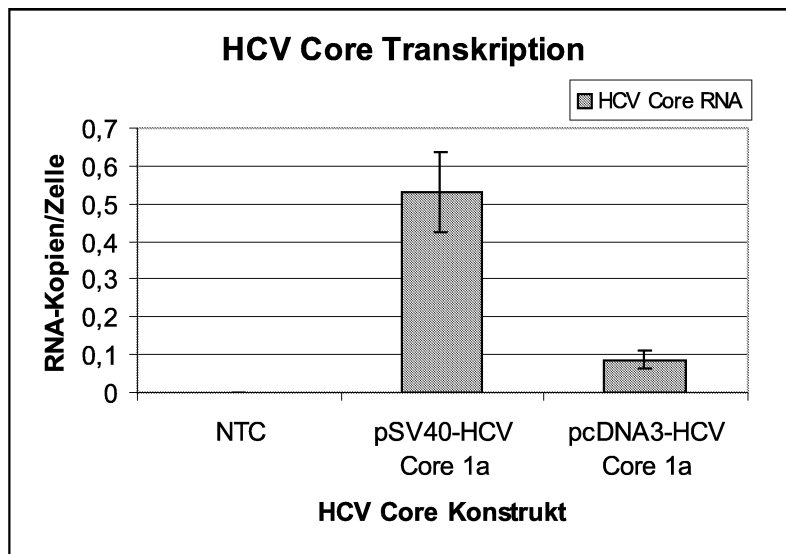
### **3.2.1.5 Quantitativer Transkriptionsnachweis der HCV Core Konstrukte pSV40-HCV Core 1a und pcDNA3-HCV Core 1a**

In diesem Experiment wurden die verschiedenen hohen Transkriptionsraten des HCV Core Gens in Abhängigkeit des vorgeschalteten Promotors (SV40- oder CMV-Promotor) untersucht. Die quantitative Bestimmung der HCV Core mRNA war ein Teilerperiment der HBV-Replikationsanalyse (siehe Kapitel 3.11, S. 128). Der Aufbau des Experiments ist Abschnitt 3.11.2 (S. 128) zu entnehmen.

Die Untersuchung zu der Expression von HCV Core unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren zeigte, dass das HCV Core Gen unter dem Einfluß des SV40-Promotors (pSV40-HCV Core 1a - Konstrukt) sechsfach höher transkribiert wird als das CMV-Promotor-kontrollierte pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt (siehe Abb. 3.11). Dass das HCV Core Protein den SV40-Promotor herauf- und den CMV-Promotor herunterregulieren kann, ist in der Literatur bereits beschrieben [172]. Weitere Belege zu einer derartigen Beeinflussung von CMV- und SV40-Promotor durch das HCV Core Protein sind in den Abschnitten 3.3 (S. 99) und 3.6 (S. 108) aufgeführt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in dieser Arbeit pSV40-HCV Core 1a als hoch exprimierendes, pcDNA3-HCV Core 1a als niedrig exprimierendes HCV Core Konstrukt definiert. In Untersuchungen, in denen der konzentrationsabhängige Effekt einer HCV Core Expression validiert werden sollte, wurden unterschiedliche Konzentrationsstufen von HCV Core auf zwei verschiedenen Wegen erzeugt:

- als direkte Konzentrationskinetik mittels Transfektion zweier verschieden hoher Konzentrationen pcDNA3-HCV Core 1a und
- als indirekte Konzentrationskinetik mittels Transfektion gleicher Konzentrationen pcDNA3-HCV Core 1a- und pSV40-HCV Core 1a - Konstrukt.



**Abbildung 3.11:** Quantitative Analyse der Transkription des HCV Core Gens. Das pSV40-HCV Core 1a - Konstrukt zeigt eine sechsfach höhere Transkription als das pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt. NTC = Negativkontrolle pBS KS II+ - transfizierte Zellen (siehe 2.8.3, S. 57).

### 3.2.2 Promotor-kompensierte Kontrollen

Die Expression von Fremdgenen in Zellen, gesteuert durch virale Promotoren, kann zu unspezifischen Effekten<sup>1</sup> führen, die jeweils die proteinspezifischen Wirkungen überdecken. Diese Hypothese wurde mit dem nun folgenden Experiment untermauert. Anschließend findet sich eine detailliertere Beschreibung der verwendeten Kontrollkonstrukte (siehe Abb. 3.12).

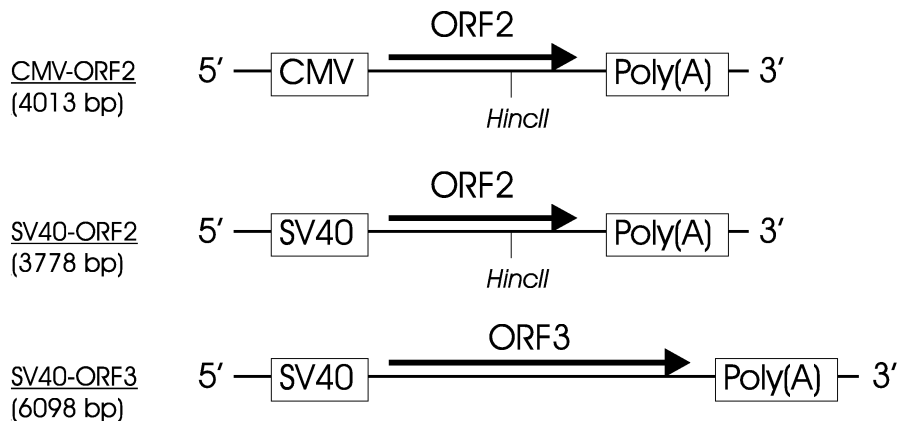
#### 3.2.2.1 Untersuchung zur Notwendigkeit Promotor-kompensierter Kontrollen

##### 3.2.2.1.1 Durchführung

In diesen Experimenten wurden 5 $\mu$ g pGL3b-HBV bcp - Konstrukt und 5 $\mu$ g der Test - Kontrollen unterschiedlicher Promotoren und Leserahmenlänge (pcDNA3.1, SV40-ORF2, SV40-ORF3) oder das pSV40-HCVCore 1a Konstrukt kotransfiziert. Die Aktivität des HBV basalen Kapsidgenpromotors (bcp) wurde gemessen und

<sup>1</sup>Der zellbiologisch unspezifische Effekt ist eine Hypothese dieser Arbeit, die besagt, dass allein durch die Gegenwart und Aktivität artefiziell eingebrachter viraler Promotoren Zellressourcen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerasen, Nukleotide, die Translationsmaschinerie und t-RNA - Aminosäuren in unphysiologischem Ausmaß beansprucht werden. Dies kann sowohl von der Promotorstärke als auch von der Länge des durch den Promotor gesteuerten Gens abhängig sein.

als Parameter für den Einfluß des kotransfizierten Konstrukts gewertet. War das kotransfizierte Konstrukt eine Kontrolle, so wurde der Effekt als unspezifisch, bei pSV40-HCVCore 1a als spezifisch interpretiert.



**Abbildung 3.12:** Schematische Darstellung der Promotor-kompensierten Kontrollen. ORF2 und ORF3 kodieren für Nonsense-Proteine.

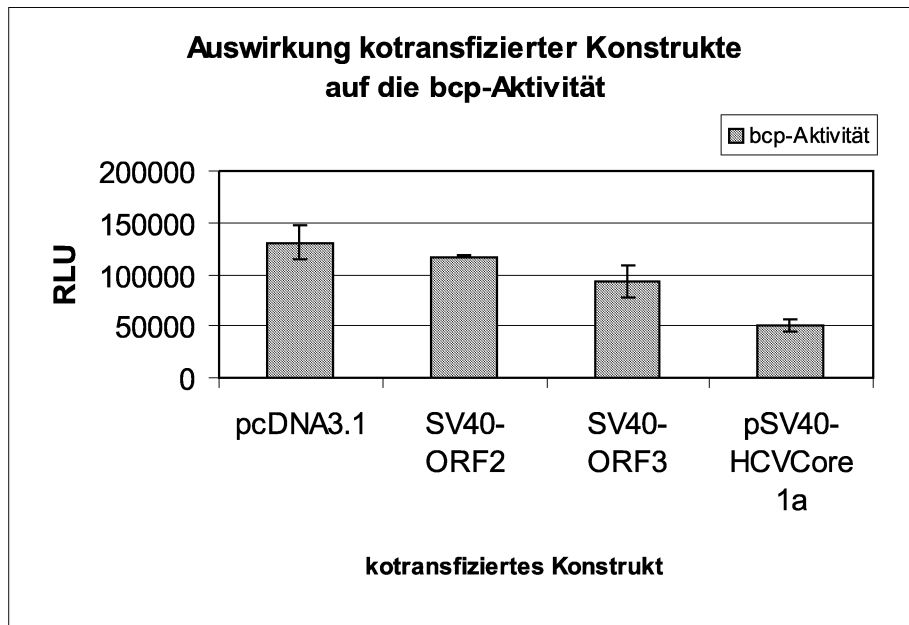
### 3.2.2.1.2 Ergebnis und Diskussion

Als Ergebnis (Abb. 3.13) der Untersuchung zur Abhängigkeit der bcp-Aktivität vom Promotor und von der Länge des Leserahmens des kotransfizierten Konstrukts konnte gezeigt werden, dass die bcp-Aktivität unter Kotransfektion mit dem Leervektor pcDNA3.1 (CMV-Promotor, Nonsenseprotein < 50AS) am höchsten war (=100%). Je länger nun das koexprimierte Protein war, desto geringer wurde die bcp-Aktivität. Dies verdeutlichen die Kotransfektionen mit SV40-ORF2 (SV40-Promotor, Nonsenseprotein mit 299 AS, bcp-Aktivität = 90%) und SV40-ORF3 (SV40-Promotor, Nonsenseprotein mit 467 AS, bcp-Aktivität = 70%).

Demgegenüber hebt sich die Reduktion der bcp-Aktivität auf 40% unter Koexpression mit pSV40-HCV Core 1a (SV40-Promotor, HCV Core Protein + partielles E1 mit 238 AS) deutlich von den Kontrollkonstrukten ab. Dieser Effekt wurde als spezifischer HCV Core - Effekt auf den HBV bcp gewertet.

Den Prämissen für die Interpretation der Ergebnisse folgend, muß die Einflußnahme auf die bcp-Aktivität durch die Test-Kontrollen als unspezifischer Effekt auf die zellulären Ressourcen gewertet werden. Daraus muß geschlossen werden, dass es nicht ausreicht, einen Leervektor (wie z.B. pcDNA3.1 oder pBluescript) als Kontrolle zu verwenden, da dieser die artefizielle Situation der Überexpression eines wesentlich

größeren Gens (z.B. HCV Core) nicht ausreichend kontrolliert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die HCV Core Expression durch Promotor-kompensierte, in der Leserahmenlänge übereinstimmende Nonsense-Protein - Konstrukte (z.B. ORF2-Konstrukte; in den folgenden Abschnitten beschrieben) kontrolliert.



**Abbildung 3.13:** Auswirkung der Expression von verschiedenen Nonsense-Proteinen und von HCV Core auf das pGL3b-HBV bcp - Konstrukt (bcp). Die Reduktion der bcp-Aktivität durch die Test-Kontrollen (Nonsense-Proteine) pcDNA3.1, SV40-ORF2 und SV40-ORF3 wurde als unspezifischer Effekt auf die Zellressourcen, die Wirkung des pSV40-HCV Core 1a - Konstruktes als spezifischer Effekt auf den bcp interpretiert.

### 3.2.2.2 Das Kontrollkonstrukt CMV-ORF2

Das CMV-ORF2 Konstrukt wurde aus dem Ausgangsplasmid CMV- $\beta$ Gal (siehe 2.3.3.2, S. 44) durch HincII-Verdau und Re-Ligation des CMV-Promotor- und Ampicillin-Resistenz-tragenden 4 kB großen Fragments kloniert. Das rekombinante Plasmid CMV-ORF2 exprimiert ein 298 AS langes Nonsense-Protein (ORF2) und diente als Kontrolle für Experimente mit pcDNA3-HCVCore 1a - und 1b - Konstrukten (Abb. 3.12).

### 3.2.2.3 Die Kontrollkonstrukte SV40-ORF2 und SV40-ORF3

Das SV40-ORF2 Konstrukt wurde aus dem Ausgangsplasmid SV40- $\beta$ Gal (siehe 2.3.3.2, S. 44) durch HincII-Verdau und Re-Ligation des SV40-Promotor- und Ampicillin-Resistenz-tragenden 3,7 kB großen Fragments kloniert. Das rekombinante Plasmid SV40-ORF2 exprimiert ein 299 AS langes Nonsense-Protein (ORF2) und diente als Kontrolle für Experimente mit dem pSV40-HCVCore 1a Konstrukt (Abb. 3.12).

Das SV40-ORF3 Konstrukt wurde aus dem Ausgangsplasmid SV40- $\beta$ Gal (siehe 2.3.3.2, S. 44) durch EcoRV- und Eco47III-Verdau und Re-Ligation des SV40-Promotor- und Ampicillin-Resistenz-tragenden 6 kB großen Fragments kloniert. Das rekombinante Plasmid SV40-ORF3 exprimiert ein 467 AS langes Nonsense-Protein (ORF3) und diente zur Demonstration des Leserahmenlängen-abhängigen unspezifischen Repressionseffektes auf die HBV Transkription (siehe Abb. 3.13, Abb. 3.12).

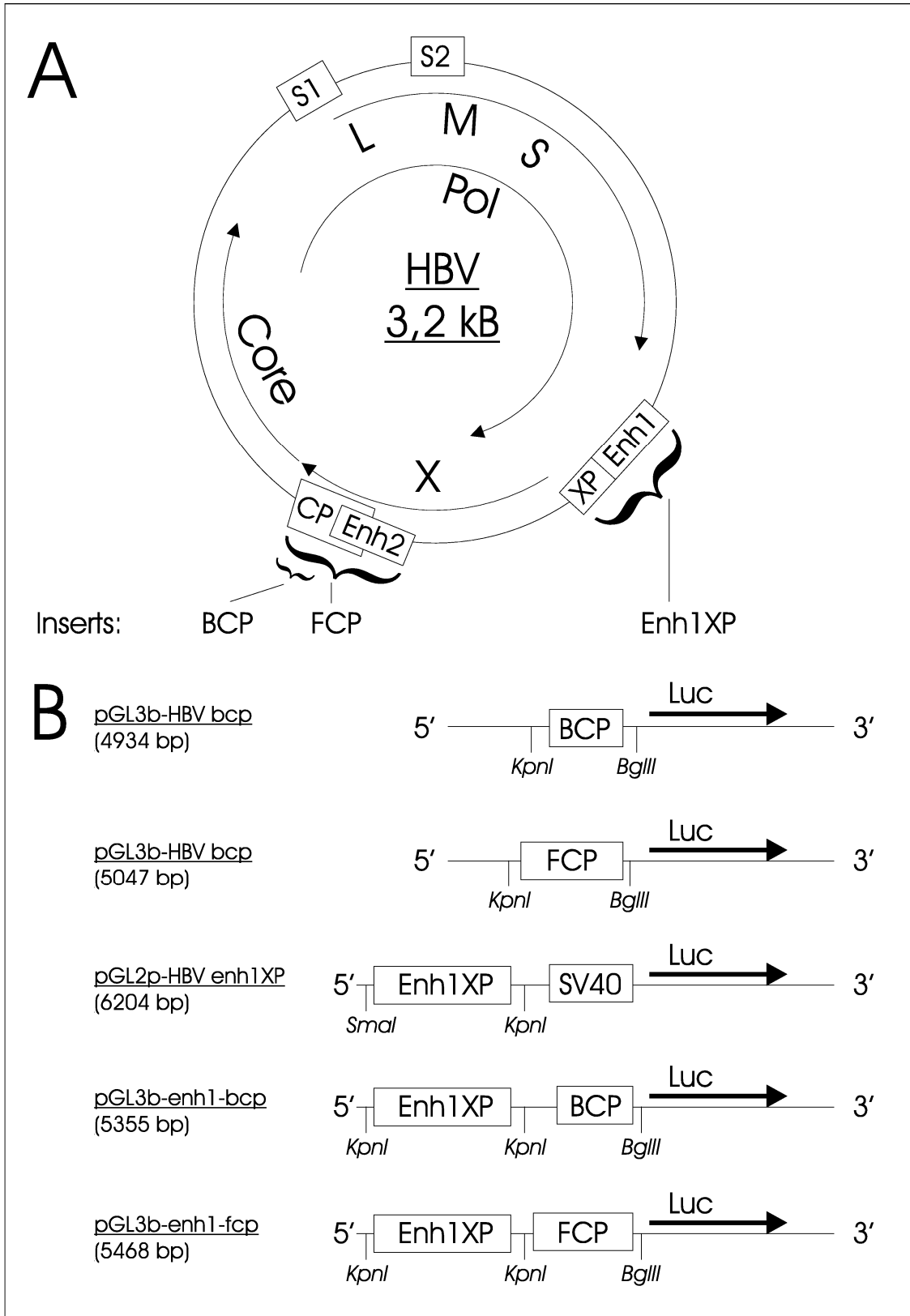
### 3.2.3 HBV-Reportergenkonstrukte für Luciferase-Reporter-Assays

Zur Untersuchung der regulatorischen Effekte des HCV Core Proteins auf die HBV Enhancer 1 und 2 und HBV Core Promotoren sind diese HBV-Elemente in die Luciferase-Reportervektoren pGL3-Basic (Präfix pGL3b-, Fa. Promega) und pGL2-Promotor (pGL2p-, Fa. Promega) kloniert worden. Die resultierenden Klone sind in Abb. 3.14 dargestellt.

#### 3.2.3.1 Das Reportergenkonstrukt des basalen HBV Core Promotors (pGL3b-HBV bcp)

Das Plasmid pGL3b-HBV bcp (kurz: bcp) wurde hergestellt, um die Regulation des basalen HBV Core Promotors (Core Promotor ohne den Enhancer 2, siehe Abb. 3.14) untersuchen zu können. Das Plasmid pGL3b-HBV bcp wurde durch PCR-Klonierung mit den Primern HBVbcp s und HBVbcp AS aus dem Ausgangsplasmid pHBV1.5 isoliert und über KpnI- und BglII-Schnittstellen in den Luciferase-Vektor pGL3-Basic (siehe 2.3, S. 41) eingefügt.





**Abbildung 3.14:** (A) Schematische Darstellung des HBV adw2 Genoms (Genotyp A) mit Leserahmen und regulatorischen Elementen (siehe auch Abb. 1.2, S. 14). (B) HBV-Reportergenkonstrukte. CP = Core Promotor, Enh = Enhancer, XP = X-Promotor, BCP = basic core promotor, FCP = full length core promotor.

### **3.2.3.2 Das Reportergenkonstrukt des Volllänge HBV Core Promotors (pGL3b-HBV fcp)**

Das Plasmid pGL3b-HBV fcp (kurz: fcp) reguliert die Expression der Firefly Luciferase durch den kompletten HBV Core Promotor (mit Enhancer 2, siehe Abb. 3.14). Die PCR-Klonierung des Plasmids pGL3b-HBV fcp erfolgte mittels der Primer HBVfcp s und HBVbcp AS aus pHBV1.5 und Integration des amplifizierten Fragments in pGL3-Basic (siehe 2.3, S. 41) über KpnI- und BglII-Schnittstellen.

### **3.2.3.3 Das Reportergenkonstrukt des HBV Enhancers 1 (pGL2p-HBV enh1XP)**

Im Plasmid pGL2p-HBV enh1XP (kurz: enh1XP) kontrolliert der HBV Enhancer 1 einen heterologen SV40-Promotor. Der Enhancer 1-SV40-Promotor - Verbund reguliert die Expression der Firefly-Luciferase (siehe Abb. 3.14). Hiermit sollte geprüft werden, inwieweit der HBV Enhancer 1 in seiner Aktivität durch das HCV Core Protein beeinträchtigt wird.

Das enh1XP-Fragment ist durch PCR-Klonierung aus pHBV1.5 mittels der Primer FP HBVenh1XP 2364 und RP HBVenh1XP 2774 über SmaI- und KpnI-Schnittstellen in den Vektor pGL2-Promotor (siehe 2.3, S. 41) eingefügt worden [19].

### **3.2.3.4 Die Reportergenkonstrukte pGL3b-enh1-bcp und pGL3b-enh1-fcp**

Mit den Kombinationskonstrukten pGL3b-enh1-bcp und pGL3b-enh1-fcp (kurz: enh1-bcp und enh1-fcp) sollte die native Anordnung der HBV Core Steuerelemente hergestellt werden (siehe Abb. 3.14). Dazu wurde das Fragment enh1XP durch PCR mit den Primern FP2 HBVenh1XP 2364 und RP HBVenh1XP 2774 gewonnen und über die KpnI - Schnittstelle in pGL3b-HBV bcp oder pGL3b-HBV fcp inkloniert. Die Wahrung der 5'-3' Orientierung wurde durch Sequenzierung des enh1-fcp- oder enh1-bcp- Übergangs überprüft.

## **3.3 Zeitliche Kinetik und Interferenz der Transkription von HBV Core RNA und HCV Core RNA**

### **3.3.1 Einleitung**

In bisher durchgeführten Experimenten zur HBV-Replikations-Repression durch HCV Core konnte gezeigt werden, dass die Repression der HBV-Transkription am 6. Tag post transfectionem (p.t.) am stärksten war [188]. Dieser Befund wurde mit einer möglichen Kernlokalisation des HCV Core Proteins zum 6. Tag p.t. in Zusammenhang gebracht [188].

Um die zeitlich auf den 6. Tag p.t. determinierte HBV-Repression zu überprüfen, wurde in Experimenten die Transkription der HBV Core RNA in HCV Core - transfizierten HepG2.2.15-Zellen (siehe 2.6, S. 48) über mehrere Tage analysiert. Die Transkription des transfizierten pcDNA3-HCVCore 1a - Konstrukts wurde ebenfalls überwacht, um eine mögliche Interferenz von HBV und HCV detektieren zu können.

### **3.3.2 Durchführung**

Der Verlauf der Transkriptionsrate von HBV Core RNA und HCV Core RNA wurde mittels RT-qPCR in einer Langzeitbeobachtung (10 Tage) an HepG2.2.15 Zellen untersucht. Dazu wurden 5 $\mu$ g pcDNA3-HCVCore 1a in HepG2.2.15 Zellen transfiziert (siehe 2.8.2, S. 57). Die Gesamt - RNA wurde aus den transfizierten Zellen an den in den Grafiken (Abb. 3.15, 3.16) markierten Zeitpunkten isoliert (siehe 2.10, S. 60) und mittels ATS-, HBV Core- und HCV Core - RT-qPCR (siehe 3.1, S. 79) vermessen.

Das Experiment wurde mit anderen Zeitabständen wiederholt (siehe hierzu Experiment 2).

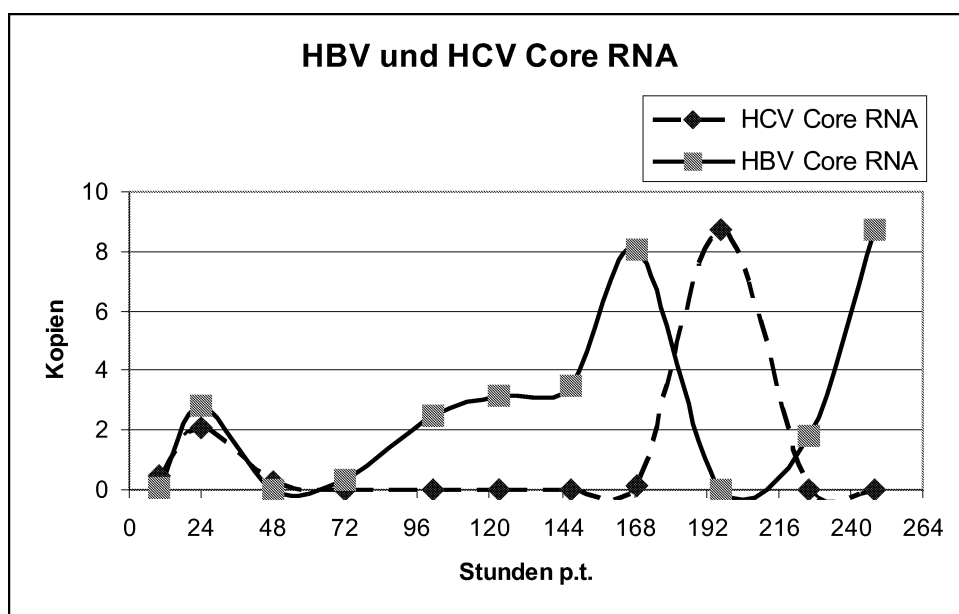
### **3.3.3 Ergebnisse**

#### **3.3.3.1 Langzeitexperiment 1: Beobachtung über 250 Stunden (ca. 10 Tage)**

Die Untersuchungen zur zeitlichen Kinetik der Transkription des pcDNA3-HCV Core 1a - Konstruktes in HepG2.2.15 - Zellen haben gezeigt, dass die Produktion der HCV

Core RNA 24 Stunden p.t. ein erstes Maximum erreichte und bis 48 Stunden p.t. wieder auf die Nachweisgrenze abfiel (Abb. 3.15). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Expression der HBV Core RNA analog zur HCV Core RNA verhielt und ebenfalls bei 24 Stunden p.t. ein erstes Maximum und bei 48 Stunden p.t. ein folgendes Minimum aufwies (Abb. 3.15).

In den folgenden Tagen (48 Stunden bis 168 Stunden p.t.) zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der HBV Core Transkription, wobei die HCV Core Expression auf der Nachweisgrenze reprimiert blieb (Abb. 3.15). Danach (194 Stunden p.t.) kam es zum sprunghaften Anstieg der HCV Core Transkription auf das Vierfache des ersten Expressionsmaximums. Gleichzeitig wurde die HBV Core Expression bis zur Nachweisgrenze reprimiert (Abb. 3.15). Nach diesem zweiten Maximum fiel die HCV Core Transkription wieder auf die Nachweisgrenze ab und HBV Core RNA wurde wieder vermehrt detektiert (Abb. 3.15, 220 Stunden p.t. und 250 Stunden p.t.).

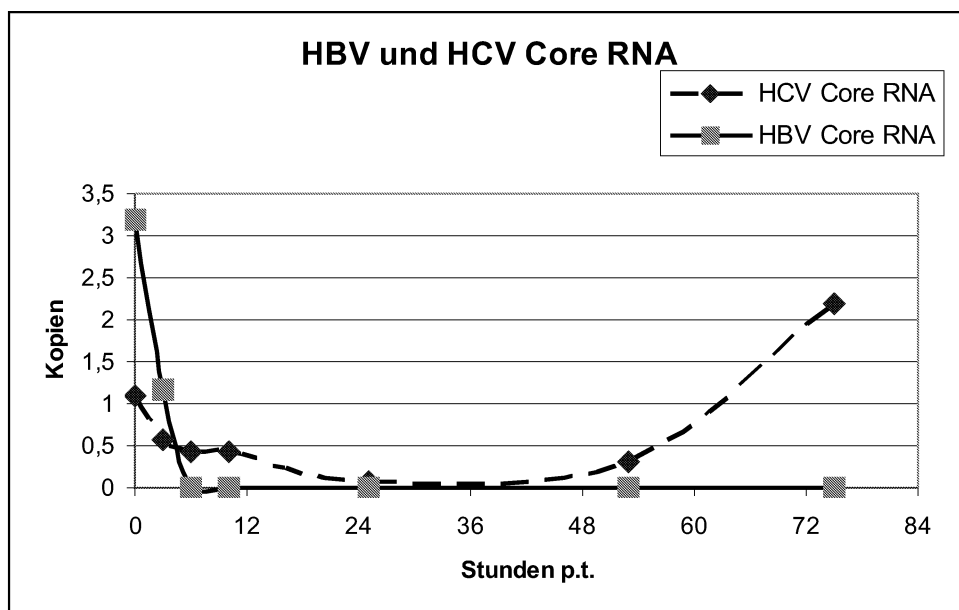


**Abbildung 3.15:** Langzeitexperiment 1. Darstellung der Transkriptionsrate von HBV Core RNA und HCV Core RNA. Die Kopienzahlen von HCV Core RNA wurden mit 1000, die von HBV Core RNA mit 10 multipliziert, um eine vergleichbare Darstellung aufzuzeigen.

### 3.3.3.2 Langzeitexperiment 2: Fokus auf die ersten 12 Stunden p.t. und Beobachtung bis 74 Stunden p.t.

Um die Befunde aus der ersten Langzeitbeobachtung zu validieren, wurde eine zweite Beobachtung mit häufigerer Messung (Fokus) in den ersten 12 Stunden p.t. durchgeführt. Bei diesem Experiment zeigte sich, dass bereits bei 0 Stunden p.t. eine maximale Transkription von HBV Core RNA und HCV Core RNA erfolgte (Abb. 3.16). Diese hohe Expressionsleistung nahm aber in den ersten 12 Stunden p.t. kontinuierlich ab und erreichte bei 24 Stunden p.t. ein Minimum. Dabei konnte gezeigt werden, dass die HBV Core Expression schneller reprimiert wurde als die HCV Core Expression (Abb. 3.16).

Im weiteren Verlauf des Experiments wurde beobachtet, dass ab einem Zeitpunkt von 50 Stunden p.t. die Transkription der HCV Core RNA langsam wieder anstieg und am Analyseende (74 Stunden p.t.) ein Maximum vom Doppelten des 0-Stunden - Wertes erreichte. Die HBV Core Expression blieb weiterhin auf Nachweisgrenze reprimiert (Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16:** Langzeitexperiment 2. Darstellung der Transkriptionsrate von HBV Core RNA und HCV Core RNA mit einem Fokus auf die ersten 12 Stunden p.t.

### 3.3.4 Diskussion

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass sowohl HBV Core RNA als auch HCV Core RNA in den transfizierten HepG2.2.15-Zellen transkribiert werden.

Die HCV Core RNA war spätestens am 2. Tag p.t. auf ein Minimum abgesunken und hatte einen 2. Gipfel an Tag 3 oder 8 p.t. Dieser zweite Gipfel überstieg die initiale Expression bei weitem. Der Grund für diese Oszillation könnte ein negatives Feedback von HCV Core auf den CMV-Promotor in pcDNA3-HCVCore 1a sein (siehe 3.2.1.5, S. 92 und 3.6, S. 108). Daraus läßt sich folgern:

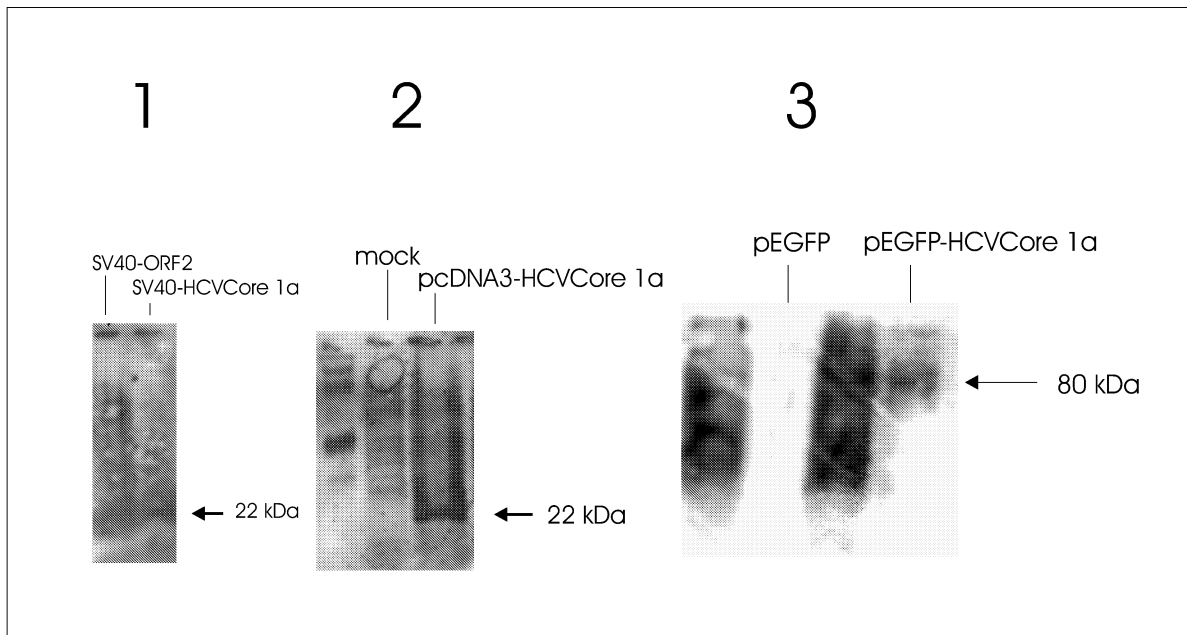
- Das transfizierte HCV Core Gen wird transkribiert und das HCV Core Protein akkumuliert bis zum Tag 2 p.t.
- Ab diesem Zeitpunkt folgt die Repression des CMV-Promotors (negative Rückkopplung) und damit der Rückgang der HCV Core - Transkription.
- Die Degradation des HCV Core Proteins erfolgt.
- Dadurch kommt es zur Aufhebung der CMV-Repression und erneutem Anstieg der HCV Core RNA (zwischen Tag 3 und 8 p.t.).

Die HBV Core RNA blieb nach einem initialen Anstieg am ersten Tag p.t. und danach folgendem Abfall bis zum Tag 3 p.t. reprimiert (siehe Abb. 3.15, Abb. 3.16). Danach konnte wieder vermehrt HBV Core RNA gemessen werden. Der zweite HCV Core RNA Gipfel war in der Lage, die gerade angestiegene HBV Core Transkription erneut zu blockieren (siehe Abb. 3.15).

Damit konnte die Repression der HBV Core Transkription durch die Expression des HCV Core Proteins gezeigt werden. Diese findet nicht erst ab Tag 6 p.t. (siehe [188]), sondern bereits in einer initialen Phase statt und kann zu beliebigen Zeitpunkten wiederholt werden.

Wodurch es zu den zeitlichen Schwankungen (zweiter Gipfel zwischen Tag 3 und 8 p.t.) in der HCV Core Expression kommt, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

.....



**Abbildung 3.17:** Western Blot Analysen der HCV Core Konstrukte. (1) HCV Core Protein des pSV40-HCVCore 1a Konstruktes (bei 22 kDa), (2) HCV Core Protein des pcDNA3-HCVCore 1a Konstruktes (bei 22 kDa), mock = Lysat untransfizierter Zellen, (3) EGFP-HCV Core - Fusionsprotein des EGFP-HCVCore 1a Konstruktes (bei 80 kDa).

## 3.4 Expressionsnachweis von HCV Core durch Western Blot Analyse

### 3.4.1 Einleitung

Mittels Western Blot Analysen sollte die Expression des HCV Core Proteins aus den neu generierten Konstrukten pcDNA3-HCVCore 1a, pSV40-HCVCore 1a und pEGFP-HCVCore 1a nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Durchführung

HuH7 Zellen wurden nach Protokoll (siehe 2.8.2, S. 57) mit 20 $\mu$ g Plasmid-DNA pSV40-HCV Core 1a, pcDNA3-HCV Core 1a oder pEGFP-HCV Core 1a transfiziert. Am 4. Tag p.t. erfolgten die Zell-Lyse, SDS-PAGE und Western Blot Analyse (siehe 2.16, S. 68).

### 3.4.3 Ergebnis

Abb. 3.17 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analysen. In allen Konstrukten erschienen spezifische, durch den anti-HCV Core Antikörper detektierbare Banden, die in den jeweiligen Negativkontrollen (SV40-ORF2, mock oder pEGFP) nicht nachweisbar waren. Für pSV40-HCV Core 1a und pcDNA3-HCV Core 1a wurde eine Bande bei etwa 22 kDa nachgewiesen, was der beschriebenen Größe des HCV Core Proteins entspricht [142]. Das EGFP-HCV Core 1a Fusionsprotein stellte sich bei etwa 80 kDa dar.

## 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 3.5.1 Intrazelluläre Lokalisation von HCV Core

#### 3.5.1.1 Einleitung und Durchführung

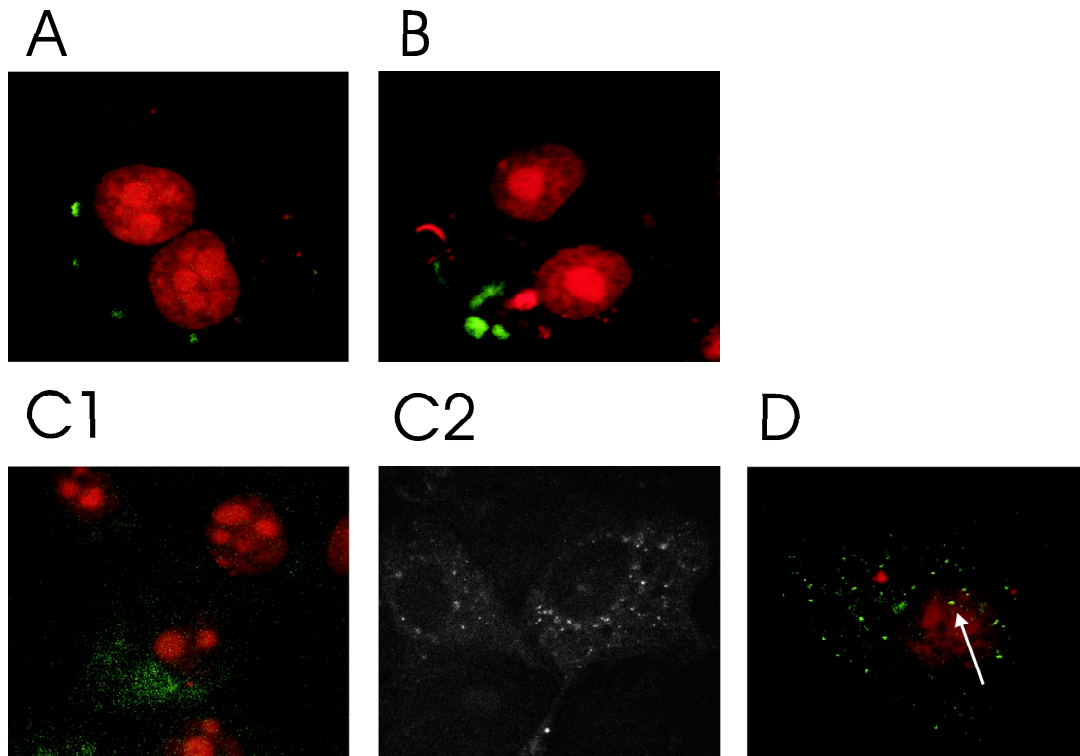
Die Lokalisation des nativen HCV Core wird kontrovers diskutiert [178, 150, 188]. In diesem Experiment sollte untersucht werden, in welchem zellulären Kompartiment (Zellkern oder Zytoplasma) sich das EGFP-HCV Core 1a Protein (siehe 3.2.1, S. 90) befindet. Zum einen wurde eine mögliche Kernlokalisation des EGFP-HCV Core 1a - Fusionsproteins in Abhängigkeit der Expressionsdauer hinterfragt, zum anderen im Zusammenhang mit der Kotransfektion mit HBV Plasmiden untersucht (siehe 2.17, S. 71).

#### 3.5.1.2 Ergebnis

In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse des 3. Tages p.t. dargestellt. Zusätzlich wurden transfizierte Zellen an den Tagen 6 und 9 p.t. mikroskopiert (Bilder nicht gezeigt). Unter morphologischen Gesichtspunkten und in der Lokalisation unterschieden sich die EGFP- (Negativkontrolle) und EGFP-HCVCore - Bilder an den drei genannten Zeitpunkten nicht.

In den Untersuchungen zur Lokalisation des EGFP-HCV Core 1a - Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass das EGFP-HCV Core 1a - Fusionsprotein nahezu ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 3.18, C1). Dabei fiel eine perinukleäre Anreicherung auf (Abb. 3.18, C2). Diese Verteilung konnte in fast allen Zellen beobachtet werden.





**Abbildung 3.18:** Intrazelluläre Lokalisation von EGFP-HCV Core am 3. Tag post transfectionem. HuH7-Zellen, die mit den Negativkontrollen (A) pEGFP-C2 und (B) pEGFP-C2 + pHBV1.5 transfiziert wurden, zeigen Propidiumjodid-gefärbte Zellkerne (rot) und die grüne Fluoreszenz des EGFP-Proteins im Zytoplasma. Wurden die HuH7-Zellen mit pEGFP-HCV Core 1a transfiziert, so stellte sich das EGFP-HCV Core 1a - Fusionsprotein auch zytoplasmatisch dar (C1, grün), jedoch mit perinukleärer Anreicherung (C2, zum besseren Kontrast nur grüner Kanal dargestellt). Unter Kotransfektionsbedingungen des pEGFP-HCV Core 1a - Konstruktes mit dem pHBV1.5-Plasmid konnte eine intranukleäre Lokalisation des EGFP-HCV Core 1a - Proteins (Pfeil) gesichert werden (D). 100x Vergrößerung.

Auch unter Kotransfektion des pEGFP-HCV Core 1a - Konstruktes mit dem pHBV1.5-Plasmid konnte die nahezu ausschließliche zytoplasmatische Verteilung mit perinukleärer Anreicherung des EGFP-HCV Core 1a - Fusionsproteins beobachtet werden. Allerdings konnte in wenigen Fällen eine intranukleäre Lokalisation des EGFP-HCV Core 1a - Fusionsproteins festgestellt werden (Abb. 3.18, D). Die Lage innerhalb des Zellkerns wurde mittels 3D-konfokaler Durchsichtung des Präparates gesichert.

Das als Negativkontrolle verwendete EGFP-Protein zeigte eine zytoplasmatische Verteilung ohne perinukleäre Anreicherung (Abb. 3.18, A). Daran änderte auch eine Kotransfektion mit dem pHBV1.5-Plasmid nichts (Abb. 3.18, B).

### 3.5.1.3 Diskussion

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass das EGFP-HCV Core 1a Fusionsprotein nahezu ausschließlich zytoplasmatisch, vorwiegend perinukleär lokalisiert ist. Dies wird durch Ergebnisse aus der Literatur bestätigt [178, 150]. Intranukleäre Lokalisationen konnten beobachtet werden, waren jedoch ein seltenes Ereignis. Dies widerspricht Shih et al. [188], die eine intranukleäre Anreicherung am 6. Tag p.t. beschreiben.

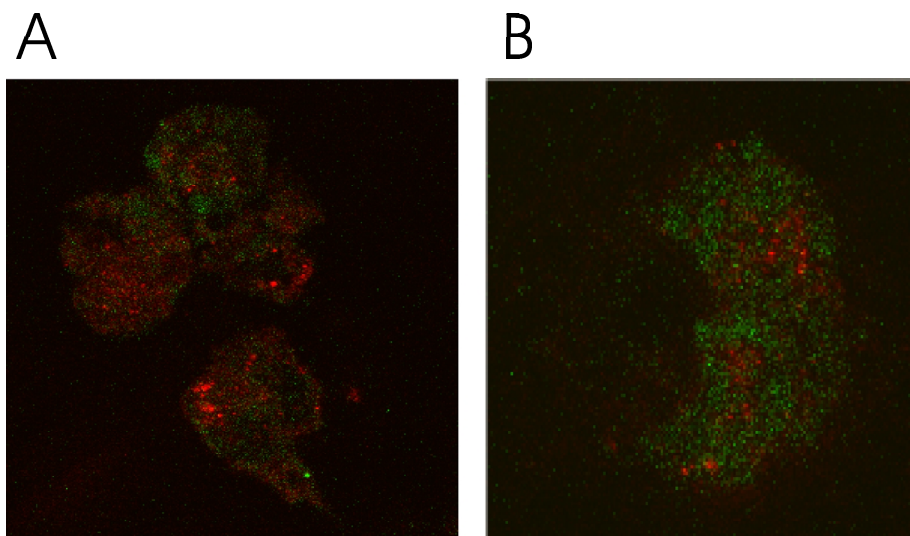
Die in diesen Experimenten selten nachweisbare intranukleäre Lokalisation des EGFP-HCV Core Fusionsproteins kann mehrere Gründe haben:

- Das EGFP-HCV Core 1a Fusionsprotein ist zu groß (80 kDa, siehe 3.4, S. 103), um in quantitativ bedeutsamen Mengen passiv durch die Kernporen-Komplexe in den Zellkern zu diffundieren. Eine passive Kerndiffusion wird für Moleküle mit einer Größe von  $< 60$  kDa beschrieben [219].
- Dies würde bedeuten, dass intranukleäre Formen des EGFP-HCV Core Fusionsproteins nur durch aktiven Kerntransport zustande kämen. Hierbei spielen möglicherweise Proteinmodifikationen (z.B. Phosphorylierung) eine Rolle, die durch den EGFP-Teil des Fusionsproteins gestört sind. Andererseits könnte es sein, dass durch intranukleäre Konformationsänderung (siehe 1.2.4, S. 25) das EGFP-HCV Core 1a Fusionsprotein nicht mehr ausreichend fluoresziert.

## 3.5.2 Kolokalisation von HBV und EGFP-HCV Core

### 3.5.2.1 Einleitung und Durchführung

In Experimenten zur HBV-Replikationskontrolle durch das HCV Core Protein konnte mittels biochemischer Methoden (Bindungsstudien) gezeigt werden, dass das HCV Core Protein mit der HBV Polymerase und dem HBV X-Protein direkt interagiert (siehe 1.3.3.6, S. 34, [29]). In diesem Experiment sollte mittels 3D-konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob das EGFP-HCV Core 1a Fusionsprotein und das HBV Core Protein an den gleichen Orten in der Zelle kolokalisieren und miteinander assoziieren. Die Durchführung erfolgte nach der Beschreibung in 2.17 (S. 71).



**Abbildung 3.19:** Kolokalisation von HBV Kapsiden (rot) und (A) EGFP sowie (B) EGFP-HCV Core 1a (grün). Die Zellkerne sind nicht angefärbt. 100x Vergrößerung

### 3.5.2.2 Ergebnis und Diskussion

In den Untersuchungen zur fluoreszenzmikroskopischen Kolokalisation von HBV Kapsiden und dem EGFP-HCV Core 1a - Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass sich HBV Core Protein diffus im zytoplasmatischen Raum transfizierter Zellen verteilt (Abb. 3.19, A und B, rot). Weder die kotransfizierte Negativkontrolle pEGFP-C2 (Abb. 3.19, A, grün) noch die Expression des kotransfizierten pEGFP-HCV Core 1a-Konstrukts (Abb. 3.19, B, grün) änderten den mikroskopischen Aspekt der Verteilung des HBV Core Proteins. Die schon in 3.5.1 beschriebene perinukleäre Anreicherung des EGFP-HCV Core 1a - Fusionsproteins konnte auch in diesem Experiment beobachtet werden (Abb. 3.19, B, grün).

Die Analyse der Kolokalisation von HBV Kapsiden mit dem EGFP-HCV Core 1a - Fusionsprotein ergab, dass sich die Verteilung der HBV Kapside unter der Kotransfektion mit dem pEGFP-HCV Core 1a Konstrukt nicht ändert. Außerdem konnte keine Assoziation des EGFP-HCV Core 1a Proteins mit dem HBV Core Protein nachgewiesen werden. Für eine eingehendere Klärung der Frage nach einer Komplexbildung des HCV Core Proteins mit Strukturelementen von HBV bedarf es weiterer Untersuchungen, insbesondere der Elektronenmikroskopie.

.....

## 3.6 Untersuchungen zur Interferenz von HCV Core mit CMV-, SV40- und RSV- Promotoren

### 3.6.1 Einleitung

Zur Standardisierung von Luciferaseexperimenten wurden in dieser Arbeit  $\beta$ -Galactosidase-Konstrukte eingesetzt (siehe 2.3.3.2, S. 44). Die Expression der  $\beta$ -Galactosidase steht in diesen Konstrukten unter der Kontrolle der viralen Promotoren des CMV, SV40 oder RSV. Da für diese Promotoren eine regulierende Aktivität durch HCV Core beschrieben ist [172], mußte in Voruntersuchungen das für die Standardisierung der Luciferaseexperimente geeignete  $\beta$ -Galactosidase-Konstrukt identifiziert werden. Dabei galt das Konstrukt als geeignet, bei dem sich unter Kotransfektion mit dem pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt die geringste Aktivitätsänderung der  $\beta$ -Galactosidase gegenüber der Negativkontrolle (pcDNA3.1) zeigte.

### 3.6.2 Durchführung der Interferenzuntersuchungen

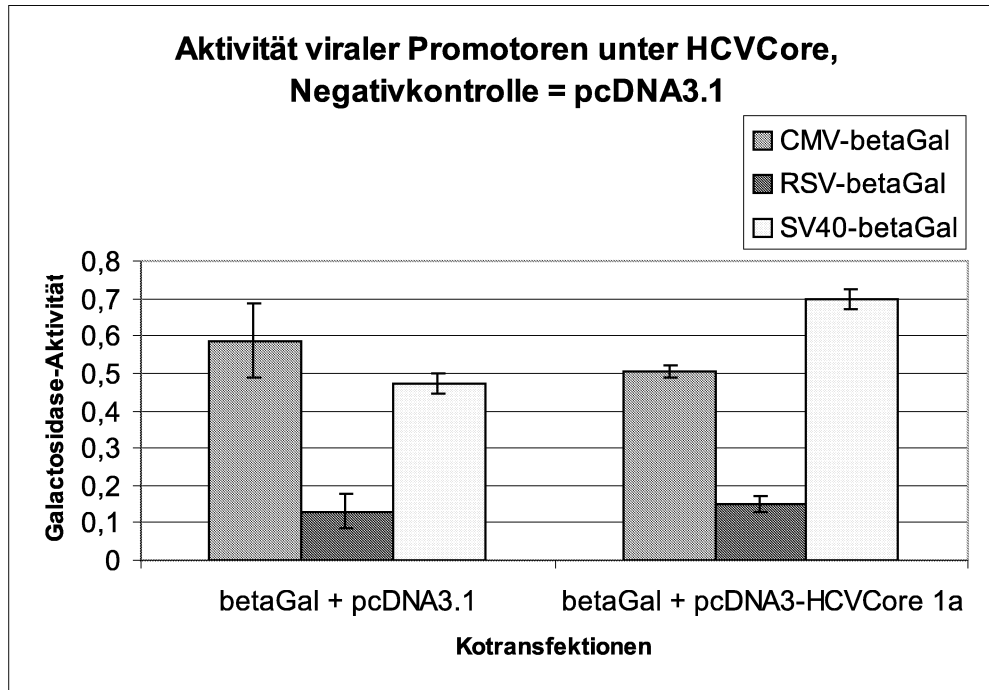
HuH7-Zellen wurden mit  $5\mu\text{g}$   $\beta$ -Galactosidase-Konstrukt (CMV- $\beta$ Gal, SV40- $\beta$ Gal oder RSV- $\beta$ Gal) und mit  $5\mu\text{g}$  pcDNA3-HCVCORE 1a oder der Negativkontrolle pcDNA3.1 kotransfiziert (siehe 2.8.2, S. 57). Nach 3 Tagen wurde die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität mit dem ONPG-Assay (siehe 2.9, S. 58) gemessen.

### 3.6.3 Ergebnis der Interferenzuntersuchungen

Die Untersuchungen zum Einfluß des HCV Core Proteins auf die viralen Promotoren CMV, SV40 und RSV zeigten, dass die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität des CMV- $\beta$ Gal - Konstruktes unter Kotransfektion mit dem pcDNA3-HCVCORE 1a - Konstrukt auf 80% der Aktivität der Negativkontrolle (Kotransfektion mit pcDNA3.1) reprimiert wurde (Abb. 3.20, CMV-betaGal).

Demgegenüber stellte sich bei Kotransfektion des SV40- $\beta$ Gal-Konstruktes mit pcDNA3-HCV Core 1a eine Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität auf das 1,4-fache, verglichen mit der Negativkontrolle dar (Abb. 3.20, SV40- $\beta$ Gal).

Bei Kotransfektion des RSV- $\beta$ Gal - Konstruktes mit pcDNA3-HCV Core 1a war, verglichen mit der Negativkontrolle, keine signifikante Änderung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität zu registrieren (Abb. 3.20, RSV-betaGal).



**Abbildung 3.20:** Regulation von CMV-, SV40- und RSV-Promotoren durch HCV Core Expression. Dargestellt ist die Änderung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität der verschiedenen  $\beta$ -Galactosidase-Konstrukte unter Kotransfektion mit pcDNA3.1 (Negativkontrolle) und pcDNA3-HCVCore 1a.

### 3.6.4 Diskussion

Mit den Untersuchungen zur Interferenz des HCV Core Proteins mit den viralen Promotoren CMV, SV40 und RSV konnte gezeigt werden, dass der CMV-Promotor in seiner Aktivität reprimiert und der SV40-Promotor verstärkt wurden. Der RSV-Promotor hingegen blieb in seiner Aktivität unter Kotransfektion mit dem pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt weitgehend konstant, so dass in den folgenden Luciferaseexperimenten das RSV- $\beta$ Gal - Plasmid als Standardisierungskonstrukt verwendet wurde.

Weiterhin bestätigte dieses Experiment die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.2.1.5 (S. 92) und 3.3 (S. 99) sowie Untersuchungen von Ray et al. [172].

## 3.7 Messung der HBV Core Promotor und Enhancer Aktivitäten

### 3.7.1 Einleitung

In den Experimenten zur Regulation der Aktivität der HBV Core Promotor - und Enhancer - Elemente sollten die klonierten HBV Core Promotor - und Enhancer - Reportergergenkonstrukte (siehe 3.14, S. 97) untersucht werden. Weiterhin sollte demonstriert werden, um welchen Faktor der HBV Enhancer 1 die Aktivität der HBV Core Promotoren bcp und fcp zu verstärken vermag.

### 3.7.2 Durchführung der vergleichenden Aktivitätsmessung

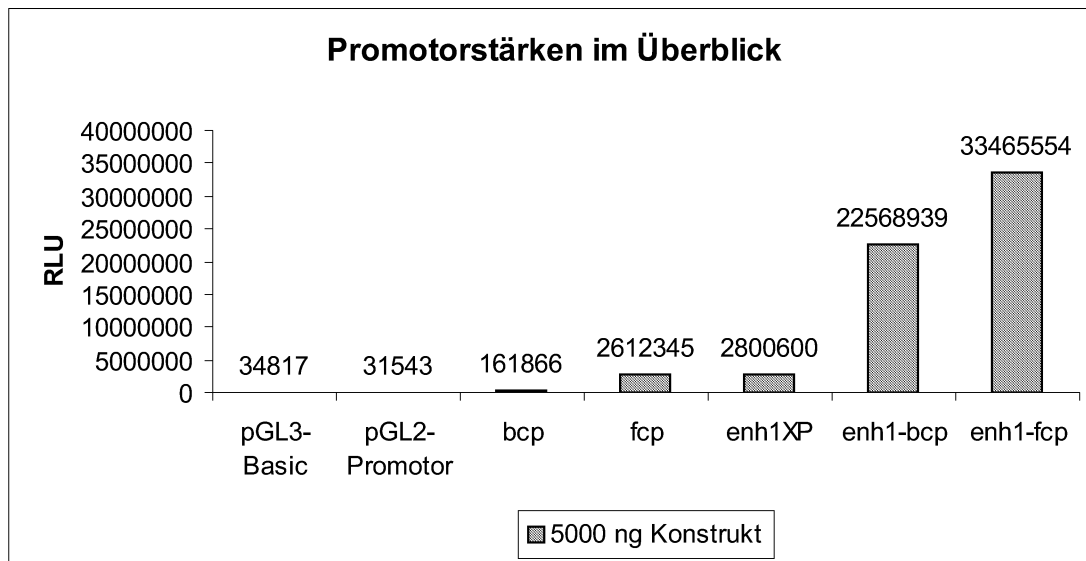
Um die Stärke der einzelnen HBV Steuerelemente miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils  $5\mu\text{g}$  der in 3.14 (S. 97) beschriebenen HBV Luciferase - Reportergergenkonstrukte mit  $1\mu\text{g}$  SV40- $\beta\text{Gal}$  - Plasmid (siehe 2.3, S. 41) in HuH7-Zellen kotransfiziert (siehe 2.8.2, S. 57).

Am dritten Tag post transfectionem (p.t.) wurden die Zellen lysiert und die Promotoraktivitäten mittels der Luciferase- und  $\beta\text{Gal}$ -Aktivitäts - Analyse bestimmt (siehe 2.9, S. 58). Das Ergebnis der Luciferase-Aktivität wurde gegen den  $\beta\text{Gal}$ -Wert standardisiert (siehe 2.9.5, S. 60)

### 3.7.3 Ergebnis der vergleichenden Aktivitätsmessung

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der basale HBV Core Promotor (bcp) eine Grundaktivität von ca. 162.000 RLU besaß (Abb. 3.21, enh1-fcp). Die zusätzliche Einklonierung des HBV Enhancer 1 vor das bcp-Element vermochte die Expressionsrate des Reportergens Luciferase und damit die bcp-Aktivität um das 140-fache zu verstärken (Abb. 3.21, enh1-bcp).

Die vergleichende Analyse der beiden HBV Core Promotorkonstrukte bcp und fcp (Volllänge Core Promotor) ergab eine Zunahme der Aktivität um das 16-fache gegenüber dem bcp (Abb. 3.21, fcp). Die zusätzliche Einklonierung des Enhancer 1 vor das fcp-Element erzielte eine 13-fache Verstärkung dessen Aktivität im Vergleich zum fcp ohne Enh1-Modul (Abb. 3.21, enh1-fcp und fcp). Der Aktivitätsunterschied zwischen enh1-fcp und enh1-bcp betrug etwa 1,5:1 (Abb. 3.21, enh1-fcp und enh1-bcp).



**Abbildung 3.21:** Vergleich der unterschiedlichen Grundaktivitäten der HBV Core Enhancer und Promotoren (jeweils 5  $\mu$ g Konstrukt) im Luciferase-Assay. Die Abkürzungen beziehen sich auf die in 3.14 (S. 97) beschriebenen Konstrukte. RLU = relative Lichtemission.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Aktivität des SV40-Promotors im pGL2-Promotor Konstrukt durch Einklonierung des Enhancer 1 (enh1XP) eine etwa 90-fache Verstärkung erfuhr (Abb. 3.21, enh1XP).

Das „Hintergrundrauschen“ des nicht-regulierten Luciferasekonstrukts pGL3-Basic und des SV40-Promotor-tragenden Luciferasekonstrukts pGL2-Promotor war mit Werten zwischen 35.000 und 31.000 RLU vernachlässigbar gering (Abb. 3.21, pGL3-Basic und pGL2-Promotor).

### 3.7.4 Diskussion der vergleichenden Aktivitätsmessung

Die vergleichenden Aktivitätsmessungen der HBV Core Promotor und Enhancer Reportergerkonstrukte haben gezeigt, dass

- die HBV Core Promotoren bcp und fcp die Expression des Reportergens Luciferase in unterschiedlichem Ausmaß verstärken können,
- eine zusätzliche Einklonierung des HBV Enhancer 1 in diese Konstrukte eine 1,5- bis 13-fache Steigerung (abhängig vom Promotor) der Promotoraktivität hervorruft und

- der HBV Enhancer 1 den heterologen SV40-Promotor in seiner Aktivität verstärken kann.

Der Verstärkungseffekt des HBV Enhancer 1 auf den HBV Core Promotor ist in Anwesenheit des Enhancer 2 (fcp-Konstrukt) schwächer als in Abwesenheit (bcp-Konstrukt). Dies erklärt sich möglicherweise dadurch, dass der HBV Enhancer 2 ein negativ regulatorisches Element (NRE, siehe 1.1.4, S. 16) enthält, das eine allzu exzessive Expressionssteigerung der nachgeschalteten Gene verhindert.

Für die Kotransfektionsexperimente mit HCV Core bedeutet dies, dass aus den Effekten des HCV Core Proteins auf die einzelnen regulatorischen HBV-Elemente (Enhancer 1, basaler Core Promotor (bcp), Enhancer 2 - Core Promotor (fcp)) nicht automatisch die Effekte auf den gesamten regulatorischen Verbund Enhancer 1 – Enhancer 2 – Core Promotor (enh1-fcp) berechnet werden können.

Dies illustriert auch, wie modellhaft und mit Artefakten beladen unsere Vorstellungen von der HBV Replikationsregulation bleiben, wenn wir uns auf die Untersuchung der Einzelemente beschränken und die Analyse des kompletten replikativen Systems sowie die rechnerische Integration aller Ergebnisse (siehe den abschließenden Abschnitt 3.14, S. 139) unterlassen.

In den bisherigen Kapiteln wurden die Instrumente für eine Analyse der HCV Core Effekte am replikativen und nicht-replikativen HBV - System vorgestellt. Es folgen nun die Ergebnisse aus den Einzeluntersuchungen der HBV Replikation und deren schrittweise Integration in das Gesamtbild der HCV Core - medierten HBV Replikationskontrolle.

## **3.8 Einfluß des HCV Core Proteins auf die HBV Core Transkription: Luciferaseexperimente**

### **3.8.1 Einleitung**

Klinische und serologische Daten zeigen, dass die HBV Replikation, insbesondere die Produktion der HBV Antigene (HBsAg, HBeAg) durch die Koinfektion mit HCV beeinträchtigt wird (siehe 1.3.3, S. 32, [146, 166, 205, 56, 65]).

Der Mechanismus der HBV-Replikationsrepression ist bisher unbekannt. Deshalb wurde mit den folgenden Untersuchungen der Einfluß des HCV Core Proteins auf



die Regulation der HBV Core Promotoraktivität analysiert. Das HBV Core Protein stellt ein Schlüsselement im HBV Replikationszyklus dar (siehe 1.1.3.2, S. 14).

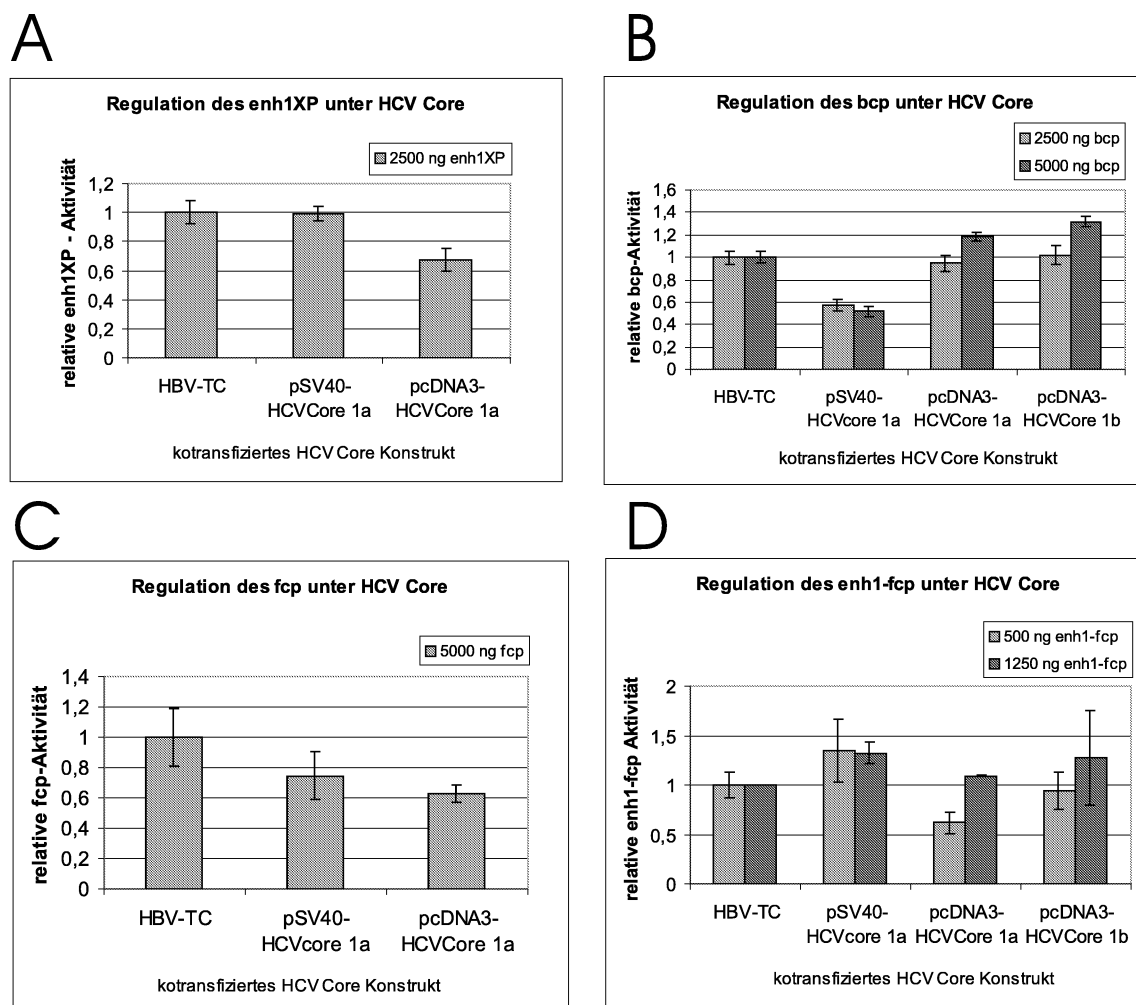
Die Steuerung der HBV Core Transkription erfolgt durch den Core Promotor und die beiden Enhancer 1 und 2 Elemente (siehe 1.1.4, S. 16). Die Änderung ihrer Aktivität unter Kotransfektion mit HCV Core Konstrukten wurde in diesem Experiment untersucht.

### **3.8.2 Durchführung der Luciferaseexperimente**

Der HBV Core Promotor und die Enhancer 1 und 2 Elemente wurden in Luciferase-Reporterengenvektoren kloniert (siehe 3.14, S. 97). Das zu untersuchende HBV Reporterengenkonstrukt wurde mit 5 $\mu$ g HCV Core - Konstrukt (pcDNA3-HCVCORE 1a, pcDNA3-HCVCORE 1b oder pSV40-HCVCORE 1a, siehe 3.2.1.5, S. 92) oder entsprechender Negativkontrolle (CMV-ORF2 oder SV40-ORF2) zusammen mit 1 $\mu$ g des RSV- $\beta$ Gal - Konstrukts in HuH7-Zellen kotransfiziert (siehe 2.8.3, S. 57).

Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass manche HBV Reporterengenkonstrukte über die Grenzen der Meßbarkeit exprimierten. Deshalb wurde der Versuchsaufbau optimiert und die Konzentrationen der HBV Reporterengenkonstrukte so gewählt, dass im linearen Meßbereich des Luminometers gemessen werden konnte.

Nach 3 Tagen wurden die Zellen dem Luciferase/lacZ-Assay zugeführt und ausgewertet (siehe 2.9, S. 58).



**Abbildung 3.22:** Regulation der HBV Reportergenkonstrukte (siehe 3.14, S. 97) unter Kotransfektion mit HCV Core Konstrukten: Enhancer 1 mit Teil des X-Promotors (A, enh1XP), basaler Core Promotor (B, bcp), Volllänge Core Promotor (C, fcp) und gesamter regulatorischer HBV Core Verbund: Enhancer 1 – Volllänge Core Promotor (D, enh1-fcp). HBV-TC = Promotorkompensierte HBV-Kontrolle; zur Berechnung der relativen Aktivität siehe 2.9.5, S. 60.

### 3.8.3 Ergebnisse der Luciferaseexperimente

#### 3.8.3.1 Einfluß von HCV Core auf den HBV Enhancer 1

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass das HCV Core Protein den HBV Enhancer 1 reprimiert [186]. Dies konnte in eigenen Experimenten bestätigt werden (Abb. 3.22, A). Besonders deutlich zeigte sich die Repression (auf 70% des Ausgangswertes) unter dem niedrig exprimierenden pcDNA3-HCVCore 1a Konstrukt.

	pSV40-HCVCORE 1a	pcDNA3-HCVCORE 1a	pcDNA3-HCVCORE 1b
enh1XP	↓	↓↓	-
bcp	↓	↔ - (↑)	↔ - (↑)
fcp	↓	↓↓	-
enh1-fcp	↑	↓ - ↔	↔ - ↑

**Tabelle 3.5:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Luciferaseexperimente. ↓ = Repression, ↑ = Steigerung der Expression, ↔ = kein nachweisbarer Einfluß auf die Expression.

Bedingt durch das Konstruktionsprinzip des HBV enh1XP - Reportergenvektors (enh1XP—SV40-Promotor— $\overrightarrow{Luc}$ , siehe 3.14, S. 97) ergeben sich folgende Schlußfolgerungen zu den Daten:

- Das HCV Core Protein verstärkt die Aktivität des SV40-Promotors im HBV enh1XP Konstrukt (siehe 3.6, S. 108).
- Diese Verstärkung wird durch eine negative Regulation (Repression) des vorgeschalteten Enh1-Moduls durch das HCV Core Protein maskiert, so dass das Ergebnis einen Wert von 1 ergibt.

### 3.8.3.2 Einfluß von HCV Core auf den HBV Core Promotor

Die Untersuchungen zum Einfluß des HCV Core Proteins auf die Aktivität des basalen Core Promotors (bcp) ergaben eine 60%ige Repression durch das pSV40-HCVCORE 1a Konstrukt im Vergleich zur Regulation der HBV-Kontrolle (HBV-TC = bcp + SV40-ORF2). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter pcDNA3-HCVCORE 1a und 1b eine Verstärkung der Aktivität auf das 1,2 - 1,3-fache des Ausgangswertes (HBV-TC), allerdings erst bei einer HBV bcp Konzentration von 5µg des transfizierten Konstrukts (Abb. 3.22, B).

Der Volllänge Core Promotor (fcp) wurde durch pSV40-HCVCORE 1a auf 75% und durch pcDNA3-HCVCORE 1a auf 60% seiner Grundaktivität (HBV-TC = fcp + SV40-ORF2 oder CMV-ORF2) reprimiert (Abb. 3.22, C).

### 3.8.3.3 Einfluß auf die gesamten regulatorischen HBV Core Elemente im Verbund

Das HBV enh1-fcp Konstrukt entspricht weitgehend der Anordnung der die HBV Core Expression steuernden Elemente im HBV. Die Aktivität des enh1-fcp Konstrukts wurde durch pSV40-HCVCORE 1a auf das 1,4-fache gesteigert (Abb. 3.22,

D). Unter pcDNA3-HCVCore 1a kam es bei einer Konzentration von 500 ng des transfizierten enh1-fcp - Konstrukts zur Repression auf 60%, bei 1250 ng transfizierten enh1-fcp - Konstrukts zu keiner Aktivitätsänderung verglichen mit der Kontrolle (HBV-TC = enh1-fcp + SV40-ORF2) . Unter pcDNA3-HCVCore 1b zeigte sich entweder keine Reaktion (500 ng enh1-fcp) oder eine Verstärkung auf das 1,25-fache (1250 ng enh1-fcp) gegenüber der Kontrolle (HBV-TC = enh1-fcp + CMV-ORF2).

### 3.8.4 Diskussion zu den Luciferaseexperimenten

Sowohl der basale (bcp) als auch der Volllänge HBV Core Promotor (fcp) werden in den Experimenten durch das HCV Core Protein in unterschiedlichem Ausmaß reprimiert. Ausnahmen bestehen für die niedrig exprimierenden Konstrukte pcDNA3-HCVCore 1a und 1b, die nur sehr wenig regulieren oder eher leicht verstärkenden Einfluß (1,2-fach) auf den basalen HBV Core Promotor ausüben.

Auffällig ist, dass die Analyse des Komplettverbunds enh1-fcp – im Gegensatz zur Repression der Einzelemente enh1XP, bcp und fcp – unter dem hoch exprimierenden HCV Core (pSV40-HCVCore 1a) eine Verstärkung der Aktivität zeigt. Die Regulation des enh1-fcp durch die niedrig exprimierenden pcDNA3-HCVCore Konstrukte umfassen Repression und Verstärkung - und somit eine HCV Core - Protein-konzentrationsabhängige Regulation.

Denkbar wäre, dass das HCV Core Protein die zelluläre, Transkriptionsfaktor-gebundene HBV Core - Transkription stört (siehe 1.1.4, S. 16), so dass es ab einem gewissen  $\frac{HCVCore}{HBVenh1-fcp}$  - Verhältnis zu konzentrationsabhängigen Verstärkungs- oder Repressions- Phänomenen kommt. Bisher sind in der Literatur hauptsächlich reprimierende Effekte von HCV Core auf die HBV Transkription im Zellkultursystem beschrieben worden [186, 188, 189, 29]. Mit den hier erhobenen Daten kann gezeigt werden, dass das HCV Core Protein unterschiedliche Effekte auf die HBV Transkription in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration ausübt.

## **3.9 Einfluß von HCV Core auf die HBV Core Transkription: quantitative HBV RNA-Bestimmung**

### **3.9.1 Einleitung**

In Abschnitt 3.8 (S. 112) konnte gezeigt werden, dass HBV Reportergenkonstrukte konzentrationsabhängig durch das HCV Core Protein reguliert werden. In dem nun folgenden Experiment sollen die ermittelten Ergebnisse am replizierenden HBV-System (pHBV1.5) validiert werden. Dazu wurden Untersuchungen mit indirekter und direkter Konzentrationskinetik (siehe 3.2.1.5, S. 92) durchgeführt.

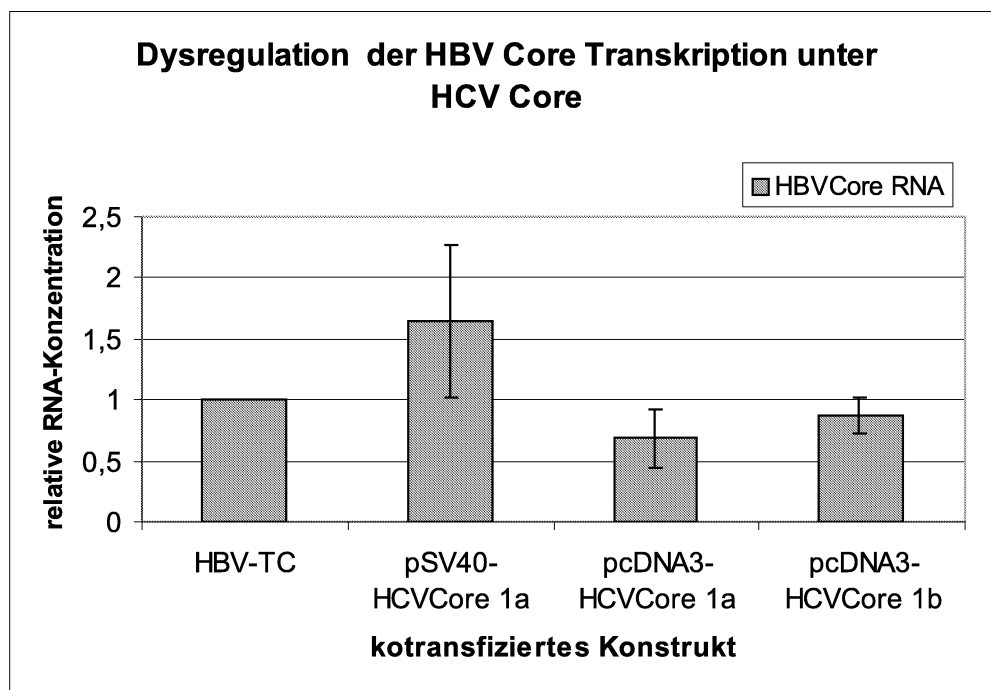
### **3.9.2 Durchführung der HBV RNA - Quantifizierungsexperimente**

#### **3.9.2.1 Indirekte Konzentrationskinetik**

2,5 $\mu$ g pHBV1.5-Plasmid wurden mit 5 $\mu$ g HCV Core - Konstrukt (pcDNA3-HCVCORE 1a, pcDNA3-HCVCORE 1b oder pSV40-HCVCORE 1a) oder entsprechender Kontrolle (CMV-ORF2 oder SV40-ORF2) kotransfiziert (siehe 2.8.3, S. 57). Am 4. Tag p.t. wurde die RNA der Zellen isoliert (siehe 2.10, S. 60) und mittels quantitativer RT-PCR für HBV Core RNA und ATP-Synthase 6 - RNA standardisiert und vermessen (siehe 3.1.2, S. 81 und 3.1.1, S. 79).

#### **3.9.2.2 Direkte Konzentrationskinetik**

2,5 $\mu$ g pHBV1.5-Plasmid wurden mit 2,5 $\mu$ g oder 7,5 $\mu$ g pcDNA3-HCVCORE 1a - Konstrukt oder gleicher Konzentration CMV-ORF2 (als Kontrolle) kotransfiziert. Danach wurde wie in der indirekten Kinetik verfahren. Der Unterschied zwischen beiden Vorgehensweisen bestand darin, dass in der indirekten Konzentrationskinetik Promotoren unterschiedlicher Stärke zur Expression des HCV Core Proteins und in der direkten Konzentrationskinetik unterschiedlich hohe Konzentrationen des gleichen HCV-Core-Konstrukts eingesetzt wurden (siehe 3.2.1.5, S. 92).



**Abbildung 3.23:** Regulation der HBV Core Transkription unter HCV Core Kotransfektion in der indirekten Konzentrationskinetik. HBV-TC = Promotorkompensierte HBV-Kontrolle.

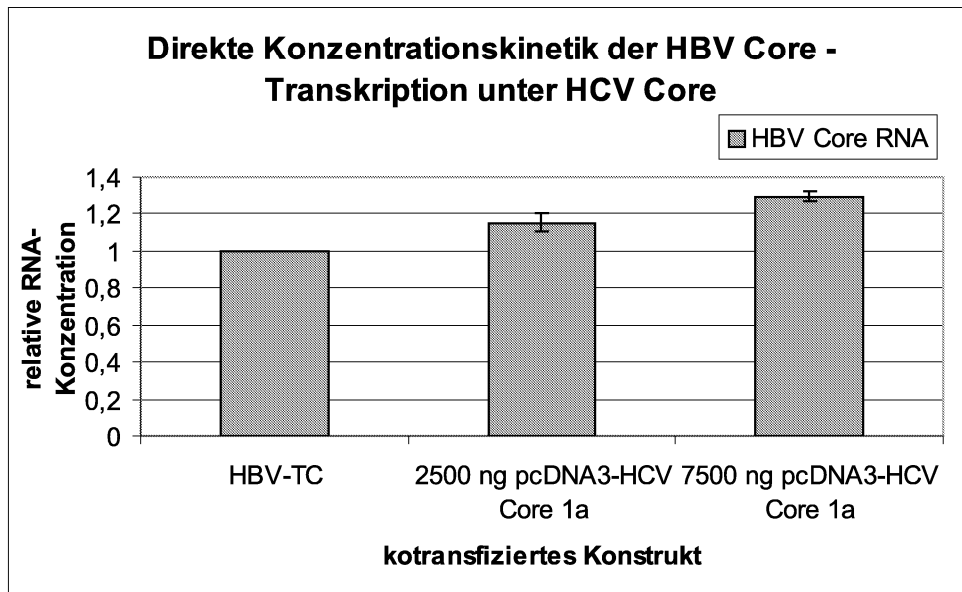
### 3.9.3 Ergebnisse der HBV RNA - Quantifizierungsexperimente

#### 3.9.3.1 Indirekte Konzentrationskinetik (Abb. 3.23)

Die Untersuchungen zur HBV-Transkriptionskontrolle durch das HCV Core Protein haben gezeigt, dass sich die Expression von HBV Core RNA unter dem hoch exprimierenden HCV Core Konstrukt (pSV40-HCV Core 1a) auf das 1,6-fache gegenüber der nicht-HCV Core-kotransfizierten HBV-Kontrolle (HBV-TC=pHBV1.5 + SV40-ORF2) verstärkte (Abb. 3.23, pSV40-HCV Core 1a und HBV-TC).

Unter Kotransfektion des pHBV1.5-Plasmids mit dem pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt konnte eine Repression der HBV Core RNA auf 75% gegenüber der HBV-Kontrollen-Kotransfektion (HBV-TC=pHBV1.5 + CMV-ORF2) beobachtet werden (Abb. 3.23, pcDNA3-HCV Core 1a und HBV-TC).

Weiterhin fiel auf, dass das pcDNA3-HCVCore 1b - Konstrukt nur eine leichte Repression der HBV Core Transkription auf 90% des HBV-Kontrollwertes (HBV-TC=pHBV1.5 + CMV-ORF2) bewirkte (Abb. 3.23, pcDNA3-HCV Core 1b und HBV-TC).



**Abbildung 3.24:** Regulation der HBV Core Transkription unter HCV Core Kotransfektion in der direkten Konzentrationskinetik mit zwei verschiedenen Konzentrationsstufen des pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukts. HBV-TC = Promotorkompensierte HBV-Kontrolle

### 3.9.3.2 Direkte Konzentrationskinetik (Abb. 3.24)

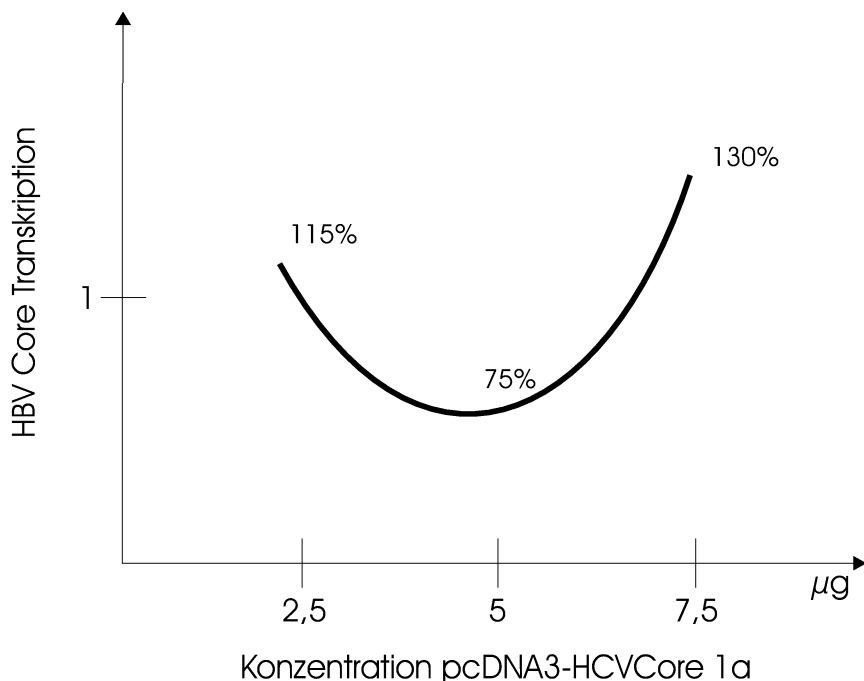
Die Untersuchungen zur HBV-Transkriptionskontrolle durch das HCV Core Protein haben in der direkten Konzentrationskinetik gezeigt, dass die HBV Core Transkription unter Kotransfektion des pHBV1.5-Plasmids mit 7,5µg pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt auf das 1,3-fache gegenüber der nicht-HCV Core-kotransfizierten HBV-Kontrolle (HBV-TC=pHBV1.5 + CMV-ORF2) verstärkt wurde (Abb. 3.24, 7500 ng pcDNA3-HCV Core 1a und HBV-TC).

Unter einer Kotransfektion mit 2,5µg pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt konnte eine Steigerung der HBV Core Expression auf das 1,15-fache beobachtet werden (Abb. 3.24, 2500 ng pcDNA3-HCV Core 1a und HBV-TC).

### 3.9.4 Diskussion der Experimente zur HBV Core Transkriptionsregulation durch HCV Core

In den Experimenten zur HBV Core Transkriptionsregulation durch HCV Core konnte gezeigt werden, dass

- die Daten aus dem HBV enh1-fcp - Luciferaseexperiment (siehe 3.8, S. 112) mit



**Abbildung 3.25:** Extrapolierte Daten für die Regulation der HBV Core Transkription durch pcDNA3-HCVCore 1a. Die Werte entsprechen den experimentellen Ergebnissen.

den Ergebnissen des replizierenden HBV-Systems pHBV1.5 in Übereinstimmung stehen und vergleichbar sind. Das HBV Reportergenkonstrukt enh1-fcp stellt somit ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der HBV Core Transkriptionsregulation dar.

- die Daten aus der direkten Konzentrationskinetik für  $7,5\mu\text{g}$  pcDNA3-HCV Core 1a die Ergebnisse des höher exprimierenden pSV40-HCV Core 1a Konstruktes aus der indirekten Konzentrationskinetik validieren.

Abbildung 3.25 illustriert eine Extrapolation der gewonnenen Daten für die pcDNA3-HCV Core 1a - konzentrationsabhängige HBV Core Transkriptionsregulation. Dabei wird deutlich, dass bei  $5\mu\text{g}$  des transfizierten pcDNA3-HCV Core 1a-Konstruktes eine Repression stattfindet, während bei höheren und niedrigeren Dosierungen Expressionssteigerungen zu beobachten sind. Die Interpretation dieser Ergebnisse ist insofern schwierig, da keine Daten über die tatsächlichen HCV Core Proteinkonzentration zu den jeweiligen Plasmid-DNA-Konzentrationsstufen ( $2,5\mu\text{g}$ ,  $5\mu\text{g}$  und  $7,5\mu\text{g}$ ) erhältlich sind. Infolge der schwankenden Expression des pcDNA3-HCVCore 1a Konstruktes (siehe 3.3, S. 99) und des negativen Feedbacks auf den expressionssteuernden CMV-Promotor (siehe 3.6, S. 108) können die verschiedenen



Plasmid-DNA-Konzentrationen nicht direkt auf Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

Dennoch konnten diese Experimente – bedingt durch die beiden Zugangswege über eine indirekte und direkte Konzentrationskinetik – zeigen, dass HCV Core Protein konzentrationsabhängig die HBV Core Transkription deregulieren, also reprimieren oder steigern kann. Hiermit konnten im Zellkulturversuch Erklärungsbausteine für die klinisch-pathologisch nachgewiesene Beeinträchtigung der HBV Replikation unter Koinfektion mit HCV geliefert werden [39, 65, 167].

## **3.10 Bindungsstudien von HCV Core an HBV Core Promotor und Enhancer**

### **3.10.1 Einleitung**

Bisherige Arbeiten zur HBV-Replikationskontrolle durch HCV Core konnten intervirale Interferenzen aufzeigen. Nach wie vor fehlen aber bestätigende Experimente zur Fragestellung, ob das HCV Core Protein direkt an HBV Core Promotoren und Enhancer-Elemente bindet, oder ob die interviralen Effekte über zelluläre Signalkaskaden vermittelt werden [186, 188, 189, 29].

In Gelshift-Experimenten zu dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob das HCV Core Protein direkt an die HBV Core Promotor - (Volllänge Core Promotor, fcp) oder Enhancer 1 (enh1XP) - Regionen bindet.

### **3.10.2 Durchführung der Bindungsstudien**

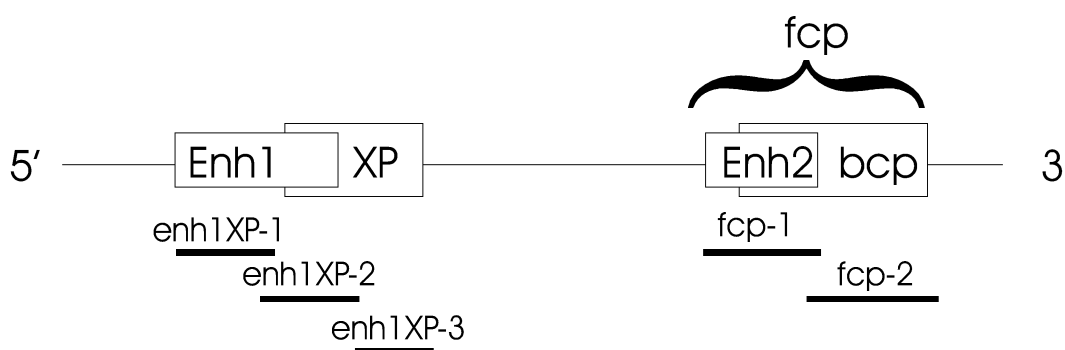
Die möglichen Bindungsstellen des HBV Genoms (3 Fragmente des Enhancer 1 (enh1XP-1 bis -3) und 2 Fragmente des Volllänge-Core Promotor (fcp-1 und -2), siehe Abb. 3.26) wurden durch PCR hergestellt (siehe 2.18.4, S. 75) und in vitro mit  $^{32}\text{P}$  markiert (siehe 2.18, S. 73).

Das HCV Core Protein ist 4 Tage post transfectionem aus den Zellkernen von HuH7-Zellen, die zuvor mit  $20\mu\text{g}$  pcDNA3-HCV Core 1a oder  $20\mu\text{g}$  pSV40-HCV Core 1a transfiziert waren, gewonnen worden. Als Negativkontrolle dienten die Kernextrakte nicht-transfizierter HuH7-Zellen. Zur Durchführung der Gelshift-Experimente sind diese Kernisolate mit den radioaktiv markierten HBV Enhancer 1 - und Co-

re Promotor - Fragmenten inkubiert und danach gelelektrophoretisch aufgetrennt worden (siehe 2.18, S. 73).

Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden jeweils drei Experimente durchgeführt, deren Untersuchungsschwerpunkte verschieden gesetzt wurden:

- Analyse des HBV Enhancer 1 (enh1XP) im ersten Experiment. Dabei wurde das Bindungsverhalten von HCV Core - haltigen Kernextrakten (aus pcDNA3-HCV Core 1a - transfizierten Zellen) - und Negativkontrollen - Kernextrakten (aus nicht transfizierten Zellen), jeweils ohne und mit monoklonalem anti-HCV Core - Antikörper (Supershift) untersucht.
- Vergleich des HBV Enhancer 1 (enh1XP) - Bindungsvermögens der Kernextrakte pcDNA3-HCV Core 1a- und pSV40-HCV Core 1a-transfizierter Zellen mit einem rekombinanten HCV Core Protein (HCV Core- $\beta$ Gal Fusionsprotein, Fa. Advanced ImmunoChemical) im zweiten Experiment.
- Im dritten Experiment wurde die Bindung des pcDNA3-HCVCore 1a - Kernextrakts an den HBV Volllänge Core Promotor (fcp) im Vergleich zu Bindungen von nicht-transfizierter Negativkontrolle, rekombinanten HCV Core- $\beta$ Gal Fusionsprotein und rekombinanten HCV Core Fragment (AS 62-192, Fa. Advanced ImmunoChemical) untersucht. Außerdem wurde auch hier ein Supershift mittels monoklonalem anti-HCV Core - Antikörper durchgeführt, um die Spezifität der Aussage zu erhöhen.



**Abbildung 3.26:** Die generierten PCR-Fragmente für die Gelshift-Analyse über die Bereiche des Enhancers 1 (Enh1) und X-Promotor (XP) sowie Enhancer 2 (Enh2) und basaler core promotor (bcp). Die Fragmente wurden mit enh1XP-1, enh1XP-2, enh1XP-3 und fcp-1, fcp-2 (fcp=Full length core promotor) bezeichnet.

### 3.10.3 Ergebnisse der Bindungsstudien

#### 3.10.3.1 Analyse des HBV Enhancer 1 (Enh1XP)

In den Untersuchungen zum Bindungsvermögen des HCV Core Proteins an den HBV Enhancer 1 konnte keine Hybridisierung des HCV Core Proteins mit den untersuchten Fragmenten enh1XP-1 bis -3 festgestellt werden.

In den dazugehörigen Experimenten wurde deutlich, dass die freie DNA-Probe eine klare Bande bildete, d.h. frei von relevanter Kontamination mit Protein war (Abb. 3.27, a). Die Hybridisierung mit dem Kernextrakt der nicht-transfizierten Negativkontrolle ergab in den Abschnitten enh1XP-1 bis -3 jeweils ein distinktes Bandenmuster (Abb. 3.27, b), das sich auch unter Zugabe des anti-HCV Core - Antikörpers nicht veränderte (Abb. 3.27, c).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Bandenmuster der Negativkontrolle dem der HCV Core-Probe in allen drei Enhancer 1- Abschnitten glich (Abb. 3.27, b und d). Auch hier waren unter Zugabe des anti-HCV Core - Antikörpers keine Veränderungen zu beobachten (Abb. 3.27, e). Beim Vergleich pcDNA3-HCV Core 1a und pSV40-HCV Core 1a - transfizierter Zellen konnte keine Veränderung des Bandenmusters der Enhancer 1 - Abschnitte enh1XP-1 bis -3 beobachtet werden (Abb. 3.28, c und d).

Bei Hybridisierung der Enhancer 1 - Abschnitte mit dem rekombinanten HCV Core- $\beta$ Gal Fusionsprotein (Fa. Advanced ImmunoChemical) fiel auf, dass sich ein distinktes Bandenmuster herausbildete. Im Vergleich mit der freien DNA-Probe musste dieses Bandenmuster allerdings als unspezifische Verunreinigung des Versuchsansatzes gewertet werden (Abb. 3.28, a und e).

#### 3.10.3.2 Analyse des HBV Volllänge Core Promotors (fcp)

In den Gelshift-Untersuchungen des HBV Volllänge Core Promotors stellten sich die freien DNA-Proben fcp-1 und fcp-2 als eindeutige Banden dar und galten damit als von wesentlichen Kontaminationen frei (Abb. 3.29, a). Im Vergleich des Bandenmusters der Kernextrakte nicht-transfizierten Negativkontrolle mit denen pcDNA3-HCV Core 1a - transfizierter Zellen, ergab sich kein Unterschied (Abb. 3.29, b und d). Daran änderte auch die Zugabe des anti-HCV Core - Antikörpers nichts (Abb. 3.29, b bis e).

Bei der Analyse des fcp-2 - Fragmentes erschien unter Hybridisierung mit dem rekombinanten HCV Core Fragment (AS 62-192, Fa. Advanced ImmunoChemical) eine neue Bande, die in allen anderen untersuchten Proben nicht detektierbar war (Abb. 3.29, fcp-2, Pfeil auf g). Für diesen Fall ist von einer spezifischen Bindung des rekombinanten HCV Core Fragments an das HBV fcp-2 - Fragments auszugehen.

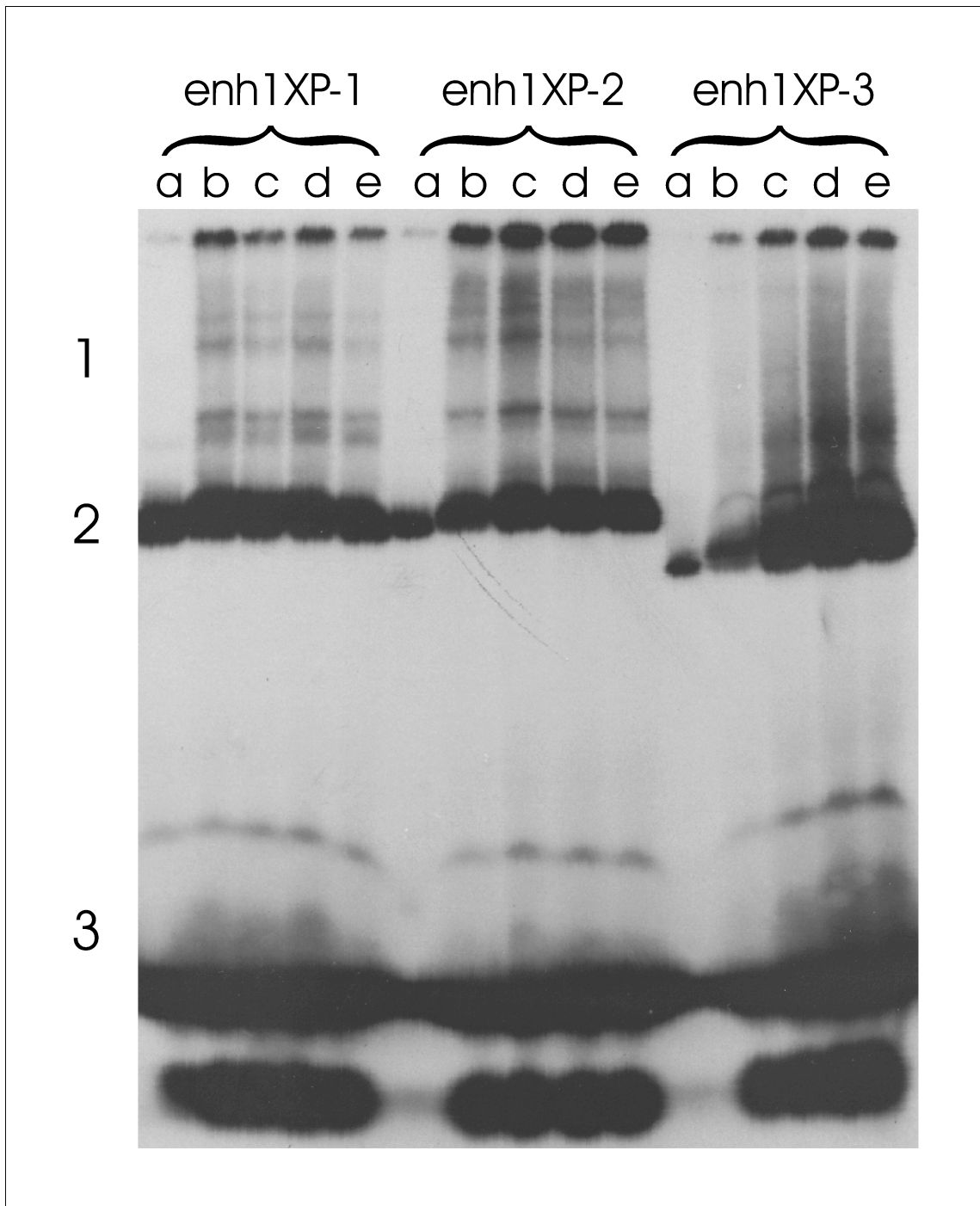
### 3.10.4 Diskussion der Bindungsstudien

In den Untersuchungen zum Bindungsverhalten des aus den Zellkernen von transfizierten HuH7-Zellen isolierten HCV Core Proteins an die HBV Core Promotoren und Enhancer-Elemente konnte keine Bindung des HCV Core Proteins nachgewiesen werden. Auch zwischen den verschieden hoch exprimierenden HCV Core Konstrukten pcDNA3-HCV Core 1a und pSV40-HCV Core 1a wurde kein Unterschied beobachtet.

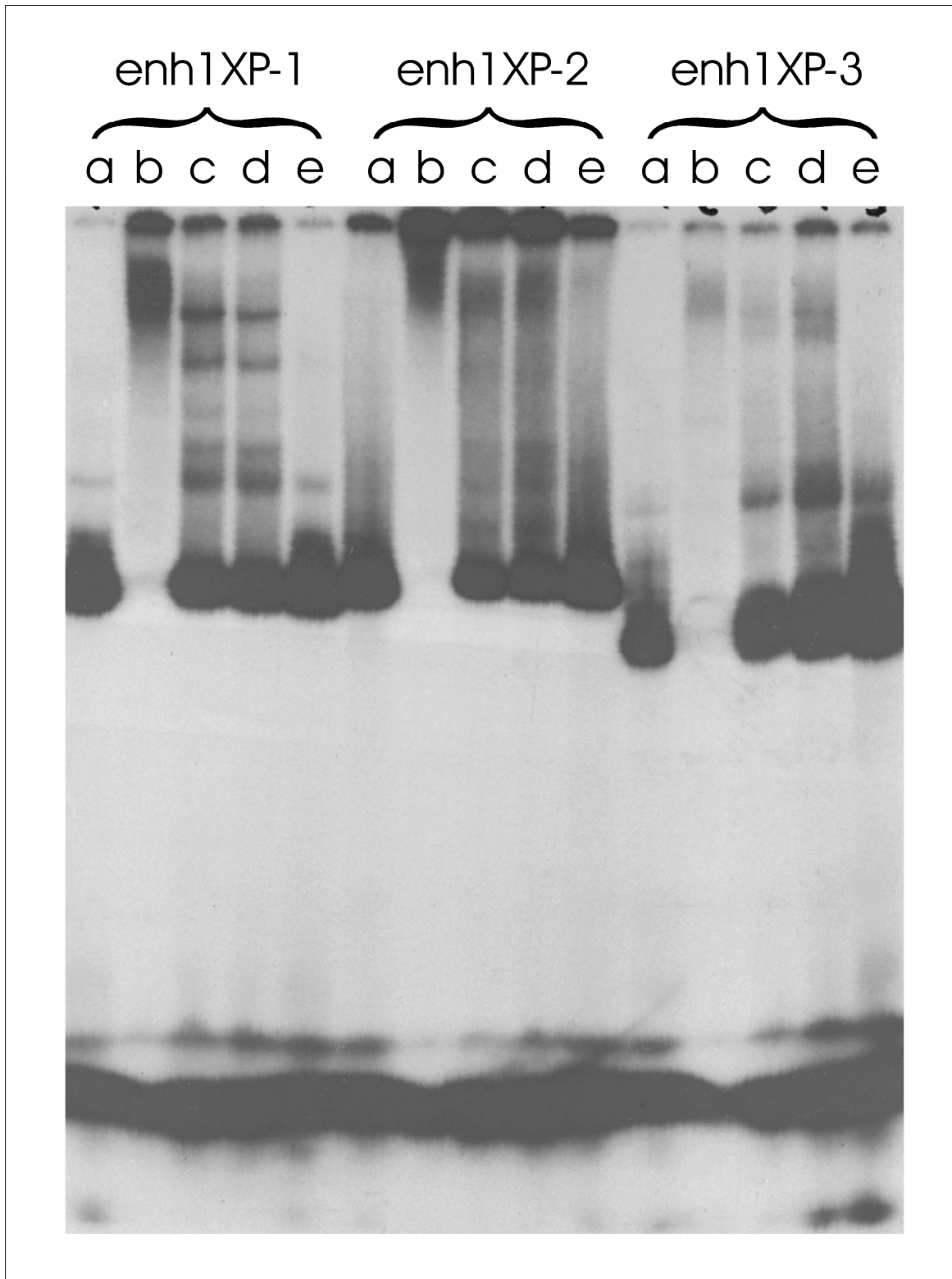
Die Analyse des Bandenmusters der nicht-transfizierten Negativkontrollen zeigte, dass zelluläre Proteine unterschiedlicher Größe an den Fragmenten binden konnten. Dieser Befund validiert die hier vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der korrekten Methodik und macht eine Nicht-Bindung des HCV Core Proteins an die untersuchten Abschnitte wahrscheinlich.

In den Untersuchungen zum Bindungsverhalten rekombinanter HCV Core Proteine an die HBV Core Promotor und Enhancer - Elemente konnte bei der Verwendung eines rekombinanten HCV Core Fragments im Bereich des basalen Core Promotors (bcp  $\equiv$  fcp-2) eine Bindungsstelle detektiert werden. Dieser Befund könnte auf eine andere sterische Konformation mit Aufklappen von Bindungsstellen zurückzuführen sein. Das eingesetzte Fragment (AS 62-192) ist aber nie als natürliches HCV Core Fragment beschrieben worden (siehe 1.2.4, S. 25) – somit können damit erzielte Ergebnisse nicht unbedingt den Anspruch auf Reproduzierbarkeit mit dem natürlichen HCV Core Protein erheben.

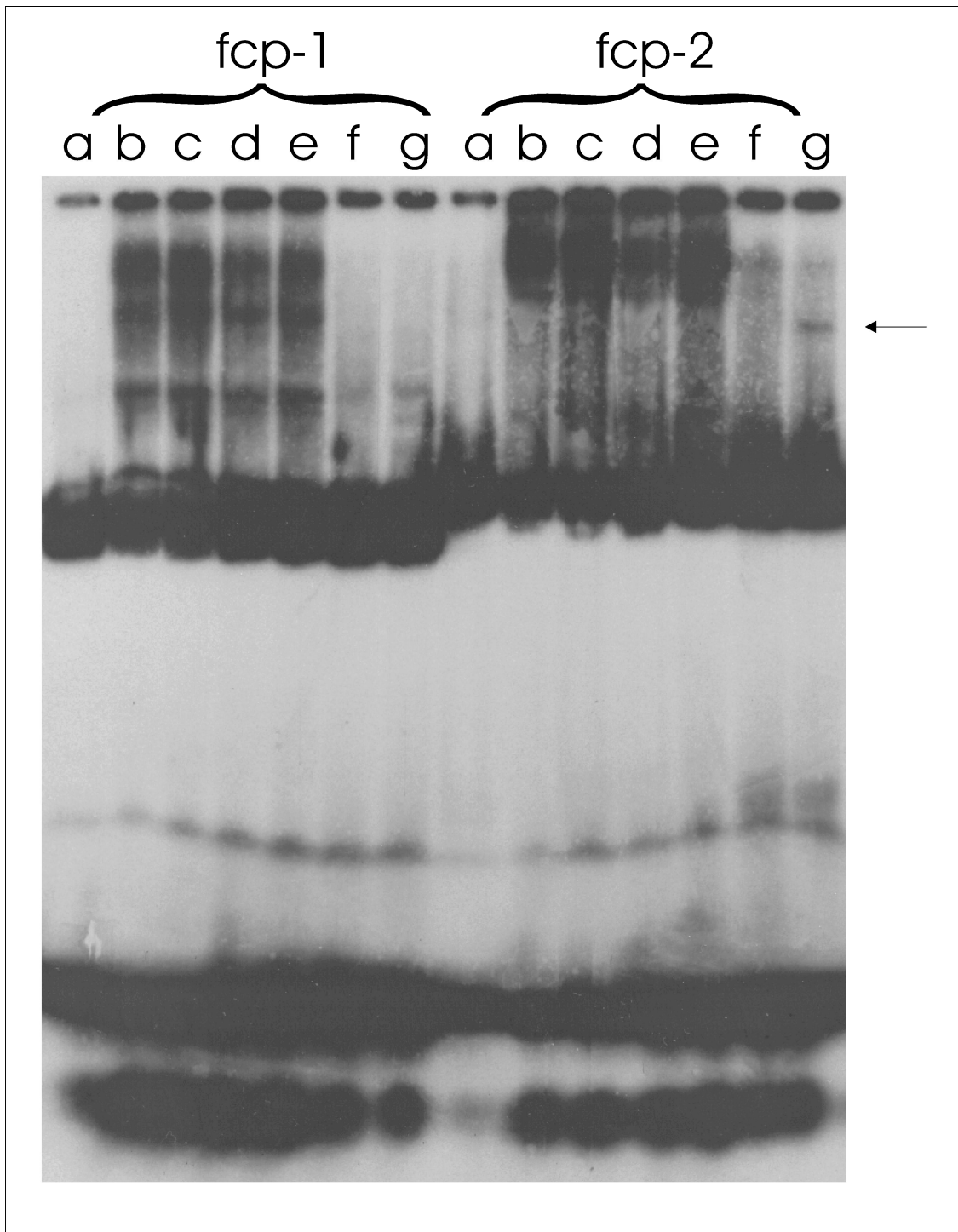
Im Zusammenhang mit den dargestellten Effekten von HCV Core auf die Transkription von HBV Core läßt sich feststellen, dass HCV Core konzentrationsabhängig die HBV Core Transkription reprimieren oder verstärken kann. Da sich keine Bindung von HCV Core an die Transkriptions-steuernenden Elemente HBV Core Promotor, Enhancer 1 und 2 nachweisen ließ, muß davon ausgegangen werden, dass die HCV Core Effekte auf die HBV Core Transkription indirekt, möglicherweise über zelluläre Signalkaskaden erfolgen.



**Abbildung 3.27:** Gelshift Enh1XP–HCV Core, erstes Experiment. (1) bezeichnet spezifische Bindungen an die Probe, in diesem Fall durch zelluläre Faktoren; (2) freie DNA-Probe; (3) unspezifische DNA-Zerfallsprodukte. (a) freie DNA-Probe, (b) Kernextrakt der Kontrolle, (c) Kontrolle + anti-HCV Core, (d) HCV Core Kernextrakt, (e) wie d + anti-HCV Core (Supershift).



**Abbildung 3.28:** Gelshift Enh1XP-HCV Core, zweites Experiment. (a) freie DNA-Probe, (b) Kernextrakt der Kontrolle, (c) Kernextrakt der pcDNA3-HCVCore 1a - transfizierten, (d) Kernextrakt der pSV40-HCVCore 1a - transfizierten, (e) rekombinantes HCV Core- $\beta$ Gal Fusionsprotein (Fa. Advanced ImmunoChemical).



**Abbildung 3.29:** Gelshift fcp-HCV Core. (a) freie DNA-Probe, (b) Kernextrakt der Kontrolle, (c) Kontrolle + anti-HCV Core, (d) HCV Core Kernextrakt, (e) wie d + anti-HCV Core, (f) rekombinantes HCV Core- $\beta$ Gal Fusionsprotein, (g) rekombinantes HCV Core Fragment (AS 62-192, Fa. Advanced ImmunoChemical). Pfeil = neu entstandene Bande.

## 3.11 Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Reifung und Sekretion

### 3.11.1 Einleitung

Sero-pathologische Daten zeigen, dass bei einer HBV-HCV - Koinfektion die HBV - Infektion serologisch HBsAg - negativ (stumm) wird, die HBV DNA aber weiterhin mit sensitiven molekularbiologischen Methoden nachweisbar ist (siehe 1.3.1, S. 30, [167, 96, 192, 56, 205, 118, 26]). Eine mögliche Erklärung für diese Konstellation ist neben der Repression der Transkription eine Sekretionsbehinderung von HBV Virionen durch das HCV Core Protein mit der Folge einer intrazellulären Akkumulation von HBV.

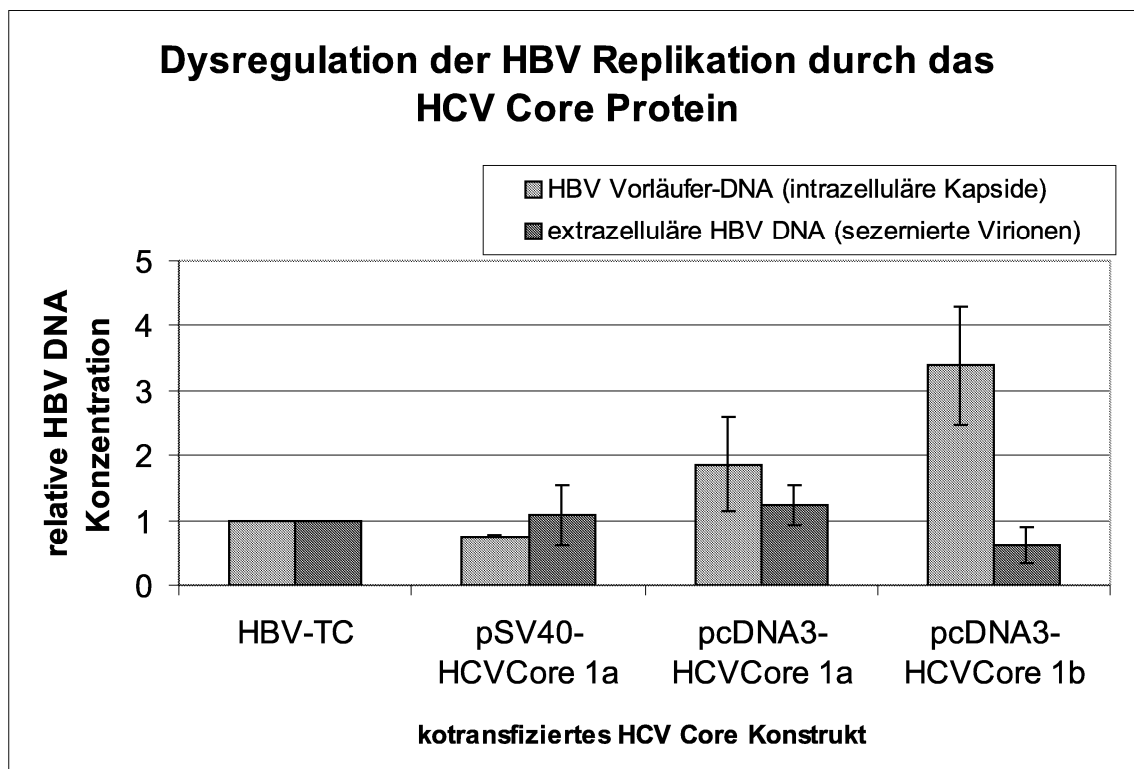
Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen durchgeführt, die einen quantitativen Vergleich von enkapsidierter intrazellulärer HBV Vorläufer-DNA mit extrazellulärer HBV DNA in sezernierten Virionen unter der Kontrolle des HCV Core Proteins erlauben.

### 3.11.2 Durchführung

HuH7-Zellen wurden mit dem replikationskompetenten Plasmid pHBV1.5 und mit HCV Core- (pcDNA3-HCV Core 1a und 1b, pSV40-HCV Core 1a; = indirekte Konzentrationskinetik) und Negativkontroll-Konstrukten (CMV-ORF2, SV40-ORF2) transient transfiziert (siehe 2.8.3, S. 57). HBV DNA wurde nach Immunpräzipitations- (intrazelluläres Kompartiment) und PEG-Fällungsexperimenten (extrazelluläre Kapside) aus HBV Kapsiden isoliert. Um die indirekte Konzentrationskinetik (siehe 3.2.1.5, S. 92) zu bestätigen, wurde zusätzlich eine direkte Konzentrationskinetik mit Kotransfektion von 2,5 $\mu$ g pHBV1.5 mit 2,5 $\mu$ g oder 7,5 $\mu$ g pcDNA3-HCVCore 1a (analog zu den Experimenten in 3.9, S. 117) durchgeführt. Als Negativkontrollkonstrukt diente CMV-ORF2.

Am 4. Tag post transfectionem (p.t.) erfolgten die RNA-Isolierung (siehe 2.10, S. 60), Immunpräzipitation (siehe 2.13, S. 62), PEG-Fällung (siehe 2.11, S. 61) und HBV DNA Isolierung (siehe 2.12, S. 61). Die Konzentration der isolierten Nucleinsäuren wurde mit den jeweiligen quantitativen PCR-Systemen bestimmt und auf Zellzahl mittels der ebenfalls gemessenen ATS-RNA standardisiert (siehe 3.1, S. 79).





**Abbildung 3.30:** Die Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Sekretion in der indirekten Konzentrationskinetik.  $2,5\mu\text{g}$  pHBV1.5-Plasmid wurden mit  $5\mu\text{g}$  HCV Core- oder Kontrollkonstrukt kotransfiziert. Dargestellt sind die auf die Promotorkompensierten HBV-Kontrollen (HBV-TC=1) standardisierten DNA-Konzentrationen intrazellulärer und extrazellulärer HBV Kapside.

### 3.11.3 Ergebnisse

#### 3.11.3.1 Indirekte Konzentrationskinetik

Das Ergebnis der indirekten Konzentrationskinetik ist in Abb. 3.30 dargestellt. Alle Werte wurden gegen die HBV-Kontrollen (HBV-TC=1, siehe oben) kalkuliert. Das Verhältnis von intra- zu extrazellulären Kapsiden wurde in den HBV-Kontrollen auf 1:1 standardisiert.

Als Ergebnis der Untersuchungen zur indirekten Konzentrationskinetik von HBV zu HCV Core konnte gezeigt werden, dass unter der Kontrolle des vermeintlich hoch exprimierten HCV Core Proteins (pSV40-HCV Core 1a - Konstrukt) die intrazelluläre HBV Vorläufer-DNA auf etwa 70% des Ausgangswertes reduziert und die Konzentration der extrazellulären HBV DNA, isoliert aus sezernierten Virionen, vergleichbar mit der HBV-Kontrolle war (Abb. 3.30, HBV-TC und pSV40-HCVCore 1a).

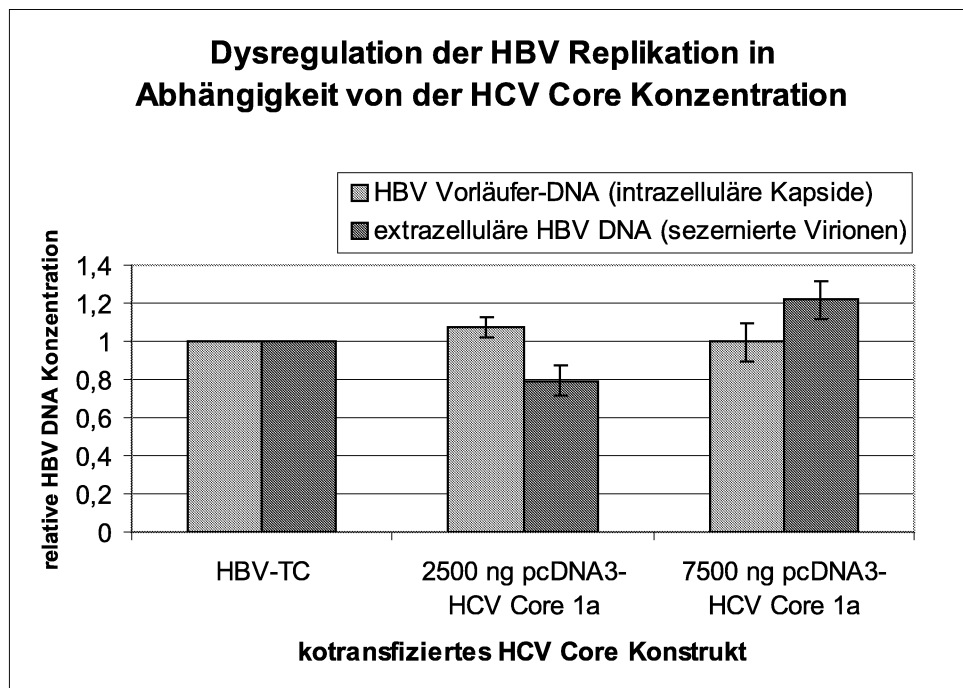
In Experimenten, bei denen HCV Core (Genotyp 1a und 1b) unter der Kontrolle des CMV-Promotors (pcDNA-Konstrukte) stand und eine 6-fach niedrigere Expression des HCV Core Proteins zu erwarten war (siehe 3.2.1.5, S. 92), konnte eine intrazelluläre Anreicherung von HBV Vorläufer-DNA beobachtet werden. Hierbei zeigten sich auch Genotyp-spezifische Unterschiede, die im Vergleich zu Nicht-HCV-Core-kotransfizierten Kontrollen (HBV-TC) eine intrazelluläre Anreicherung auf das 1,9-fache für den Genotyp 1a und bis zum 3,5-fachen für den Genotyp 1b ergaben (Abb. 3.30, pcDNA3-HCVCORE 1a und 1b).

Besonders auffallend war bei der pcDNA3-HCVCORE 1b - Kotransfektion, dass einer hohen intrazellulären Akkumulation von HBV Vorläufer-DNA eine auf das 0,5-fache stark verminderte extrazelluläre HBV-DNA - Konzentration gegenüberstand. Eine Verringerung der extrazellulären HBV-DNA konnte bei Experimenten mit pcDNA3-HCVCORE 1a - Kotransfektion nicht beobachtet werden. Dort stand vielmehr eine Erhöhung extrazellulärer HBV-DNA auf das 1,2-fache der HBV-Kontrolle im Vordergrund.

Bezogen auf die HBV-Sekretion (Quotient aus intrazellulärer zu extrazellulärer HBV DNA) konnte in den Experimenten mit der indirekten Konzentrationskinetik eine auf das 0,7-fache herabgesetzte HBV-Sekretionsleistung unter hoch exprimiertem HCV Core und eine intrazelluläre Akkumulation von HBV Vorläufer-DNA vom 1,5-fachen (HCV Genotyp 1a) bis zum 5,4-fachen (HCV Genotyp 1b) beobachtet werden.

### **3.11.3.2 Direkte Konzentrationskinetik**

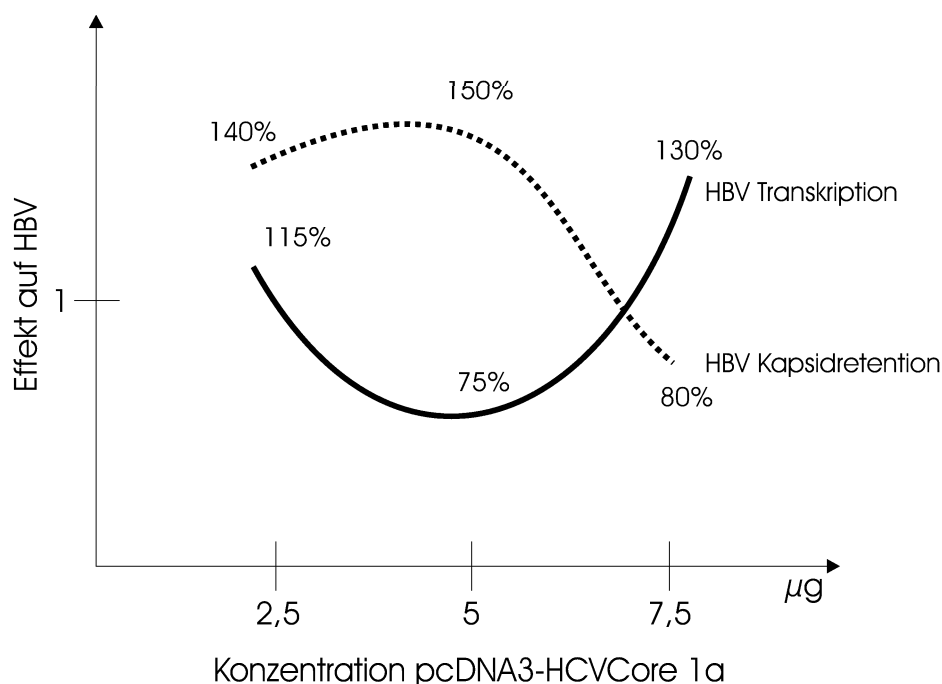
Um die Ergebnisse der indirekten Konzentrationskinetik zu bestätigen, sind Experimente mit direkter Konzentrationskinetik mit zwei Konzentrationsstufen des pcDNA3-HCVCORE 1a - Konstrukts durchgeführt worden. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei Kotransfektion von HBV mit einer hohen HCV Core Konzentration (7,5  $\mu$ g pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt), HBV-DNA um das 1,2-fache stärker extrazellulär sezerniert wurde als bei der Nicht-HCV-Core-transfizierten HBV-Kontrolle. Eine Veränderung der Konzentration intrazellulärer HBV Vorläufer-DNA zeigte sich nicht (Abb. 3.31, 7500 ng pcDNA3-HCVCORE 1a und HBV-TC). Diese Steigerung der HBV Sekretion steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der indirekten Konzentrationskinetik mit dem pSV40-HCVCORE 1a - Konstrukt (Abb. 3.30).



**Abbildung 3.31:** Die Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Sekretion in der direkten Konzentrationskinetik. Dargestellt sind die auf die Promotorkompensierten HBV-Kontrollen (HBV-TC=1) standardisierten DNA-Konzentrationen intrazellulärer und extrazellulärer HBV Kapside.  $2,5\mu\text{g}$  pHBV1.5-Plasmid DNA wurden mit den in der Abzisse angegebenen Konzentrationen des pcDNA3-HCVCore 1a- oder Kontrollkonstruktes kotransfiziert.

Demgegenüber wurde in Experimenten mit niedriger HCV Core Konzentration ( $2,5\mu\text{g}$  pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt) eine Repression der HBV Sekretion auf das 0,8-fache der Negativkontrolle gemessen. Die intrazelluläre HBV Vorläufer-DNA reicherte sich gegenüber der HBV-Kontrolle nur geringfügig an (1,1-fach, Abb. 3.31, 2500 ng pcDNA3-HCVCore 1a und HBV-TC). Auch dieses Experiment konnte die Aussage einer intrazellulären Akkumulation von HBV unter niedrig exprimiertem HCV Core aus der indirekten Konzentrationskinetik stützen (Abb. 3.30, pcDNA3-HCVCore 1a).

Bezogen auf die HBV-Sekretion konnte in den Experimenten mit der direkten Konzentrationskinetik eine 1,4-fache intrazelluläre Anreicherung bei niedriger HCV Core Konzentration und eine auf das 0,8-fache herabgesetzte Sekretion bei hoher HCV Core Konzentration beobachtet werden.



**Abbildung 3.32:** Erweiterung der Abb. 3.25 von S. 120. Extrapolierte Daten für die Regulation der HBV Core Transkription und HBV Kapsidretention durch pcDNA3-HCVCore 1a. Die Werte entsprechen den experimentellen Ergebnissen.

### 3.11.4 Diskussion

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass neben der transkriptionellen Kontrolle von HBV durch das HCV Core Protein (eigene Untersuchungen siehe 3.8, S. 112 und 3.9, S. 117 sowie andere Arbeiten [188, 189]) auch eine Kontrolle der HBV-Reifung (Assemblierung (siehe auch [29]), Sekretion) durch das HCV Core Protein zu diskutieren ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl konzentrations- als auch genotypabhängig (HCV Core 1a zu 1b) eine intrazelluläre Akkumulation von HBV Vorläufer-DNA und somit unreifen HBV-Partikeln als auch eine Reduktion der extrazellulären, reifen HBV Virionen – möglicherweise durch Inhibition der HBV-Reifung und Sekretion – stattfindet.

Die Validierung der Ergebnisse zur Konzentrationsabhängigkeit der interviralen Interferenz und Sekretionshemmung erfolgte mittels zweier verschieden aufgebauter Untersuchungsschemata (indirekte und direkte Konzentrationskinetik). Abbildung 3.32 stellt eine Zusammenfassung der bisher gewonnenen Daten zu den konzentrationsabhängigen Effekten von HCV Core auf HBV dar. Darin zeigt sich ein Punkt maximaler Kapsidretention und Transkriptionsrepression bei  $5\mu\text{g}$  pcDNA3-

HCVCore 1a. Bei höheren oder niedrigeren HCV Core Plasmidkonzentrationen sind diese Effekte weniger ausgeprägt oder kehren sich um.

Unter dem HCV Core Genotyp 1b kommt es zu einer wesentlich stärkeren intrazellulären Kapsidretention als unter 1a, ganz im Gegensatz zu der unter HCV Core 1b schwächeren Repression der Transkription (siehe 3.8, S. 112 und 3.9, S. 117). Dies legt die Vermutung nahe, dass für die Effekte auf die HBV Transkription und Kapsidretention HCV-Genotyp-abhängig unterschiedliche Angriffspunkte von HCV Core benutzt werden. Bestätigt wird dies durch bereits beschriebene funktionelle Bereiche im HCV Core Protein, die in unterschiedlichem Ausmaß für die HBV Transkriptions- und Enkapsidierungshemmung verantwortlich gemacht werden (siehe 1.3.3.8, S. 35, [29]).

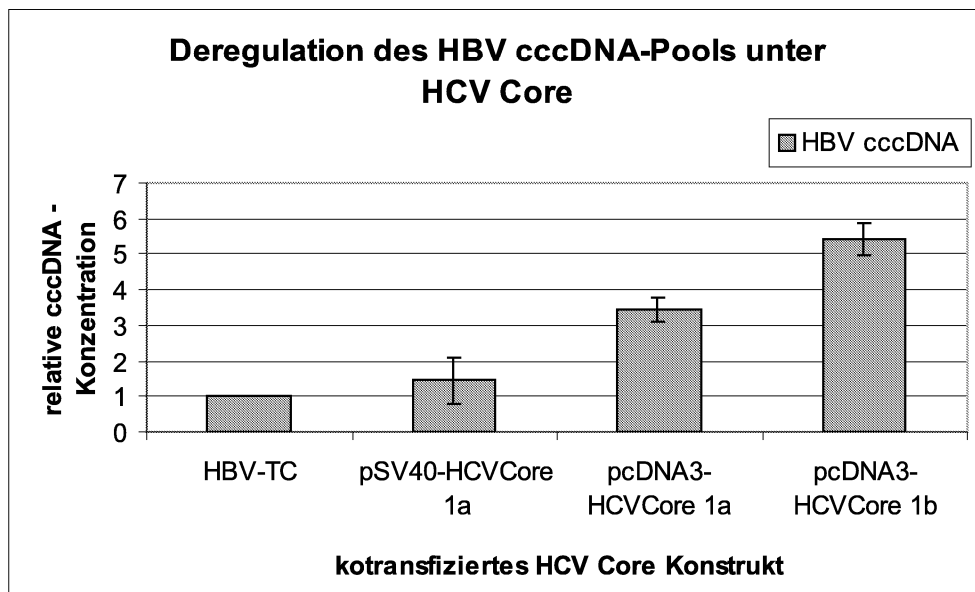
In den nun folgenden Experimenten wurde der Mechanismus der interviralen Interferenz und Sekretionshemmung näher untersucht.

## **3.12 Regulation der HBV cccDNA-Homöostase durch das HCV Core Protein**

### **3.12.1 Einleitung**

Die HBV cccDNA stellt den Ausgangspunkt für die HBV Replikation dar. Sie ist unverzichtbares Intermediat zwischen Virus-DNA und neuen infektiösen Partikeln (siehe 1.1.5, S. 19). Die intranukleäre HBV cccDNA-Konzentration befindet sich im Rahmen der HBV Replikation in einer Homöostase (siehe 1.1.3.2, S. 14 und 1.1.5.1, S. 19, [194, 195, 120]). Wird die Ausschleusung der HBV Kapside gestört, kommt es zu einer Erhöhung der intranukleären HBV cccDNA-Konzentration auf mehr als 20 Moleküle pro Zellkern (intrazellulärer Infektionsweg) [137, 211, 152].

Bisherige Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass HCV Core konzentrationsabhängig die Ausschleusung von HBV Kapsiden blockieren kann. In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob mit der Kapsidretention auch ein Anstieg der intranukleären HBV cccDNA zu verzeichnen ist.



**Abbildung 3.33:** Deregulation der HBV cccDNA-Homöostase durch das HCV Core Protein. 2,5 $\mu$ g pHBV1.5-Plasmid wurden mit 5 $\mu$ g HCV Core- oder Kontrollkonstrukt kotransfiziert. Gezeigt sind relative Werte (bezogen auf die jeweilige Promotorkompensierte HBV-Kontrolle, HBV-TC=1) als Zusammenfassung getrennter Experimente.

### 3.12.2 Durchführung

HuH7-Zellen wurden mit dem replikationskompetenten Plasmid pHBV1.5 und mit HCV Core- (pcDNA3-HCV Core 1a und 1b, pSV40-HCV Core 1a) und Negativkontrollkonstrukten (CMV-ORF2, SV40-ORF2) transient transfiziert (siehe 2.8.3, S. 57). Am 4. Tag post transfectionem (p.t.) wurden die Zellkerne isoliert, daraus die episomale HBV cccDNA extrahiert (siehe 2.14, S. 63) und diese anschließend mit der HBV Core und pHBV1.5 qPCR bestimmt und auf Zellzahl mittels der ebenfalls gemessenen ATS-RNA standardisiert (siehe 3.1, S. 79).

### 3.12.3 Ergebnis

Als Ergebnis der Untersuchungen zur Regulation der intranukleären HBV cccDNA konnte gezeigt werden, dass unter der Kontrolle des hoch exprimierten HCV Core Proteins im Vergleich zur Nicht-HCV-Core-kotransfizierten HBV-Kontrolle die Konzentration der HBV cccDNA um das 1,5-fache erhöht war (siehe Abb. 3.33, pSV40-HCVCore 1a und HBV-TC).

In Experimenten, in denen die HCV Core Expression niedriger war (pcDNA3-

Konstrukte), zeigte sich ein sehr deutlicher Anstieg der intranukleären HBV cccDNA auf das 3,5-fache unter Kontrolle des Genotyps 1a und bis zum 5,5-fachen beim Genotyp 1b (siehe Abb. 3.33, pcDNA3-HCVCORE 1a, 1b und HBV-TC).

Aus den Rohdaten der quantitativen PCRs wurde eine intranukleäre HBV cccDNA-Konzentration von  $<20$  Molekülen pro Zellkern für die pHBV1.5 und nicht-HCV-Core-kotransfizierten HBV-Kontrollen und  $>20$  Molekülen für die pHBV1.5 und HCV-Core - kotransfizierten Zellen errechnet. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die intranukleäre HBV cccDNA-Homöostase unter Kontrolle des HCV Core Proteins in einem deregulierten Zustand befand (siehe 1.1.5.1, S. 19, [137, 211]).

Die Negativkontrolle der Methode (nicht-transfizierte HuH7-Zellen) ergab Werte  $<0,007$  cccDNA-Moleküle/Zelle. Somit sind die absoluten Werte mit einem nur sehr geringen „Hintergrundrauschen“ behaftet.

### 3.12.4 Diskussion

In den Untersuchungen zur Interaktion des HCV Core Proteins mit der HBV Reifung und Sekretion (siehe 3.11, S. 128) wurde eine 5,4-fache intrazelluläre Retention von HBV Kapsiden unter pcDNA3-HCVCORE 1b ermittelt.

In den hier vorliegenden Untersuchungen zur Regulation der HBV cccDNA durch das HCV Core Protein konnte gezeigt werden, dass in Experimenten mit dem HCV Core Genotyp 1b sich die intranukleäre HBV cccDNA-Konzentration um den gleichen Faktor (5,5-fach) erhöhte, um den auch die Sekretion blockiert war. Diese Daten erlauben den logischen Schluß, dass das HCV Core Protein, Genotyp 1b, die Sekretion von HBV Kapsiden inhibiert und diese Kapsidmenge in den intrazellulären Infektionsweg „umgeleitet“ wird.

Beim weiteren Vergleich der Regulation der HBV cccDNA-Homöostase durch HCV Core mit der Wirkung auf die HBV Sekretion fällt auf, dass sowohl unter dem niedrig exprimierten HCV Core 1a (pcDNA3-HCVCORE 1a) als auch unter Kontrolle des hoch exprimierenden pSV40-HCVCORE 1a - Konstrukts die Kapsidretentionseffekte (1,5x und 0,7x, siehe 3.11, S. 128) nicht so stark waren, wie die Erhöhung des intranukleären cccDNA-„Pools“ (3,5x und 1,5x). Das deutet darauf hin, dass die Deregulation der HBV cccDNA beim HCV Core Genotyp 1a viel mehr ins Gewicht fällt als die Hemmung der HBV Kapsidsekretion. Vermutlich liegt damit auch der Angriffspunkt im HBV Replikationszyklus für den HCV Core Genotyp 1a an einer anderen Stelle als für den Genotyp 1b.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur interviralen Interaktion von HBV und HCV konnte bewiesen werden, dass HBV Kapside unter HCV Core retiniert und dass die HBV Virionen in den intrazellulären Infektionsweg umgeleitet werden. Dies erfolgt sowohl konzentrations- als auch genotypabhängig in unterschiedlichem Ausmaß. Inwiefern zelluläre Mechanismen eine Rolle für diese Interferenz spielen, muß in weiteren Arbeiten geklärt werden.

### **3.13 Auswirkungen des HCV Core Proteins auf die Produktion und Sekretion von HBeAg und HBsAg**

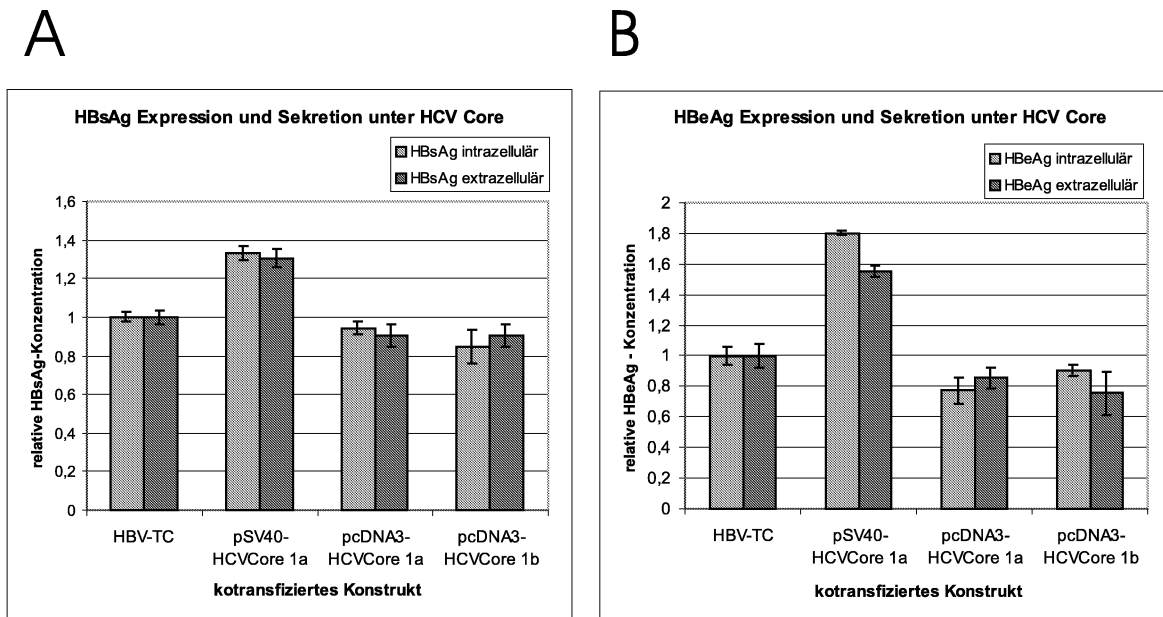
#### **3.13.1 Einleitung**

Klinische Daten beschreiben, dass HBV unter einer Koinfektion mit HCV Core häufig serologisch stumm, d.h. HBsAg- und HBeAg- negativ wird (siehe 1.3.3, S. 32, [146, 118, 166]). In diesem Experiment sollte ermittelt werden, inwieweit sich diese Beobachtungen auch im experimentellen in-vitro - Modell dieser Arbeit bestätigen lassen. Außerdem sollte analysiert werden, ob sich im Vergleich der intra- und extrazellulären HBsAg- und HBeAg-Konzentrationen Retentionseffekte darstellen, was ein Hinweis auf eine generelle Blockade des sekretorischen Signalwegs durch HCV Core wäre.

#### **3.13.2 Durchführung**

HuH7-Zellen wurden mit 2,5 µg pHBV1.5 und mit 5 µg HCV Core- (pcDNA3-HCV Core 1a und 1b, pSV40-HCV Core 1a) und Negativkontroll-Konstrukten (CMV-ORF2, SV40-ORF2) nach dem in 2.8.3 (S. 57) angegebenen Protokoll transient transfiziert. Am 4. Tag p.t. wurden sie lysiert (siehe 2.13, S. 62). Im Lysat und in 1,2 ml des Mediumüberstands wurden durch einen Micro Enzyme-linked Immunosorbent Assay (MEIA, Fa. Abbot) mit freundlicher Unterstützung der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Prof. Dr. Tillmann, HBeAg und HBsAg quantitativ bestimmt.





**Abbildung 3.34:** Die Dynamik der HBsAg- (a) und HBeAg- (b) Expression und Sekretion in pHBV1.5- und HCV Core-Konstrukt - kotransfizierten HuH7-Zellen. HBV-TC = HBV-Kontrolle, standardisiert auf 1.

### 3.13.3 Ergebnisse

Die Untersuchungen zur HBe-/HBsAg - Produktions- und Sekretionsinhibition durch das HCV Core Protein haben gezeigt, dass eine hohe Expression des HCV Core Proteins durch das pSV40-HCV Core 1a - Konstrukt ebenfalls zu einer Steigerung der HBe-/HBsAg - Produktion- und Sekretion führte. Bei der HBsAg-Produktion und Sekretion konnte eine Steigerung auf das 1,3-fache der nicht-HCV Core - kotransfizierten HBV-Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3.34, a, pSV40-HCV Core 1a und HBV-TC). Die Expression des HBeAg stieg sogar um das 1,8-fache, wurde aber nur 1,6-fach stärker sezerniert. Dies entspricht einer 1,12-fachen Retention von HBeAg bei hoher HCV Core Proteinkonzentration (Abb. 3.34, b, pSV40-HCV Core 1a und HBV-TC).

Im Gegensatz dazu konnte unter Kotransfektion mit den niedrig exprimierenden HCV Core - Konstrukten pcDNA3-HCV Core 1a und 1b eine geringe Repression der HBe-/HBsAg - Expression und Sekretion beobachtet werden. Die HBsAg-Expression fiel unter Kotransfektion mit dem pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt auf 95% der HBV-Kontrolle, unter pcDNA3-HCV Core 1b sogar auf 85%. Signifikante Unterschiede zwischen extrazellulärer und intrazellulärer HBsAg-Konzentration konnten nicht gezeigt werden (Abb. 3.34, a, pcDNA3-HCV Core 1a, 1b und HBV-TC). Die

Expression des HBeAg wurde unter Kotransfektion mit dem pcDNA3-HCV Core 1a - Konstrukt auf 80% des Wertes der HBV-Kontrolle reprimiert, unter pcDNA3-HCV Core 1b erfolgte nur eine Repression auf 90%. Während unter dem 1b-Konstrukt eine intrazelluläre HBeAg-Retention von etwa dem 1,2-fachen beobachtet werden konnte, war dies unter dem 1a-Konstrukt nicht der Fall (Abb. 3.34, b, pcDNA3-HCV Core 1a, 1b und HBV-TC).

### 3.13.4 Diskussion

Die serologischen Daten einer HBsAg negativen HBV-HCV Koinfektion konnten in diesem Experiment nicht reproduziert werden. Damit konnten auch bereits vorhandene in-vitro Daten über eine Reduktion der HBeAg-, HBsAg- Expression unter der HCV Core Kotransfektion auf 50% nicht bestätigt werden [188, 29].

Dies mag daran liegen, dass unterschiedliche Konzentrationen von HCV Core in der Zelle, wie bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, unterschiedliche Effekte haben. So kommt es unter hoch exprimierendem HCV Core (pSV40-HCVCORE 1a) zur Steigerung und unter niedrigem HCV Core (pcDNA3-HCVCORE) zur Repression der HBsAg- und HBeAg-Produktion. Dieser Befund steht in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen zur Regulation des HBV-Replikationszyklus durch das HCV Core Protein (siehe Abb. 3.32, S. 132).

Eine intrazelluläre Retention von HBsAg oder HBeAg – wie es die serologischen Daten der Koinfektion suggerieren – wurde nicht beobachtet [146, 118, 166]. Möglicherweise – dies wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht – ist die Repression von HBeAg und HBsAg auf die Regulation durch andere HCV-Proteine zurückzuführen.

Insgesamt muß festgestellt werden, dass die sekretionshemmenden Effekte des HCV Core Proteins quantitativ bei weitem nicht der Retention der intrazellulären HBV Kapside entsprechen. Somit ist wahrscheinlich, dass die Ausschleusungshemmung (siehe 3.11, S. 128 und 3.12, S. 133) der HBV Kapside wohl eher auf einer primären „Umleitung“ der Kapside in den intrazellulären Infektionsweg durch spezifische Modulation (z.B. Phosphorylierung von HBV Core) beruht, als auf einer generellen Blockade des zellulären sekretorischen Signalwegs.

## 3.14 Berechnung des Ortes der stärksten HBV-Kumulation

### 3.14.1 Einleitung

In den bisherigen Abschnitten ist deutlich geworden, dass das HCV Core Protein Einfluß auf die HBV Transkription, die Ausschleusung der HBV Kapside und auf die Bildung des intranukleären cccDNA-„Pools“ nimmt. Weiterhin wurde angedeutet, dass unterschiedliche HCV Genotypen und Core-Proteinkonzentrationen vermutlich an verschiedenen Stellen des HBV Replikationszyklus „aktiv“ werden (siehe 3.12.4, S. 135).

In diesem Abschnitt soll aus den vorhandenen Daten (HBV RNA, HBV DNA intrazellulärer und extrazellulärer Kapside, HBV cccDNA; Ergebnisse aus den Abschnitten 3.9 bis 3.12) eine Synopsis über den Angriffsort der drei untersuchten HCV Konstrukte (pSV40-HCVCORE 1a und pcDNA3-HCVCORE 1a und 1b) im HBV Replikationszyklus berechnet werden.

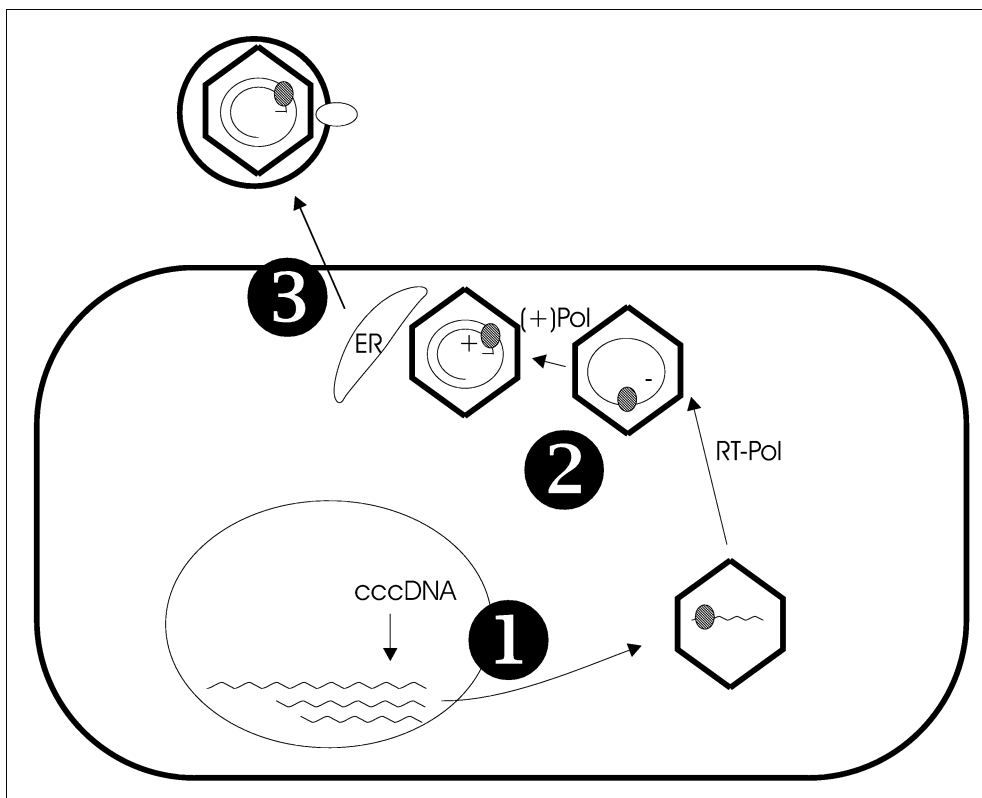
### 3.14.2 Durchführung der Berechnung

Grundlage für die Berechnung eines dimensionslosen Kumulationsindex für ein einzelnes Zellkompartiment (Nukleus, Zytoplasma, Zellmembran; siehe Abb. 3.35) ist die Vorstellung, dass HBV diese im Replikationszyklus in einer bestimmten Reihenfolge durchläuft (siehe 1.1.5, S. 19). Somit läßt sich aus dem Quotienten aus betrachtetem und nachgeschaltetem Kompartiment der Kumulationsindex berechnen. Werte größer 1 entsprechen einer Retention im entsprechenden Kompartiment, Werte kleiner 1 sind einer Verarmung des Kompartiments unter Kotransfektion mit den HCV Core Konstrukten gleichzusetzen.

Alle Berechnungen erfolgten auf Grundlage der bereits vorgestellten, gegenüber den Negativkontrollen relativierten Ergebnisse (Retentionsfaktoren/Sekretionsfaktoren).

#### 3.14.2.1 Kumulationsindex für den Zellkern (Nukleus)

Assoziiert mit dem nukleären Kompartiment ist die Transkription der mRNA aus der HBV cccDNA. Die RNA-Daten dieser Versuche können nicht zwischen mRNA und HBV pgRNA diskriminieren. Somit wird das nukleäre Kompartiment in dieser



**Abbildung 3.35:** Bezeichnung der Zellkompartimente anhand einer vereinfachten Skizze des HBV Replikationszyklus. (1) = Zellkern (Nukleus), (2) = Zytoplasma, (3) = sekretorischer Signalweg/Zellmembran.

Betrachtung ausgehend von der cccDNA bis zur enkapsidierten HBV RNA wie folgt berechnet:

$$\text{nukleärer Kumulationsindex} = \frac{\text{cccDNA} - \text{Retentionsfaktor}}{\text{RNA} - \text{Retentionsfaktor}} \quad (3.1)$$

**Beispiel:**

Berechnung des nukleären Kumulationsindexes für pHBV1.5 - pcDNA3-HCV Core 1b - kotransfizierte Zellen (Experimente 3.9, S. 117 und 3.12, S.133).

$$\begin{aligned} \text{nukleärer Kumulationsindex} &= \frac{5,41 - \text{fache cccDNA} - \text{Retention}}{0,87 - \text{fache RNA} - \text{Retention}} \quad (3.2) \\ &= 6,16 \end{aligned}$$

Dies bedeutet, dass nur ein Sechstel der im Zellkern akkumulierten HBV cccDNA im Zytoplasma als RNA messbar wurde.

### 3.14.2.2 Kumulationsindex für das Zytoplasma

Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zytoplasma findet die Prozessierung (reverse Transkription, Plusstrangsynthese) der HBV pgRNA zur HBV DNA und die Enkapsidierung statt. Daraus ergibt sich:

$$\text{Zytoplasmaindex} = \frac{\text{RNA} - \text{Retentionsfaktor}}{\text{DNA} - \text{Retentionsfaktor intrazellulärer Kapside}} \quad (3.3)$$

**Beispiel:**

Berechnung des zytoplasmatischen Kumulationsindex für pHBV1.5 - pcDNA3-HCV Core 1b - kotransfizierte Zellen (Experimente 3.9, S. 117 und 3.11, S. 128).

$$\begin{aligned} \text{Zytoplasmaindex} &= \frac{0,87 - \text{fache RNA} - \text{Retention}}{3,38 - \text{fache HBV} - \text{Vorläufer} - \text{DNA} - \text{Retention}} \quad (3.4) \\ &= 0,26 \end{aligned}$$

Dies bedeutet, dass das Vierfache der prozessierten RNA sich im sekretorischen Signalweg aufstaut.

### 3.14.2.3 Kumulationsindex für den sekretorischen Signalweg/Zellmembran

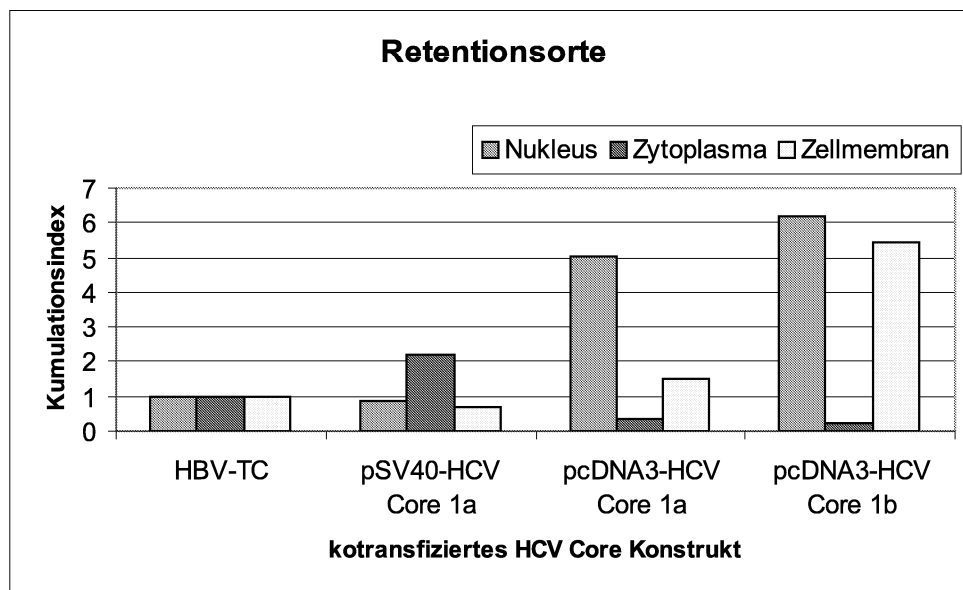
Im sekretorischen Signalweg und an der Zellmembran sind Prozesse assoziiert, die die Ausschleusung des Virions steuern. Werden Kapside in ihrer Ausschleusung gehemmt, dann erhöht sich der Zellmembranindex.

$$\text{Zellmembranindex} = \frac{\text{DNA} - \text{Retentionsfaktor intrazellulärer Kapside}}{\text{Kapsidsekretionsfaktor (DNA sezernierter Kapside)}} \quad (3.5)$$

**Beispiel:**

Berechnung des Kumulationsindex für den sekretorischen Signalweg/Zellmembran für pHBV1.5 - pcDNA3-HCV Core 1b - kotransfizierte Zellen (Experiment 3.11, S. 128).

$$\begin{aligned} \text{Zellmembranindex} &= \frac{3,38 - \text{fache HBV} - \text{Vorläufer} - \text{DNA} - \text{Retention}}{0,62 - \text{fache Kapsidsekretion}} \\ &= 5,44 \end{aligned} \quad (3.6)$$



**Abbildung 3.36:** Ergebnisse der HBV-Nukleinsäuren - Kumulationsindexberechnungen für die zellulären Kompartimente Zellkern (Nukleus), Zytoplasma und sekretorischer Signalweg/Zellmembran. Kumulationsindices  $>1$  entsprechen einer HBV-Retention, Werte  $<1$  einer Verarmung des jeweiligen Kompartiments an HBV-Nukleinsäuren. Zugrundegelegt sind die Ergebnisse der Abschnitte 3.9 bis 3.12, standardisiert auf die jeweiligen Promotorkompensierten HBV-Kontrollen (HBV-TC = 1).

Dies bedeutet, dass weniger als ein Fünftel der im sekretorischen Signalweg akkumulierenden HBV-Partikel sezerniert werden.

Eine gemeinsame Erhöhung der Kumulationsindices für die Zellmembran (=Retention der HBV-Vorläufer-DNA) und das nukleäre Kompartiment (HBV cccDNA) lassen den Rückschluß auf eine HBV Kapsid - Sekretionshemmung mit verstärktem intrazellulären Infektionsweg zu.

### 3.14.3 Ergebnisse der Kumulationsberechnungen

Abbildung 3.36 illustriert die Ergebnisse der Kumulationsindexberechnung. Unter hoher HCV Core Last (pSV40-HCV Core 1a) findet sich die stärkste HBV-Kumulation ( $> 2$ fach) zytoplasmatisch in der Phase der reversen Transkription von HBV RNA zur HBV Vorläufer-DNA. Dies spricht am ehesten für eine Beeinflussung der HBV Polymeraseaktivität und der HBV Enkapsidierung durch das HCV Core Protein. Sowohl nukleär als auch im sekretorischen Signalweg bzw. an der Zellmembran läßt sich keine Retention von HBV Kapsiden beobachten (Indices  $\leq 1$ ).

Andererseits fällt auf, dass es unter niedriger HCV Core Last beim HCV Genotyp 1b (Zellmembranindex  $> 5,5$ ) viel mehr als beim Genotyp 1a (Zellmembranindex = 1,5) zu einer HBV-Kapsid-Retention im sekretorischen Signalweg kommt (Abb. 3.36, Zellmembran, pcDNA3-HCV Core 1a und 1b). Außerdem wird eine 5,5-fache (pcDNA3-HCVCore 1a) bis 6-fache (pcDNA3-HCVCore 1b) nukleäre HBV cccDNA-Kumulation sichtbar, während das Zytoplasma an RNA verarmt (Indices  $< 0,5$ ).

### 3.14.4 Diskussion

Die bisher gewonnenen Ergebnisse einschließlich der integrierenden Kumulationsortberechnung von HBV-Kapsiden geben Hinweise auf molekularbiologische Erklärungsmöglichkeiten der klinisch sich unterschiedlich präsentierenden HBV-HCV - Koinfektion (siehe 1.3.2.2, S. 31). Verantwortlich für die unterschiedlichen Krankheitsverläufe sind vermutlich verschiedene hohe HCV Core Konzentrationen in den koinfizierten Hepatozyten.

Bisher wird die Frage, ob die beiden Hepatitisviren HBV und HCV in der gleichen Leberzelle präsent sind, kontrovers diskutiert (siehe 1.3.3, S. 32 [216, 205]). Dies läßt sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht endgültig klären. Die Tatsache, dass hier nur mit einem HCV Core - Konstrukt und nicht mit einem vollständigen HCV - Konstrukt gearbeitet wurde und dabei Ergebnisse erzielt werden konnten, die mit klinischen Beobachtungen korrelieren, macht intervirale Interaktionen sowohl durch interzelluläre (Zytokine) als auch intrazelluläre (Signalwege) Mechanismen erklärbar. Bemerkenswert ist, dass die Befunde zur Transkriptionsregulation sowohl im replikativen HBV-System als auch im Luciferaseassay, der ja nur die Regulation der freien Promotor- und Enhancer-Elemente mißt, verifiziert werden konnten (siehe 3.8, S. 112 und 3.9, S. 117). Dies macht eine intrazelluläre intervirale HBV-HCV - Interferenz wahrscheinlich.

#### 3.14.4.1 Die Regulation des HBV Replikationszyklus unter hoher HCV Core Proteinkonzentration

Bei einer hohen HCV Core Proteinkonzentration wird eine Steigerung der HBV Proteinexpression mit zytoplasmatischer Kumulation von RNA beobachtet. Die zytoplasmatische HBV RNA-Retention bestätigt die Ergebnisse von Chen et al., die eine Hybridisierung des HCV Core Proteins mit der HBV Polymerase und damit eine Hemmung der HBV Enkapsidierung in vitro postulierten (siehe 1.3.3.6, S. 34 [29]).

Eine Ausschleusungshemmung von HBV und „Triggerung“ des intrazellulären HBV-Infektionswegs spielt unter hoher HCV Core Proteinkonzentration anscheinend keine Rolle. Dies wird durch die Verarmung (Kumulationsindex  $< 1$ ) der Kompartimente Zellkern und sekretorischer Signalweg/Zellmembran deutlich.

#### **3.14.4.2 Die Regulation des HBV Replikationszyklus unter niedriger HCV Core Proteinkonzentration**

Im Gegensatz zu den experimentellen Ergebnissen bei hoher HCV Core Proteinkonzentration scheint die Enkapsidierungshemmung bei niedriger Konzentration keine Rolle zu spielen. Dies verdeutlichen die niedrigen Kumulationsindices ( $< 1$ ) für das Zytoplasma (=RNA) unter der Kotransfektion des pHBV1.5-Plasmids mit den Konstrukten pcDNA3-HCV Core 1a und 1b. Auch diese Interpretation geht mit den Ergebnissen von Chen et al. konform, die mit einem SV40-HCVCore Konstrukt (Genotyp 1b) Effekte auf die HBV Polymerase titrieren konnten, die vor allem konzentrationsabhängig waren [29].

In den hier vorgelegten Experimenten zeigte sich jedoch unter niedriger HCV Core Proteinkonzentration eine intrazelluläre Anreicherung von HBV Kapsiden (HBV Vorläufer-DNA) im Ausschleusungsschritt sowie eine intranukleäre Akkumulation von HBV cccDNA (Kumulationsindices für Zellmembran und Zellkern  $> 1$ ). Aufgrund der intrazellulären Retention der HBV Vorläufer-DNA kommt es zum Anschalten der intrazellulären Infektionsschleife cccDNA  $\rightarrow$  Vorläufer-DNA  $\rightarrow$  cccDNA, damit zum Schluß eines circulus vitiosus und zum Zusammenbrechen der Virus-Zell - Homöostase.

Aufgrund der Ergebnisse zur Sekretion der HBe-/HBsAg (siehe 3.13, S. 136), die nur eine – im Gegensatz zu den HBV Kapsiden – mäßige Retention unter HCV Core Einfluß zeigten, muß vermutet werden, dass der sekretorische Signalweg der Zelle nicht der Hauptangriffsort des HCV Core Proteins ist. Vielmehr scheint es spezifische HBV-HCV-Interaktionen zu geben (z.B. direktes „Triggern“ des intrazellulären Infektionswegs), die als Sekundäreffekt zu einer Kumulation von HBV Kapsiden im sekretorischen Signalweg beziehungsweise an der Zellmembran führen.

Als zusätzlicher Effekt konnte gezeigt werden, dass beim HCV Core Genotyp 1b die beschriebenen Retentionseffekte besonders ausgeprägt sind, so dass hier von Genotyp-spezifischen Wirkungen auf den HBV Replikationszyklus ausgegangen werden kann.



# Kapitel 4

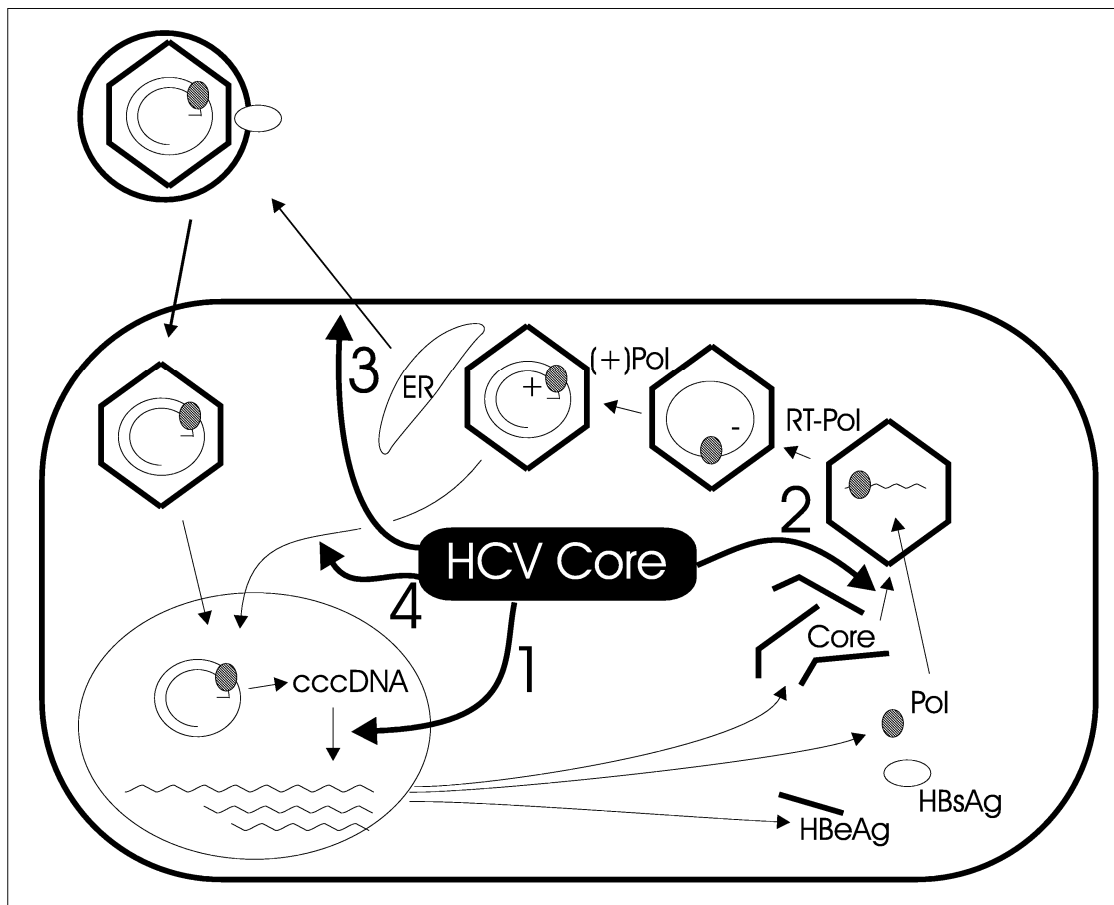
## Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Die Koinfektion mit dem Hepatitis B (HBV) und C (HCV) Virus stellt mit 10-20% einen beträchtlichen Anteil der chronischen viralen Hepatitiden dar. Klinisch präsentiert sie sich in den meisten Fällen als schwere Verlaufsform mit einem vermehrten Auftreten der Hepatitiskomplikationen Leberzirrhose, Hepatozelluläres Karzinom und fulminantes Leberversagen. Als Folge der Koinfektion kann es dabei in vielen Fällen zum serologischen Verstummen (HBsAg wird negativ) der HBV-Infektion kommen. Ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen dem schlechten klinischen Erscheinungsbild HBV-HCV-Koinfizierter und einer möglicherweise beeinträchtigten HBV Replikation konnte bisher nicht aufgezeigt werden.

In dieser Arbeit wurde die intervirale Interferenz des HCV Core Proteins mit dem HBV Replikationszyklus untersucht. Dabei konnten erstmals konzentrationsabhängige Wirkungen des HCV Core Proteins auf die HBV-Replikation identifiziert werden.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HCV Core Protein die Expression des HBV Core Proteins - einem Schlüsselement im HBV Replikationszyklus - konzentrationsabhängig reprimieren oder verstärken kann. Die Modulation der HBV Core - Transkription erfolgt, wie in HBV Reporterassays nachgewiesen werden konnte, durch Beeinflussung der HBV Core Promotor- und Enhancer-Aktivitäten. Bindungsstudien ließen jedoch keine direkte Affinität des HCV Core Proteins an diese Elemente erkennen. Das legt nahe, dass die Wirkungen von HCV Core indirekt über zelluläre Signaltransduktionssysteme mediiert werden muß.

In dieser Arbeit wurde weiterhin nachgewiesen, dass HCV Core in niedriger Kon-



**Abbildung 4.1:** Die Effekte des HCV Core Proteins auf Elemente des HBV-Replikationszyklus: Transkription (1), Enkapsidierung (2), Sekretion (3) und intrazellulärer Infektionsweg mit cccDNA-Pool (4).

zentration zu einer Repression der HBV Transkription (Abb. 4.1, 1), einer intrazellulären Kapsidretention (Abb. 4.1, 3) und zum Anstieg des intranukleären HBV cccDNA-„Pools“ (Abb. 4.1, 4) führt. Da die Sekretion der HBV Proteine HBeAg und HBsAg nicht signifikant beeinträchtigt war, ist davon auszugehen, dass das HCV Core Protein keine generelle Blockade des zellulären sekretorischen Signalwegs verursacht. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass HBV unter niedriger HCV Core Konzentration primär auf den intrazellulären Infektionsweg umschaltet (Abb. 4.1, 4) und infolgedessen Kapside und HBV Vorläufer-DNA intrazellulär akkumulieren. Die intrazelluläre Akkumulation der HBV Kapside und die Vergrößerung des HBV cccDNA-„Pools“ weisen auf eine Destabilisierung des HBV-Wirtszellverhältnisses hin, was nachweislich zytotoxisch ist [31]. Die Interferenz der beiden Hepatitisviren entspricht somit einer Dominanz des HCV Core Proteins über den HBV Replikati-

---

onszyklus mit möglicherweise schweren Folgen für den koinfizierten Patienten.

Hohe HCV Core - Konzentrationen aktivieren die HBV - Transkription (Abb. 4.1, 1), beschleunigen die Kapsidsekretion (Abb. 4.1, 3) und steigern die HBeAg- und HBsAg-Produktion. Sie führen zu keiner signifikanten Änderung der intranukleären HBV cccDNA-Konzentration (Abb. 4.1, 4). Diese Konstanz der HBV cccDNA-Homöostase kann als Indikator für ein stabiles HBV-Wirtszell - Verhältnis angesehen werden (siehe 1.1.5.1, S. 19). Die HBV-HCV - Interferenz entspricht also bei hohen HCV Core Konzentrationen einem „friedlichen Miteinander“.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit mit bereits vorliegenden Analysen (siehe [29]) machen eine Interferenz hoher HCV Core Konzentrationen auf die HBV Replikation auf der Stufe der HBV Kapsidbildung dennoch wahrscheinlich. Demnach führen hohe HCV Core Konzentrationen auch zu hohen HBV RNA - Konzentrationen (Aktivierung der Transkription), welche die HBV Kapsidbildung reprimieren können [29]. Eben dies ist mit der Messung einer verminderten Zahl intrazellulär vorhandener HBV Kapside (HBV Vorläufer-DNA) unter hoher HCV Core Konzentration in der vorliegenden Arbeit bestätigt und gezeigt worden (Abb. 4.1, 2).

Zusammenfassend hat sich durch die vorliegende Arbeit gezeigt, dass das HCV Core Protein die Replikation des HBV erheblich deregulieren kann. Besonders unter niedrigen HCV Core Konzentrationen kommt es zu einer dramatischen Destabilisierung der HBV-cccDNA - Homöostase und damit des Virus-Wirtszell-Gleichgewichtes. Denkbar ist, dass Patienten mit einer stabilen Virus-Wirtszell - Homöostase bessere klinische Verläufe als solche mit einem instabilen Gleichgewicht zeigen. Somit bleibt zu untersuchen, ob das quantitative HBV-DNA - HCV-RNA - Verhältnis im Blut koinfizierter Patienten Auskunft über einen derart stabilen/instabilen Verlauf und damit über eine Prognose geben kann. Weiterhin sollte das bis hierhin etablierte Modell einer Koinfektion durch den Einsatz replikationskompetenter HCV Konstrukte erweitert werden, um festzustellen, ob derart hohe HCV Core Lasten durch die HCV-Biologie denkbar sind (siehe 1.2.5.2, S. 27 und [121]).

# Abkürzungen

**APS** Ammoniumpersulfat

**ARP1** apoAI regulatory protein

**AS** Aminosäure

**ATP** Adenosintriphosphat

**bcp** „basic Core Promotor“

**BSA** Bovines Serum Albumin

**bp** „base pairs“, Basenpaare

**bzw.** beziehungsweise

**C/EBP** CCAAT/enhancer binding protein

**Caspase** Cysteine-Protease mit Aspartat-Spezifität

**cccDNA** covalently closed circular DNA

**CD** Cluster of Differentiation

**CDK** Cyclin-dependent kinase

**CMV** Zytomegalovirus

**COUP-TF** chicken ovalbumin promotor-transcription factor

**cpm** counts per minute

**CREB** cAMP response element-binding protein

**CURS** Core upstream regulatory sequence

**Da** Dalton, 1 Dalton = 1u =  $1,66 \times 10^{-27}$  kg

**DAG** Diacylglycerol

**DKFZ** Deutsches Krebsforschungszentrum

**DMSO** Dimethylsulfoxid

**DTT** Dithiotreitol

**dNTP** desoxyribo-Nukleotid-Tri-Phosphat

**E2F** Familie von Transkriptionsfaktoren

**EDTA** ethylene diamine tetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)

---

<b>eIF</b> eukaryotic initiation factor, Translationsfaktor	<b>MAPK</b> Mitogen-activated protein kinase
<b>ELISA</b> Enzyme linked immuno-sorbent assay	<b>MCS</b> „Multiple Cloning Site“, Mehrfachklonierungsstelle
<b>enh1XP</b> Enhancer 1 und X-Promotor	<b>MEK</b> MAPK/Erk kinase
<b>ER</b> Endoplasmatisches Retikulum	<b>MEIA</b> Micro Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>Erk</b> Extracellular signal-regulated kinase	<b>MOPS</b> 3-(N-morpholino)pronsulfonsäure
<b>FADD</b> Fas-associated protein mit death-domain	<b>NF<math>\kappa</math>B</b> Nuclear factor $\kappa$ B
<b>FAM</b> 6-FAM, 6-Carboxyfluorescein	<b>NRE</b> negative regulatory element
<b>fcp</b> „full length core promotor“	<b>NS</b> „non-structural“, Nichtstruktur
<b>FKS</b> Fetales Kälber Serum	<b>NTC</b> No Template Control, Negativkontrolle
<b>FP</b> Vorwärtsprimer	<b>OD</b> Optische Dichte
<b>GAPDH</b> Glycerolaldehydphosphat-Dehydrogenase	<b>ONPG</b> o-Nitrophenyl $\beta$ -D-Galactopyranoside
<b>GFP</b> Grün Fluoreszierendes Protein	<b>PBS</b> Phosphat-gepufferte Saline
<b>GPT</b> Glutamat-Pyruvat-Transaminase = Alaninaminotransferase (ALAT)	<b>PCR</b> „Polymerase Chain Reaction“, Polymerasekettenreaktion
<b>HBV</b> Hepatitis B Virus	<b>PEG</b> Polyethylenglykol
<b>HBV-TC</b> HBV Test-Control, HBV-Kontrolle	<b>pgRNA</b> prägenomische RNA
<b>HCC</b> Hepatozelluläres Karzinom	<b>PKA</b> Proteinkinase A
<b>HCV</b> Hepatitis C Virus	<b>PKC</b> Proteinkinase C
<b>HDL</b> High Density Lipoprotein	<b>PPAR</b> Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>HIV</b> Humanes Immundefizienz Virus	<b>pRb</b> Retinoblastoma protein, ein Tumor Suppressor
<b>HNF</b> Hepatozyte nukleärer Faktor	<b>p.t.</b> post transfectionem
<b>hnRNP</b> heterogenous nuclear Ribonukleoprotein	<b>qPCR</b> quantitative PCR
<b>IE</b> Internationale Einheiten	<b>RLU</b> relative Lichteinheit
<b>IFN</b> Interferon	<b>RNLE</b> „Rat nuclear liver extract“
<b>IGF</b> Insulin-like Growth Factor	<b>RP</b> Rückwärtsprimer
<b>IRES</b> Internal Ribosomal Entry Site	<b>rpm</b> rounds per minute
<b>Jak</b> Tyrosinkinase der Janus-Familie	<b>rRNA</b> ribosomale RNA
<b>JNK</b> Jun N-terminal kinase	<b>RSV</b> Rous Sarcoma Virus
<b>kb</b> Kilobasen	<b>RT</b> reverse Transkriptase
<b>LB</b> Luria Broth	<b>RT-qPCR</b> Reverse Transkriptase qPCR
<b>LDL</b> Low Density Lipoprotein	<b>RXR</b> Retinoid X receptor
<b>LEF</b> liver enriched factor (bestehend aus ARP1, COUP-TF, HNF4, RXR,PPAR)	<b>s.c.</b> subkutan
<b>LT</b> Lymphotoxin = TNF- $\beta$	<b>SDS</b> Natriumdodecylsulfat

**SSC** Standard Natriumcitrat

**Stat** „Signal transducer and activator of transcription2“

**SV40** Simian Virus 40

**TATA-Box** konservierte TA-Region in eukaryontischen Promotoren

**TAMRA** 5-/6-Carboxytetramethylrhodamine

**TBE** Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

**TBP** TATA-binding protein

**TNF** Tumor Nekrose Faktor

**TP** Taq-Probe

**TRADD** TNF receptor-1-associated death domain protein

**TRAF2** TNF receptor-associated factor 2

**Tris** Tris(hydroxymethylaminomethan)

**TRITC** Tetramethylrhodamin Isothiocyanat Isomer R

**URR** „upper regulatory region“

**UTR** „Untranslated Region“

**WHO** „World Health Organization“, Welt-Gesundheitsorganisation

**X-Gal** 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-Galactopyranosid

**z.B.** zum Beispiel

# Literaturverzeichnis

- [1] Taqman one-step RT-PCR master mix reagents kit protocol. PE Corporation, 1999.
- [2] A. Abe, K. Inoue, T. Tanaka, J. Kato, N. Kajiyama, S. Kawaguchi, R. Tanaka, M. Yoshiba, and M. Kohara. Quantification of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *Clin Microbiol*, 37(9):2899–903, 1999.
- [3] M. Aboud, M. Wolfson, Y. Hassan, and M. Huleihel. Rapid purification of extracellular and intracellular moloney murine leukemia virus. *Arch Virol*, 71:185–195, 1982.
- [4] G. Acs, M.A. Sells, and R.H. et Al. Purcell. Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci*, 84:4641–44, 1987.
- [5] J.Y. Ahn, E.Y. Jung, and H.J. et Al. Kwun. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol*, 83:2765–72, 2002.
- [6] S. Akhter, M.Q. Talukder, N. Bhuiyan, T.A. Chowdhury, M.N. Islam, and S. Begum. Hepatitis B virus infection in pregnant mothers and its transmission to infants. *Indian J Pediatr*, 59(4):411–5, 1992.
- [7] J. Alam and J.L. Cook. Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, 188:245, 1990.
- [8] H. Aoki, J. Hayashi, M. Moriyama, Y. Arakawa, and O. Hino. Hepatitis C virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *Virology*, 74(4):1736–41, 2000.
- [9] L. Arribillaga, AL de Cerio, P Sarobe, N Casares, M. Gorraiz, A. Vales, O. Bruna-Romero, F. Borrás-Cuesta, G. Paranhos-Baccala, J. Prieto, J Ruiz, and JJ. Lasarte. Vaccination with an adenoviral vector encoding hepatitis c virus (HCV) NS3 protein protects against infection with HCV-recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 21:202–10, 2002.
- [10] S.I. Asabe, Y. Tanji, S. Satoh, T. Kaneko, K. Kimura, and K. Shimotohno. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol*, 71:790–796, 1997.
- [11] G. Barba, F. Harper, and T. et al. Harada. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:1200–1205, 1997.
- [12] R. Bartenschlager, L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*, 68(8):5045–5055, 1994.
- [13] R. Bartenschlager and V. Lohmann. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 81:1631–1648, 2000.
- [14] S.E. Behrens, L. Tomei, and R. De Francesco. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO Journal*, 15:12–22, 1996.
- [15] T. Berg, C. Sarrazin, E. Herrmann, H. Hinrichsen, T. Gerlach, R. Zachoval, B. Wiedenmann, U. Hopf, and S. Zeuzem. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: Significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology*, 37(3):600–9, 2003.
- [16] O.J. Bjerrum and C. Schafer-Nielsen. *Electrophoresis '86*, chapter Buffer Systems and Transfer Parameters for Semidry Electrophoresis with a Horizontal Apparatus., pages 315–327. VCH Publishers, Deerfield Beach, Fla., 1986.
- [17] E. Blanchard, D. Brand, S. Trassard, A. Goudeau, and P. Roingeard. Hepatitis C virus-like particle morphogenesis. *J Virol*, 76(8):4073–4079, 2002.
- [18] B.S. Blumberg, B.J. Gerstley, D.A. Hungerford, W.T. London, and A.I. Sutnick. A serum antigen (australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 66(5):924–31, 1967.
- [19] C. Bock, N.-P. Malek, H.-L. Tillmann, M.-P. Manns, and C. Trautwein. The Enhancer I Core Region Contributes to the Replication Level of Hepatitis B Virus in Vivo and in Vitro. *J Virol*, 74:2193–2202, 2000.
- [20] M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254, 1976.

- [21] Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, and Jameson. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill, 15th edition, 2002.
- [22] V. Bruss and D. Ganem. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:1059–1063, 1991.
- [23] V. Bruss and W.-H. Gerlich. Formation of transmembranous hepatitis b e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology*, 163:268–275, 1988.
- [24] A. Budkovska, J.-W.-K. Shih, and J.-L. Gerin. Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HbcAg). *J Immunol*, 118:1300–1350, 1977.
- [25] H.L.Y. Chan, M. Hussain, and A.S.F. Lok. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promotor and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology*, 29:976–984, 1999.
- [26] I. Chemin, F. Zoulim, P. Merle, A. Arkhis, M. Chevallerier, A. Kay, L. Cova, P. Chevallerier, B. Mandrand, and C. Trepo. High incidence of hepatitis B infections among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol*, 34(3):447–54, 2001.
- [27] C. Chen and H. Okayama. High efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 7:2745–2752, 1987.
- [28] I.H. Chen, C.J. Huang, and L.P. Ting. Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promotor of hepatitis B virus. *J Virol*, 69:3647–3657, 1995.
- [29] SY Chen, CF Kao, CM Chen, CM Shih, MJ Hsu, CH Chao, SH Wang, LR You, and YH Wu Lee. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*, 2002.
- [30] M. Chiaramonte, T. Stroffolini, A. Vian, M.A. Stazi, A. Floreani, U. Lorenzoni, S. Lobello, F. Farinati, and R. Naccarato. Rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with compensated viral cirrhosis. *Cancer*, 85(10):2132–7, 1999.
- [31] F. Chisari, P. Fillipi, A. MacLachlan, D. Milich, M. Riggs, S. Lee, R. Palmiter, C. Pinkert, and R. Brinster. Expression of hepatitis B large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. *J Virol*, 60:880–887, 1986.
- [32] J. Cho, W. Baek, S. Yang, J. Chang, Y.C. Sung, and M. Suh. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1538(1):59–66, 2001.
- [33] J.W. Cho, W. K. Baek, S.I. Suh, S. H. Yang, J. Chang, Y.C. Sung, and M.H. Suh. Hepatitis C virus core protein promotes cell proliferation through the upregulation of cyclin e expression levels. *Liver*, 21(2):137–42, 2001.
- [34] K.L. Choo, G. Kuo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, and M. Houghton. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. *Science*, 244:359–362, 1989.
- [35] C.M. Chu, C.T. Yeh, and Y.F. Liaw. Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: Increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut*, 45(4):613–17, 1999.
- [36] Y.M. Chung, K.J. Park, S.Y. Choi, S.B. Hwang, and S.Y. Lee. Hepatitis C virus core protein potentiates TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(1):15–19, 2001.
- [37] M. Classen, V. Diehl, and K. Kochsiek. *Innere Medizin*. Urban und Schwarzenberg, 1994.
- [38] M. Cornberg, D. Huppe, J. Wiegand, G. Felten, H. Wedemeyer, and M.P. Manns. Treatment of chronic hepatitis C with PEG-interferon alpha-2b and ribavirin: 24 weeks of therapy are sufficient for HCV genotype 2 and. *Z Gastroenterol*, 41(6):517–22, 2003.
- [39] C.Y. Dai, M.L. Yu, W.L. Chuang, Z.Y. Lin, S.C. Chen, M.Y. Hsieh, L.Y. Wang, J.F. Tsai, and W.Y. Chang. Influence of hepatitis C virus on the profiles of patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*, 16(6):597–8, 2001.
- [40] D.S. Dane, C.H. Cameron, and M. Briggs. Virus-like particles in serum of patients with australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1(7649):695–8, 1970.
- [41] G.L. Davis. Hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Am J Med*, 107(6B):21S–26S, 1999.
- [42] R. De Francesco. Molecular virology of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, pages 47–52, 1999.
- [43] V. Deleersnyder, A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol*, 71:697–704, 1997.
- [44] Persing. D.H., H.E. Varmus, and D. Ganem. A frameshift mutation in the pre S region of the human hepatitis B virus genome allows production of surface antigen particles but eliminates binding to polymerized albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82:3440–3444, 1985.
- [45] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, and R.G. Roeder. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acis Res*, 11:1475–1489, 1983.



- [46] F.L. Dumoulin, A. Von Dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J.R. Wands, T. Sauerbruch, and U. Spengler. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, 305(2):260–6, 2003.
- [47] D. Egger, B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H.E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol*, 76(12):5974–84, 2002.
- [48] HB. El-Serag. Hepatocellular carcinoma: An epidemiologic view. *J Clin Gastroenterol*, 35(5 Suppl 2):S72–8, 2002.
- [49] N. Enomoto, I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, and C. Yamamoto. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med*, 334:77–81, 1996.
- [50] A. Erhardt, M. Hassan, T. Heintges, and D. Haussinger. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Cell Proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP-Kinases together with the MAP Kinase Phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off Cell Line. *Virology*, 292(2):272–84, 2002.
- [51] C. Failla, L. Tomei, and R. de Francesco. Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*, 68:3753–3760, 1994.
- [52] O. Faktor and Y. Shaul. The integration of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-1 tax. *Oncogene*, 5:867–872, 1990.
- [53] V. Th. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)*, 2:55–75, 1948.
- [54] M. Fried and D.M. Crothers. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucl Acids Res*, 9:6505–6525, 1981.
- [55] K. Fukuda, K. Tsuchihara, M. Hijikata, S. Nishiguchi, T. Kuroki, and K. Shimotohno. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology*, 33(1):159–65, 2001.
- [56] R. Fukuda, N. Ishimura, M. Niigaki, S. Hamamoto, S. Stoh, S. Tanaka, Y. Kushiya, Y. Uchida, S. Iihara, S. Akagi, M. Watanabe, and Y. Kinoshita. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: Clinical and virological significance. *J Med Virol*, 58(3):201–7, 1999.
- [57] Don Ganem. *Hepadnaviridae and Their Replication*, chapter 35, pages 1199–1223. Fundamental Virology. Lippincott-Raven, 3rd edition, 1996.
- [58] P.-D. Garcia, J.-H. Ou, W.-J. Rutter, and P. Walter. Targeting of hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: After signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product release into the cytoplasm. *J Cell Biol*, 106:1093–1104, 1988.
- [59] C. J. Gerard, L.M. Andrejka, and R.A. Macina. Mitochondrial ATP synthase 6 as an endogenous control in the quantitative RT-PCR analysis of clinical cancer samples. *Molecular Diagnosis*, 5:39–46, 2000.
- [60] U.E. Gibson, C.A. Heid, and P.M. Williams. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6(10):995–1001, 1996.
- [61] A. Grakoui, D.W. McCourt, C. Wychowski, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90:10583–10587, 1993.
- [62] A. Grakoui, C. Wychowski, C. Lin, S.M. Feinstone, and C.M. Rice. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*, 67:1385–1395, 1993.
- [63] R. et al. Guan. Interferon monotherapy in chronic hepatitis. *J-Gastroenterol-Hepatol*, 15:E34–40, 2000.
- [64] C. Guha, S.J. Shah, S.S. Ghosh, S.W. Lee, N. Roy-Chowdhury, and J. Roy-Chowdhury. Molecular therapies for viral hepatitis. *BioDrugs*, 17:81–91, 2003.
- [65] M. Guido, S.N. Thung, G. Fattovich, R. Cusinato, G. Leandro, A. Cecchetto, S. Cesaro, P. Panese, and M. Ruge. Intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens: Effect of hepatitis C virus infection. *Mod Pathol*, pages 599–603, 1999.
- [66] S. Gunther, S. Baginski, H. Kissel, P. Reinke, D.H. Kruger, H. Will, and H. Meisel. Accumulation and persistence of hepatitis B virus core gene deletion mutants in renal transplant patients are associated with end-stage liver disease. *Hepatology*, 24(4):751–8, 1996.
- [67] W. Guo, M. Chen, T.S. Yen, and J.H. Ou. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol Cell Biol*, 13(1):443–8, 1993.
- [68] S.J. Hadziyannis and G.V. Papatheodoridis. Peginterferon-alpha2a (40 kDa) for chronic hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother*, 4(4):541–51, 2003.
- [69] H.J. Han, E.Y. Jung, W.J. Lee, and K.L. Jang. Cooperative repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression by hepatitis B virus X protein and hepatitis C virus core protein. *FEBS Lett*, 518(1-3):169–72, 2002.

- [70] C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6(10):986–994, 1996.
- [71] F.J. Hensel, T. Heintges, W. Petry, C. Niederau, and D. Häussinger. Verlaufsformen der chronischen hepatitis C bei viralen koinfektionen und zusätzlichen lebererkrankungen. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 123:161–166, 1998.
- [72] R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, and R. Grifith. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4):413–417, 1992.
- [73] M. Hijikata, H. Mizushima, Y. Tanji, Y. Komoda, Y. Hirowatari, T. Akagi, N. Kato, K. Kimura, and K. Shimotohno. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, pages 10773–10777, 1993.
- [74] M. Hiraga, A. Nishizono, K. Mifune, M. Esumi, and T. Shikata. Analysis of the upstream region of hepatitis B virus core gene using an in vitro transcription system. *J Med Virol*, 43:404–11, 1994.
- [75] M. Hiratsuka, Y. Agatsuma, and M. Mizugaki. Rapid detection of CYP2C9\*3 alleles by real-time fluorescence PCR based on SYBR green. *Mol Genet Metab*, 68(3):357–362, 1999.
- [76] R. Hirsch, J. Lavine, L. Chang, H. Varmus, and D. Ganem. Polymerase gene products of Hepatitis B Viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature*, 344:552–555, 1990.
- [77] Hirt. Extraction of episomal DNA. *J Mol Biol*, 26:365–369, 1967.
- [78] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′–3′ exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(16):7276–7280, 1991.
- [79] E.J. Huang, T.L. Wright, J.R. Lake, C. Combs, and L.D. Ferrell. Hepatitis B and C coinfections and persistent hepatitis B infections: Clinical outcome and liver pathology after transplantation. *Hepatology*, 23(3):396–404, 1996.
- [80] J.M. Huang, T.H. Huang, H.Y. Qiu, X.W. Fang, T.G. Zhuang, H.X. Liu, Y.H. Wang, L.Z. Deng, and J.W. Qiu. Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes. *World J Gastroenterol*, 9(4):736–40, 2003.
- [81] P. Hussy, H. Langen, J. Mous, and H. Jacobsen. Hepatitis C virus core protein: Carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology*, 224:93–104, 1996.
- [82] G. Ideo and A. Bellobuono. New therapies for the treatment of chronic hepatitis C. *Curr Pharm Des*, 8(11):959–66, 2002.
- [83] S. Ishida, M. Kaito, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohora, N. Fujita, J. Ikoma, Y. Adachi, and S. Watanabe. Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatology Res*, 20(3):335–347, 2001.
- [84] S. Ishido, T. Fujita, and H. Hotta. Complex formation of NS5B with NS3 and NS4A proteins of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244:35–40, 1998.
- [85] T. Ito, S.M. Tahara, and M.M. Lai. The 3′-untranslated region of Hepatitis C Virus RNA enhances translation from an Internal Ribosomal Entry Site. *Journal of Virology*, 72(11):8789–8796, 1998.
- [86] V. Jain and I. Magrath. A chemiluminescent assay for quantification of  $\beta$ -galactosidase in the femtogram range: Application to quantitation of  $\beta$ -galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal Biochem*, 199:119–124, 1991.
- [87] W. Jessner, R. Stauber, F. Hackl, C. Datz, T. Watkins-Riedel, H. Hofer, A. Gangl, H. Kessler, and P. Ferenci. Early viral kinetics on treatment with pegylated interferon-alpha-2a in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Viral Hepat*, 10(1):37–42, 2003.
- [88] J.L. Johnson, A.K. Raney, and A. McLachlan. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology*, 208:147–158, 1995.
- [89] E.Y. Jung, M.N. Lee, H.Y. Yang, D. Yu, and K.L. Jang. The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of p21 (waf1) is regulated by protein kinase a-mediated phosphorylation. *Virus Res*, 79:109–115, 2001.
- [90] M. Kann and W.H. Gerlich. Effect of core protein phosphorylation by protein kinase c on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol*, 68:7993–8000, 1994.
- [91] J.H. Kao, P.J. Chen, M.Y. Lai, and D.S. Chen. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Microbiol*, 40(11):4068–71, 2002.
- [92] J.H. Kao, P.J. Chen, M.Y. Lai, and D.S. Chen. Sequence analysis of pre-s/surface and pre-core/core promoter genes of hepatitis B virus in chronic hepatitis C patients with occult HBV infection. *J Med Virol*, 68(2):216–20, 2002.
- [93] U.S. Karnam and K.R. Reddy. Pegylated interferons. *Clin Liver Dis*, 7(1):139–48, 2003.

- [94] N. Kato. Genome of human hepatitis C virus (HCV): Gene organization, sequence diversity, and variation. *Microbial & Comparative Genomics*, 5(3):129–151, 2000.
- [95] F. Kayser, K. Bienz, J. Eckert, and R. Zinkernagel. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1998.
- [96] L. Kazemi-Shirazi, D. Petermann, and C. Muller. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 33(5):785–90, 2000.
- [97] S.N. Kazim, S.M. Wakil, L.A. Khan, S.E. Hasnain, and S.K. Sarin. Vertical transmission of hepatitis B virus despite maternal lamivudine therapy. *Lancet*, 359(9316):1488–9, 2002.
- [98] A.S. Kekule, U. Lauer, L. Weiss, B. Lubber, and P. Hofschneider. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumor promoter signalling pathway. *Nature*, 361:742–745, 1993.
- [99] K. Kidd-Ljunggren, M. Öberg, and A.H. Kidd. Hepatitis B virus X gene 1751-1764 mutations: Implications for HBeAg status and disease. *J Gen Virol*, 78:1469–1478, 1997.
- [100] J.S. Kieft, K. Zhou, A. Grech, R. Jubin, and J.A. Doudna. Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature Structural Biology*, 9(5):370–374, 2002.
- [101] M. Kim, H. Kim, S.P. Cho, and M.K. Min. Template requirements for de novo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5b polymerase on the viral X RNA. *J Virol*, 76(14):6944–56, 2002.
- [102] W.H. Kim, F. Hong, B. Jaruga, Z. Hu, S. Fan, T.J. Liang, and B. Gao. Additive activation of hepatic NF-kappaB by ethanol and hepatitis B protein X (HBX) or HCV core protein: Involvement of TNF-alpha receptor 1-independent and -dependent mechanisms. *FASEB J*, 15(13):2551–3, 2001.
- [103] U. Klingmüller and H. Schaller. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol*, 67:7414–7422, 1993.
- [104] B. B. Knowles, C. C. Howe, and D. P. Aden. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209:497–499, 1980.
- [105] A. Kramvis and M. C. Kew. The core promoter of Hepatitis B Virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 6:415–427, 1999.
- [106] A. Kramvis and M.C. Kew. Structure and function of the encapsidation signal of hepadnaviridae. *J Viral Hepat*, 5(6):357–67, 1998.
- [107] M. Kunkel, M. Lorinczi, R. Rijnbrand, S.M. Lemon, and S.J. Watowich. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 75(5):2119–29, 2001.
- [108] M. Kunkel and S.J. Watowich. Conformational changes accompanying self-assembly of the hepatitis C virus core protein. *Virology*, 294(2):239–45, 2002.
- [109] J.A. Kwon and H.M. Rho. Hepatitis B viral core protein activates the hepatitis B viral enhancer II/pregenomic promoter through the nuclear factor kappaB binding site. *Biochem Cell Biol*, 80(4):445–55, 2002.
- [110] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [111] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescent Spectroscopy*, chapter 10, Energy Transfer, pages 303–339. Plenum Press, N.Y., 1983.
- [112] B.P. Lamphear, C.C. Jr Linnemann, and C.G. et al. Cannon. Hepatitis C virus infection in health-care workers: Risk of exposure and infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15:745–50, 1994.
- [113] A. Laras, J. Koskinas, and S.J. Hadziyannis. In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter. *Virology*, 295(1):86–96, 2002.
- [114] T. Laskus, J. Rakela, M.J. Nowicki, and D.H. Persing. Hepatitis B virus core promoter sequence analysis in fulminant and chronic hepatitis B. *Gastroenterol*, 109:1618–1623, 1995.
- [115] G.K. Lau, P.C. Wu, C.K. Lo, V. Lau, and S.K. Lam. Histological changes of concurrent hepatitis C virus infection in asymptomatic hepatitis B virus patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 13(1):52–56, 1998.
- [116] J.Y. Lau, G.L. Davis, and L.E. et Al. Prescott. Distribution of hepatitis C virus genotypes determined by line probe assay in patients with chronic hepatitis C seen as tertiary referral centers in the united states. hepatitis interventional therapy group. *Ann Intern Med*, 124:868–876, 1996.
- [117] C.M. Lauer and B.D. Walker. Hepatitis infection. *New England Journal of Medicine*, 345:41–52, 2001.
- [118] D.S. Lee, K. Huh, E.H. Lee, D.H. Lee, K.S. Hong, and Y.C. Sung. HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: Possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *J Gastroenterol Hepatol*, 12(12):855–866, 1997.
- [119] S.G. Lee and H.M. Rho. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene*, 19(3):468–71, 2000.

- [120] R.J. Lenhoff and J. Summers. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol*, 68:4565–4571, 1994.
- [121] D. Li, S.T. Takyar, W.B. Lott, and E.J. Gowans. Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in Huh7 and CV-1 cells. *J Gen Virol*, 84:815–25, 2003.
- [122] Y.F. Liaw. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology*, 22:1101–8, 1995.
- [123] Y.F. Liaw, C.T. Yeh, and S.L. Tsai. Impact of acute hepatitis B virus superinfection on chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 95(10):2978–2980, 2000.
- [124] C.J. Liu, P.J. Chen, M.Y. Lai, J.H. Kao, Y.M. Jeng, and D.S. Chen. Ribavirin and interferon is effective for hepatitis C virus clearance in hepatitis B and C dually infected patients. *Hepatology*, 37(3):568–76, 2003.
- [125] K.J. Livak, S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4(6):357–362, 1995.
- [126] S.Y. Lo, F. Masiarz, S.B. Hwang, M.M.C. Lai, and J.H. Ou. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology*, 213:455–461, 1995.
- [127] S.Y. Lo, M. Selby, M. Tong, and J.H. Ou. Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: Two alternative forms determined by a single amino acid substitution. *Virology*, 199:124–131, 1994.
- [128] S.Y. Lo, M.J. Selby, and J.H. Ou. Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol*, 70(8):5177–5182, 1996.
- [129] K. Loeb, K. Jerome, J. Goddard, M. Huang, A. Cent, and L. Corey. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology*, 32(3):626–9, 2000.
- [130] M. Lopez-Cabrera, J. Letovsky, K.Q. Hu, and A. Siddiqui. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology*, 183:825–829, 1991.
- [131] B. Lubber, U. Lauer, L. Weiss, M. Hohne, P. Hofschneider, and A. Kekule. The hepatitis B virus transactivator HBx causes elevation of diacylglycerol and activation of protein kinase C. *Res Virol*, 144:311–321, 1993.
- [132] P.J. Lukavsky, G.A. Otto, A.M. Lancaster, P. Sarnow, and Puglisi J.D. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosomal entry site function. *Nature Structural Biology*, 7(2):1105–1110, 2000.
- [133] A. Machida, S. Kishimoto, H. Ohnuma, K. Baba, Y. Ito, H. Miyamoto, G. Funatsu, and K. Oda. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the region of hepatitis B virus deoxyribonucleic bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology*, 86:910–918, 1984.
- [134] H. Maguire, J. Hoeffler, and A. Siddiqui. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, 252:842–844, 1991.
- [135] M. Martell, J. Gomez, J.I. Esteban, S. Sauleda, J. Quer, B. Cabot, R. Esteban, and J. Guardia. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis c virus RNA. *J Clin Microbiol*, 37(2):327–332, 1999.
- [136] G. Martire, A. Viola, L. Iodice, L.V. Lotti, R. Gradini, and S. Bonatti. Hepatitis C virus structural proteins reside in the endoplasmic reticulum as well as in the intermediate compartment/cis-golgi complex region of stably transfected cells. *Virology*, 280(2):176–82, 2001.
- [137] W. Mason, C. Aldrich, J. Summers, and J.M. Taylor. Asymmetric replication of Duck Hepatitis B Virus DNA in liver cells: Free minus strand DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:3007–4001, 1982.
- [138] M. Matsui, O. Moriya, and T. Akatsuka. Enhanced induction of hepatitis c virus-specific cytotoxic t lymphocytes and protective efficacy in mice by DNA vaccination followed by adenovirus boosting in combination with the interleukin-12 expression plasmid. *Vaccine*, 21:1629–39, 2003.
- [139] M. Matsumoto, S.B. Hwang, K.S. Jeng, N. Zhu, and M.M.C. Lai. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology*, 218:43–51, 1996.
- [140] P. Maupas, J.P. Chiron, and F. et Al. Barin. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention of early HBsAg carrier state in children. controlled trial in an endemic area (senegal). *Lancet*, 1(8215):289–92, 1981.
- [141] J.G. McHutchinson, S.G. Gordon, and E.R. et Al. Schiff. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*, 339:1485–1492, 1998.
- [142] J. McLaughlan. Properties of the hepatitis C virus core protein: A structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*, 7:2–14, 2000.

- [143] B. Mercier, L. Burlot, and C. Ferec. Simultaneous screening for HBV DNA and HCV RNA genomes in blood donations using a novel TaqMan PCR assay. *J Virol Methods*, 77(1):1–9, 1999.
- [144] S. Mihm, A. Fayyazi, and H. et Al. Hartmann. Analysis of histopathological manifestations of chronic hepatitis C virus infection with respect to virus genotype. *Hepatology*, 25:735–739, 1997.
- [145] DR Milich, JED Jones, JL Hughes, J Price, AK Raney, and A. McLachlan. Is a function of the secreted Hepatitis B e Antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6599–6603, 1990.
- [146] L.T. Mimms, J.W. Mosley, F.B. Hollinger, R.D. Aach, C.E. Stevens, M. Cunningham, D.V. Vallari, L.H. Barbosa, and G.J. Nemo. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *BMJ*, 307(6912):1095–7, 1993.
- [147] T. Mitsui, K. Iwano, and et al. Masuko. Hepatitis C virus infection in medical personnel after needlestick accident. *Hepatology*, 16:1109–14, 1992.
- [148] H. Mizushima, M. Hijikata, S.I. Asabe, M. Hirota, K. Kimura, and K. Shimotohno. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol*, pages 6215–6222, 1994.
- [149] M. Monazahian, I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, and R. Thomssen. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology*, 57:223–229, 1999.
- [150] D. Moradpour, C. Englert, T. Wakita, and J.R. Wands. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology*, 222:51–63, 1996.
- [151] H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42(9):3858–63, 1982.
- [152] M. Nassal. Hepatitis B virus replication: Novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*, 42:100–116, 1999.
- [153] G. Natoli, M. Avantiaggiati, P. Chirillo, A. Costanzo, M. Artini, C. Balsano, and M. Levvero. Induction of the DNA binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol*, 14:989–998, 1994.
- [154] A.U. Neumann, N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*, 282:103–107, 1998.
- [155] A.R. Neurath, S.B.H. Kent, N. Strick, and K. Parker. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 46:429–436, 1986.
- [156] O. Nolandt, V. Kern, and H. et al. Muller. Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J Gen Virol*, 78:1331–1340, 1997.
- [157] J.B. Noursbaum, S. Pol, and B. et Al. Nalpas. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in france and italy. collaborative study group. *Ann Intern Med*, 122:161–1689, 1995.
- [158] J.E. Novak and K. Kirkegaard. Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes and Development*, 8:1726–1737, 1994.
- [159] H. Okamoto, F. Tsuda, and Y. et Al. Akahane. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol*, 68:8102–8110, 1994.
- [160] J.R. Pallas, C. Farinas-Alvarez, D. Prieto, and M. Delgado-Rodriguez. Coinfections by HIV, hepatitis B and hepatitis C in imprisoned injecting drug users. *Eur J Epidemiol*, 15(8):699–704, 1999.
- [161] J.M. Pawlotsky. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*, 36:S65–73, 2002.
- [162] B.J. Pereira, E.L. Milford, and R.L. et al. Kirkman. Prevalence of hepatitis C virus RNA in organ donors positive for hepatitis C antibody and in the recipients of their organs. *N Engl J Med*, 327:910–5, 1992.
- [163] J. Petrik, G.J. Pearson, and J.P. Allain. High throughput PCR detection of HCV based on semiautomated multisample RNA capture. *J Virol Methods*, 64(2):147–159, 1997.
- [164] P. Pontisso, M. Gerotto, L. Benvegno, L. Chemello, and A. Alberti. Coinfection by hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Antivir Ther*, 3:137–142, 1998.
- [165] P. Pontisso, M.A. Petit, M. Vankowski, and M. Peebles. Human liver plasma membrane contains receptors for the hepatitis B virus pre S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre S2 region. *J Virol*, 63:1981–1988, 1989.
- [166] P. Pontisso, M.G. Ruvoleto, G. Fattovich, L. Chemello, A. Gallorini, A. Ruol, and A. Alberti. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterology*, 105(5):1529–33, 1993.
- [167] C. Pramoolsinsap, V. Sirikulchayanonta, W. Busakorn, Y. Poovorawan, P. Hirsch, A. Theamboonlers, and P. Lerdverasirikul. Coinfections with hepatitis g and/or c virus in hepatitis B-related chronic liver disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 30(4):741–9, 1999.
- [168] S. Prost, J.M. Ford, C. Taylor, J. Doig, and D.J. Harrison. Hepatitis B X protein inhibits p53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes. *J Biol Chem*, 273(50):33327–32, 1998.

- [169] G. Radziwill, W. Tucker, and H. Schaller. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and RNase H activity. *J Virol*, 64:613–620, 1990.
- [170] J. Rakela and HE. Vargas. Hepatitis C: Magnitude of the problem. *Liver Transpl*, 10 Suppl 1:S3–6, 2002.
- [171] S. Ranger-Rogez, S. Alain, and F. Denis. Hepatitis viruses: Mother to child transmission. *Pathol Biol (Paris)*, 50(9):568–75, 2002.
- [172] R.B. Ray, L.M. Lagging, K. Meyer, R. Steele, and R. Ray. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res*, 37:209–220, 1995.
- [173] R.B. Ray, R. Steele, K. Meyer, and R. Ray. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*, 272:10983–10986, 1997.
- [174] R. Roccasecca, H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B.B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese, and A. Nicosia. Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol*, 77(3):1856–67, 2003.
- [175] M. Rodriguez, C.A. Navascues, A. Martinez, A. Suarez, N.G. Sotorrio, R. Cimadevilla, A. Linares, R. Perez, and L. Rodrigo. Hepatitis C virus infection in patients with acute hepatitis b. *Infection*, 20(6):316–9, 1992.
- [176] M. Rossner. Review: Hepatitis B virus X gene product: A promiscuous transcriptional activator. *J Med Virol*, 36:101–117, 1992.
- [177] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491, 1988.
- [178] E. Santolini, G. Migliacco, and N. La Monica. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 68(6):3631–3641, 1994.
- [179] G. Saracco, A. Olivero, A. Ciancio, S. Carezzi, and M. Rizzetto. Therapy of chronic hepatitis C: A critical review. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 3(1):25–32, 2003.
- [180] M. Sasaki, K. Yamauchi, T. Nakanishi, Y. Kamogawa, and N. Hayashi. In vitro binding of hepatitis C virus to CD81-positive and -negative human cell lines. *J Gastroenterol Hepatol*, 18(1):74–9, 2003.
- [181] K. Sato, H. Okamoto, S. Aihara, Y. Hoshi, T. Tanaka, and S. Mishiro. Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology*, 196:354–357, 1993.
- [182] S. Sato, S. Fujiyama, M. Tanaka, K. Yamasaki, I. Kuramoto, S. Kawano, T. Sato, K. Mizuno, and S. Nonaka. Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol*, 21(2):159–66, 1994.
- [183] S. Sato, K. Suzuki, and Y. et Al. Akahane. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med*, 122:241–248, 1995.
- [184] HJ Schlicht, J. Salfeld, and H. Schaller. The duck hepatitis B virus pre-C region encodes a signal sequence which is essential for synthesis and secretion of processed core proteins but not for virus formation. *J Virol*, 61(12):3701–9, 1987.
- [185] R. Schneppenheim, U. Buddle, N. Dahlmann, and P. Rautenberg. Luminography - a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis*, 12:367–372, 1991.
- [186] C.G. Schuttler, N. Fiedler, K. Schmidt, R. Repp, W.H. Gerlich, and S. Schaefer. Suppression of the hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein. *J Hepatol*, 37(6):855–62, 2002.
- [187] M. Seifer, S. Zhou, and D.N. Standring. A micromolar pool of antigenically distinct precursors is required to initiate cooperative assembly of Hepatitis B Virus capsids in xenopus oocytes. *J Virol*, 67:249–257, 1993.
- [188] C.-M. Shih, S. J. Lo, T. Miyamura, S.-Y. Chen, and Y.-H. W. Lee. Suppression of Hepatitis B Virus Expression and Replication by Hepatitis C Virus Core Protein in HuH-7 Cells. *J. Virol*, 67(10):5823–5832, 1993.
- [189] C.M. Shih, C.M. Chen, S.Y. Chen, and Y.H.W. Lee. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *J Virol*, 69(2):1160–1171, 1995.
- [190] Y. Shiratori, S. Shiina, P.Y. Zhang, E. Ohno, T. Okudaira, D.A. Payawal, S.K. Ono-Nita, M. Imamura, N. Kato, and M. Omata. Does dual infection by hepatitis B and C viruses play an important role in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in japan? *Cancer*, 80(11):2060–7, 1997.
- [191] S. Staprans, D. Loeb, and D. Ganem. Mutations affecting hepadnavirus plus-strand synthesis dissociate primer cleavage from translocation and reveal the origin of linear viral DNA. *J Virol*, 65:1255–1262, 1991.
- [192] J. Stransky, L. Malina, B. Cieslarova, J. Stritesky, I. Putova, and J. Horak. Overt and hidden coinfection with hepatitis B and C viruses in chronic liver disease and porphyria cutanea tarda. *Acta Virol*, 44(1):23–28, 2000.
- [193] J. Summers and W.S. Mason. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29:403–415, 1982.

- [194] J. Summers, P. Smith, and A. Horwich. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol*, 64:2819–2824, 1990.
- [195] J. Summers, P. Smith, M. Huang, and M. Yu. Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J Virol*, 65:1310–1317, 1991.
- [196] R. Suzuki, Y. Matsuura, and T. et al. Suzuki. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C-terminus deleted. *J Gen Virol*, 76:53–61, 1995.
- [197] T. Takeuchi, A. Katsume, T. Tanaka, A. Abe, K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, R. Kawaguchi, S. Tanaka, and M. Kohara. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*, 116(3):636–642, 1999.
- [198] Y.J. Tan, S.P. Lim, P. Ng, P.Y. Goh, S.G. Lim, Y.H. Tan, and W. Hong. CD81 engineered with endocytotic signals mediates HCV cell entry: Implications for receptor usage by HCV in vivo. *Virology*, 308(2):250–69, 2003.
- [199] N. Terrault. Management of hepatitis B virus infection in liver transplant recipients: Prospects and challenges. *Clin Transplant*, 14:39–43, 2000.
- [200] H.L. Tillmann, M. Elze, A. Berning-Haag, A. Grundey, C. Trautwein, K.H. Böker, J. Klempnauer, H. Wedemeyer, and M.P. Manns. Two viruses are better than one. the survival of HBV-HCV coinfecting patients versus patients with either infection alone after liver transplantation. *Hepatitis Viruses*, page 427.
- [201] J. Torresi. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol*, 25(2):97–106, 2002.
- [202] J. Torresi, L. Earnest-Silveira, G. Civitico, T.E. Walters, S.R. Lewin, J. Fyfe, S.A. Locarnini, M. Manns, C. Trautwein, and T.C. Bock. Restoration of replication phenotype of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by compensatory changes in the „fingers“ subdomain of the viral polymerase selected as a consequence of mutations in the overlapping S gene. *Virology*, 299(1):88–99, 2002.
- [203] J. Torresi and S. Locarnini. Antiviral chemotherapy for the treatment of Hepatitis B Virus infections. *Gastroenterology*, 118:83–103, 2000.
- [204] S.L. Tsai, Y.F. Liaw, C.T. Yeh, C.M. Chu, and G.C. Kuo. Cellular immune responses in patients with dual infection of hepatitis B and C viruses: Dominant role of hepatitis C virus. *Hepatology*, 21(4):908–12, 1995.
- [205] T. Uchida, Y. Kaneita, K. Gotoh, H. Kanagawa, H. Kouyama, T. Kawanishi, and S. Mima. Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker negative hepatitis B virus: Probable replication promotion of the former by the latter as demonstrated by in vitro cotransfection. *J Med Virol*, 52(4):399–405, 1997.
- [206] K. Ueda, T. Tsurimoto, and K. Matsubara. Three envelope proteins of hepatitis B virus: Large S, middle S and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol*, 65:3251–3259, 1991.
- [207] E. Villa, A. Grottola, P. Buttafoco, A. Colantoni, A. Bagni, I. Ferretti, C. Cremonini, H. Bertani, and F. Manenti. High doses of alpha-interferon are required in chronic hepatitis due to coinfection with hepatitis B virus and hepatitis C virus: Long term results of a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol*, 96(10):2973–7, 2001.
- [208] J.M. Vrolijk, F.C. Bekkering, J.T. Brouwer, B.E. Hansen, and S.W. Schalm. High sustained virological response in chronic hepatitis C by combining induction and prolonged maintenance therapy. *J Viral Hepat*, 10(3):205–9, 2003.
- [209] W.X. Wang, M. Li, Y. Wang, and Z.P. Li. HNF1 is critical for the liver-specific function of HBV enhancer II. *Re Virol*, 149:99–108, 1998.
- [210] M. Weber, V. Bronsema, H. Bartos, A. Bosserhoff, R. Bartenschlager, and H. Schaller. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol*, 68:2994–2999, 1994.
- [211] B. Weiser, D. Ganem, C. Seeger, and H.E. Varmus. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol*, 48:1–9, 1983.
- [212] M.D. Weltman, A. Brotodihardjo, E.B. Crewe, G.C. Farrell, M. Bilous, J.M. Grierson, and C. Liddle. Coinfection with hepatitis B and C or B,C and delta viruses results in severe chronic liver disease and responds poorly to interferon-alpha treatment. *J Viral Hepat*, 2(1):39–45, 1995.
- [213] K.V. Wood. Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. *Promega Notes*, 28:1, 1990.
- [214] C.G. Wu, D.M. Salvay, and M. et Al. Forgues. Distinctive gene expression profiles associated with hepatitis B virus X protein. *Oncogene*, 20(28):3674–82, 2001.
- [215] T. Yamanaka, T. Kodama, and T. Doi. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(3):528–34, 2002.

- [216] H. Yan, D. Huang, and Z. Lang. Detection of viral markers in liver tissue dually infected with hepatitis B and C viruses by double labelling. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 13(1):54–6, 1999.
- [217] K. Yasui, T. Wakita, and K. Tsukiyama-Kohara. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol*, 72:6048–6055, 1998.
- [218] T. Yen, E.B. Keeffe, and A. Ahmed. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol*, 36(1):47–53, 2003.
- [219] Y. Yoneda. Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes to Cells*, 5:777–787, 2000.
- [220] H. Yoshida, N. Kato, Y. Shiratori, M. Otsuka, S. Maeda, J. Kato, and M. Omata. Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa b-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem*, 276(19):16399–405, 2001.
- [221] M. Yu and J. Summers. Phosphorylation of the duck hepatitis B virus capsid protein associated with conformational changes in the C-terminus. *J Virol*, 68:2965–2969, 1994.
- [222] X. Yu and J.E. Mertz. Promoters for synthesis of the pre-c and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol*, 70:8719–8726, 1996.
- [223] C.H. Yuh, Y.L. Chang, and L.P. Ting. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol*, 66(7):4073–84, 1992.
- [224] C.H. Yuh and L.P. Ting. C/EBP-like proteins binding to the functional box- $\alpha$  and  $\beta$  of the second enhancer of hepatitis B virus. *Mol Cell Biol*, 11:5044–5052, 1991.
- [225] C.H. Yuh and L.P. Ting. Differentiated liver cell specificity of the second enhancer of hepatitis B virus. *J Virol*, 67:142–149, 1993.
- [226] P. Zhang, A.K. Raney, and A. McLachlan. Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 67:1472–1481, 1993.
- [227] M. Zhong, J. Hou, and K. Luo. Identification of vertical transmission of hepatitis B virus from mother to children by direct sequencing a segment of surface gene of hepatitis B virus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 76(3):194–6, 1996.
- [228] S. Zhou, S.Q. Yang, and D.N. Standring. Characterization of Hepatitis B Virus Capsid particle assembly in *Xenopus* oocytes. *J Virol*, 66:3086–3092, 1992.
- [229] A.L. Zignego, R. Fontana, S. Puliti, S. Barbagli, M. Monti, G. Careccia, F. Giannelli, C. Gianini, G. Buzzelli, M.R. Brunetto, F. Bonino, and P. Gentilini. Relevance of inapparent coinfection by hepatitis B virus in alpha-interferon-treated patients with hepatitis C virus chronic hepatitis. *J Med Virol*, 51(4):313–318, 1997.
- [230] F. Zoulim and C. Seeger. Reverse transcription in Hepatitis B Virus is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *J Virol*, 68:6–13, 1994.



## **Danksagung**

Am Ende einer mehrjährigen Zusammenarbeit ist es mir ein Bedürfnis, mich für Hilfestellung, Anleitung, Beratung und den vielfach gespendeten Trost zu bedanken. Molekularbiologische Forschung braucht Erfahrung – das habe ich gelernt – und ich konnte aus dem grossen Wissensfundus der Labore der Abteilung Molekulare Pathologie in Tübingen reichhaltig profitieren.

Allen voran gilt den MTAs und den älteren (erfahreneren) Mit-Doktoranden der Dank, dass ich die meisten Hürden und Untiefen von Experimenten schon vorab erkannte. Sie waren es, die mir Zugang zu Material, Methoden und neuen Ideen verschafften.

Ohne entsprechende Infrastruktur ist kein Experiment möglich. Die gute Ausstattung der Labore sowie die Verfügbarkeit eingeworbener Mittel ist ein wesentlicher Baustein des Erfolgs; die Belegung durch ausgezeichnete wissenschaftliche Mitarbeiter ein weiterer. Dafür sei Prof. Kandolf und Dr. Bock gedankt. Prof. Kandolf möchte ich ebenfalls für die Übernahme der Erstkorrektur und die Betreuung im Promotionsverfahren danken.

Ein Betreuer, der fast immer ansprechbar ist, für jedes Problem ein offenes Ohr hat; jemand, der die Richtung diskutieren kann, Impulse aufgreift und ihnen zur Reife verhilft, Ideen moderiert und augmentiert, Ergebnisse wichtet und hilft, sie in Zusammenhang zu bringen – dies ist in meinen Augen ein ausgezeichnete Betreuer und charakterisiert die fruchtbare Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Bock. Ihm verdanke ich, Freude am wissenschaftlichen Arbeiten gefunden zu haben. Durch ihn ist meine Dissertation zu einem bedeutsamen Erlebnis geworden, anstrengend und reich an Höhen und Tiefen.

Ich habe viel gelernt.

# Lebenslauf

## ***Persönliche Daten***

Name: Peter Bernstein, geb. Hennig am 3.10.1978 in Erfurt

Eltern: Margit Hennig-Knote, Sonderschulpädagogin; Dr. Peter Hennig, Dipl.-Ing.

Familienstand: verheiratet mit Annegret Bernstein, Musikerin; 2 Kinder (geboren am 05.08.2002 und am 31.05.2004)

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Russisch

## ***Schulischer Werdegang***

September 1985 Einschulung; Beginn des Violin-Unterrichts

September 1988 Wechsel in eine Russisch-Förderklasse

September 1991 Wechsel ins Gymnasium

1992-1994 Mitgliedschaft als Geiger im Deutschen Musikschulorchester

August –

Dezember 1994 High - School - Aufenthalt in Detroit (Michigan, USA)

Juni 1997 Abitur

Herbst 1997 Unfallbedingte Pause

Winter 1997/1998 Auslandsaufenthalt in Kanada

April 1998 –

März 1999 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Arnstadt (Innere Station)

## ***Studium***

April 1999 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

September 2001 –

Oktober 2003 Anfertigung der Dissertationsarbeit in der Abteilung für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen bei Prof. Dr. R. Kandolf (Betreuer: Dr. C.T. Bock)

April 2004 Beginn des Praktischen Jahres im Städtischen Krankenhaus Sindelfingen mit dem Wahlfach Orthopädie

26. April 2005 Abschluß des Studiums in Regelstudienzeit mit dem 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.